

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**DETERMINAÇÃO METABÓLITOS DE PROGESTERONA
NAS EXCRETAS DE PAPAGAIO VERDADEIRO (*Amazona
aestiva*) APÓS DESAFIO COM ACTH**

ANA LÍVIA ROCHA MONTEIRO CHAVES

Botucatu - SP
Janeiro 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**DETERMINAÇÃO METABÓLITOS DE PROGESTERONA NAS
EXCRETAS DE PAPAGAIO VERDADEIRO (*Amazona aestiva*)
APÓS DESAFIO COM ACTH**

ANA LÍVIA ROCHA MONTEIRO CHAVES

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof.Ass.Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu - SP
Janeiro 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Chaves, Ana Livia Rocha Monteiro.

Determinação metabólicos de progesterona nas excretas de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) após desafio com ACTH / Ana Livia Rocha Monteiro Chaves. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Assunto CAPES: 50500007

1. Radioimunoensaio 2. Papagaio (Ave) - Reprodução

CDD 636.30896

Palavras-chave: ACTH; Papagaio verdadeiro; Progesterona; Radioimunoensaio

COMISSÃO EXAMINADORA

Botucatu, 23 de janeiro de 2008

Prof. Ass. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Adília e Wellington pelo apoio, amor e dedicação por
toda vida*

Ao meu esposo Sérgio pelo amor, carinho e estímulo.

Aos meus sogros Dione e João Weine pela amizade e incentivo,

Aos meus irmãos Jonas e Rafael pelo afeição, ternura e torcida.

Aos meus bichinhos de estimação pelo afeto.

*Aos papagaios verdadeiros de quem coletamos o material para esta
pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tenho na vida, por todas as vezes que necessitei, e por todas as pessoas maravilhosas que me cercam.

Ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira, pelos preceitos ensinados, pela confiança e paciência em cada dia me passar os princípios da pesquisa e docência.

À professora Maria Denise Lopes pelo apoio e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Sony Dimas Bicudo, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Marco Antonio Alvarenga, Eunice Oba, Nereu Carlos Prestes, Cezinande de Meira por este tempo de boa convivência, e aprendizado nas aulas.

Ao professor Stélio Pacca Loureiro Luna pelo auxílio sempre que necessitei.

Ao Mestre Sérgio Weine Paulino Chaves que fez com tanta dedicação toda a minha estatística e auxiliou na interpretação dos resultados.

À querida amiga Myrna Campos Ferraz, pela amizade, por me receber em sua casa sempre que precisei.

Aos colegas Caroline Junko Fujihara e Wolff Camargo Marques Filho pela elaboração e execução deste trabalho.

Ao projeto Centrofauna do Instituto Flovida - Anidro por ter cedido a estrutura e os animais para a coleta do material.

À amiga Sílvia Elaine Rodolfo de Sá Lorena pela amizade e caronas.

Aos funcionários da pós-graduação da FMVZ, Denise, Maria e José Roberto, por toda a ajuda sempre com bom humor.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Edilson, Márcio, Walter, Tico e Cristina, pela colaboração e boa convivência.

A todas as pessoas que conviveram comigo na FMVZ durante estes anos, e que direta ou indiretamente contribuíram para a minha história.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

***“A natureza fez tudo a nosso favor,
nós, porém, pouco ou quase nada
temos feito em favor da natureza”***

José Bonifácio de Andrada e Silva (1763 – 1838)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores médios (desvios padrão) da concentração fecal de progesterona (ng.g-1) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, nos animais dos grupos controle e tratamento, agrupados de acordo com o sexo.
- TABELA 2. Teste de Tukey para comparação de médias entre todos os animais (machos e fêmeas), ao nível de 5% de significância, onde c é controle (aplicação de solução fisiológica) e t é tratamento (aplicação de solução de ACTH).
- TABELA 3. Teste de Tukey para comparação de médias entre os machos, ao nível de 5% de significância, onde c é controle (aplicação de solução fisiológica) e t é tratamento (aplicação de solução de ACTH).
- TABELA 4. Teste de Tukey para comparação de médias entre as fêmeas, ao nível de 5% de significância, onde c é controle (aplicação de solução fisiológica) e t é tratamento (aplicação de solução de ACTH).
- TABELA 5. Média estatística dos animais

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Valores médios da concentração fecal de progesterona (ng.g^{-1}) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, nas fêmeas dos grupos controle e tratamento.
- FIGURA 2. Valores médios da concentração fecal de progesterona (ng.g^{-1}) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, nos machos dos grupos controle e tratamento.
- FIGURA 3. Valores médios da concentração fecal de progesterona (ng.g^{-1}) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, em todos os indivíduos (machos e fêmeas) dos grupos controle e tratamento.
- FIGURA 4. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no macho 1.
- FIGURA 5. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no fêmea 2.
- FIGURA 6. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no macho 3.
- FIGURA 7. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no fêmea 4.
- FIGURA 8. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no macho 5.
- FIGURA 9. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no fêmea 6.
- FIGURA 10. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no macho 7.
- FIGURA 11. Quantidades de progesterona nos grupos controle e tratamento no fêmea 8.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
OBJETIVO.....	5
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Animais em extinção	7
2. Aves	8
2.1. Psitacídeos.....	9
2.1.1. Papagaio Verdadeiro.....	9
3. Endocrinologia da conservação.....	10
4. Hormônios do estresse	11
4.1. Glicocorticóides.....	11
5. Hormônios da reprodução	12
5.1. Período reprodutivo das aves.....	13
5.2. Testosterona.....	13
5.3. Estrógenos.....	14
5.4. Prolactina.....	14
5.5. Progestágenos.....	15
6. Avaliação dos hormônios.....	16
6.1. Método invasivo.....	16
6.2. Método não invasivo.....	17
6.2.1. Corticosteróides.....	20
6.2.2. Testosterona.....	20
6.2.3. Progesterona e Estradiol.....	21

6.3. Interação entre os métodos.....	22
6.4. Cuidados com a coleta e armazenagem.....	22
6.5. Análise dos hormônios.....	22
 BIBLIOGRAFIA	23
 CAPÍTULO 2.....	32
 TRABALHO CIENTÍFICO.....	33
 APÊNDICE.....	42

RESUMO

CHAVES, ANA LÍVIA ROCHA MONTEIRO. *Determinação de metabólitos de progesterona nas excretas de papagaio verdadeiro (Amazona aestiva) após desafio com ACTH*. Botucatu, 2008. 50p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da administração de ACTH nos níveis fecais de progesterona em Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*). Foram utilizados 8 papagaios verdadeiro, sendo 4 machos e 4 fêmeas, sexados por amostra de DNA por PCR. Fez-se dois dias de coleta tendo 7 dias de intervalo entre eles. Aplicou-se, no primeiro dia, 0,2 mL de solução fisiológica em 2 machos e 2 fêmeas (grupo controle) e nos outros 2 machos e nas outras 2 fêmeas solução de ACTH (25 UI/animal) (grupo tratamento). No segundo dia os grupos foram trocados, os papagaios que foram grupo controle passaram a ser grupo tratamento e os que foram tratamento passaram a controle. Em cada dia coletou-se as fezes a cada 30 minutos durante 10 horas. Este material foi armazenados em criotubos e congelados a -20° C para posterior análise. As fezes foram liofilizadas e foi feito um pool de cada hora. A progesterona foi extraída e depois analisada por radioimunoensaio no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da UNESP- Botucatu. A investigação do comportamento das variáveis estudadas, referente aos tratamentos aplicados, foi analisada como um delineamento crossover, sendo que para as dosagens hormonais, a média dos machos e das fêmeas foi observada em um período (horário), constituindo uma parcela principal. A análise estatística foi efetuada por meio do programa GLM (SAS, 1985) e as conclusões obtidas basearam-se ao nível de 5% de significância pelo teste F e de Tukey. Foi também feita a estatística descritiva, para todos os indivíduos, pelo cálculo das médias e dos desvios padrão. Houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratamento, sendo que o grupo controle teve os níveis de metabólitos de progesterona mais altos, quando os indivíduos foram analisados conjuntamente

ou quando se analisou apenas os machos. Quando se analisou apenas os indivíduos fêmeas não houve diferença significativa entre os animais que foram do grupo controle dos que foram do grupo tratamento.

Palavras-chave: papagaio verdadeiro, progesterona, radioimunoensaio, ACTH

ABSTRACT

CHAVES, ANA LIVIA ROCHA MONTEIRO. Determination of progesterone metabolites on the excreta of blue-fronted amazons (*Amazona aestiva*) after ACTH challenge . Botucatu, 2008. 50p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

The aim of this study was to examine the effect of the infusion of ACTH in the progesterone fecal levels in blue-fronted amazons (*Amazona aestiva*). It was used 8 blue-fronted amazons, being 4 females and 4 males, sexing for a sample of DNA for PCR. It has been made two days of sampling, taking 7 days of interval between the days. It was applied, on the first day, 0,2 ml of saline solution in 2 males and 2 females (control group) and in the other 2 males and the other 2 females ACTH solution (25 IU/animal) (treatment group). On the second day the groups have been exchanged, the blue-fronted amazons that were control group became the treatment group and the ones that were treatment became control group. In each day, it has been collected the feces every 30 min. for 10 hr. This material was stored in cryotubes and frozen at -20 °C for further analysis. The feces were dried. The progesterone was extracted and after analyzed by radioimmunoassay in Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da UNESP – Botucatu. The statistical analysis was made using the program GLM (SAS, 1985) and the conclusions obtained based to the level of 5% of significance by the test F and the Tukey. It was also made the descriptive statistics, for all individuals, by the calculation of mean and standard deviation. There was statistical difference between control group and treatment group, but

the control group had the highest levels of progesterone metabolites when the individuals were analyzed jointly or when examined only the males. When examined only females, there was no significant difference between control and treatment group.

Keywords: blue-fronted amazons, progesterone, radioimmunoassay, ACTH.

CAPÍTULO 1

Introdução

INTRODUÇÃO

Apesar da preocupação mundial com a conservação dos animais selvagens se observa um grande número destes em risco de extinção (Lopes, 2002).

As últimas pesquisas apontam que milhares de espécies animais foram extintas nos últimos cem anos. Muitas delas poderiam revelar ao homem informações importantes sobre o meio ambiente e mesmo a cura para determinados tipos de doenças (<http://www.suapesquisa.com/animais>, acessado em 03/04/2007).

No Brasil, de acordo com a nova lista do Ministério do Meio Ambiente, existem cerca de 370 espécies de animais, sendo desse total 43 % de aves, em vias de extinguir-se, ou extintas (<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>, acessado em 26/04/2007).

O *Amazona aestiva* é o mais procurado dos papagaios para servir de animal de estimação. Vive na mata úmida ou seca, palmais, beira de rio (Sick, 1997).

Dentro deste contexto percebe-se a real necessidade de programas de conservação para animais ameaçados de extinção e conseqüentemente para a sobrevivência das espécies, promovendo a procriação, criando condições para a sobrevivência de populações de vida livre (Cockrem, 2005) em suas regiões de origem.

O monitoramento não invasivo de concentrações de hormônios, especialmente por meio da dosagem de esteróides fecais, são extensivamente usados para acessar a função reprodutiva e o estresse de animais de programas de reprodução em cativeiro e de animais selvagens (Cockrem, 2005).

Hormônios esteróides podem ser avaliados a partir do plasma sangüíneo (Good, 2003) (métodos invasivos) ou a partir de metabólitos na urina (Hay & Mormède, 1998), na saliva (Cooper et al., 1989) e nas fezes (Czekala et al., 2003), (métodos não-invasivos), por RIA (radioimunoensaio),

EIA (ensaio imunoensimático) e HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), (Denhard et al, 2003) entre outros.

Segundo Wasser et al. (2002) existe uma grande variedade de metabólitos de hormônios nas fezes.

A taxa da excreção dos hormônios esteróides pela urina e fezes varia conforme a espécie e o hormônio a ser avaliado (Palme et al., 1996 apud Wasser et al., 2002). Portanto há necessidade de validação dos métodos para cada espécie estudada.

O estresse agudo não específico deprime a expressão do estro em vacas, pelo aumento da progesterona que pode ser originada do córtex da adrenal, em resposta ao ACTH (Yoshida & Nakao 2005). Sendo, portanto, a avaliação da progesterona uma importante ferramenta como indicador de estresse nos animais.

A ave não possui corpo lúteo, tendo, portanto, uma pequena produção de progesterona pelas células granulosas, deste modo a progesterona pode ser importante na avaliação de estresse de aves, tanto em machos quanto em fêmeas.

Objetivo

OBJETIVO

Verificar o efeito da administração de ACTH nos níveis fecais de progesterona em Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*).

Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Animais em extinção

É estimado que haja em torno de 10 a 15 milhões de espécies da fauna, flora e microorganismos, desse total 60 mil seriam vertebrados e o outro restante seria constituído de insetos e plantas (Assessoria de Comunicação Social WWF Brasil, 2006).

O relatório do Planeta Vivo 2004 mostra que em 30 anos houve uma redução de 40% da fauna (Assessoria de Comunicação Social WWF Brasil, 2006). Outra importante pesquisa publicada em relatório da União para Conservação da Natureza (IUCN) mostrou que um quarto das espécies animais conhecidas pelo homem está ameaçada de extinção (IUCN, 2006).

Segundo Cockrem (2005) o número total de espécies de vertebrados ameaçados de extinção é por volta de 10.000, com aproximadamente um quarto de espécies mamíferas, um oitavo de espécies de pássaros e um terço de anfíbios.

São diversas as causas que levam a extinção de animais no mundo, dentre elas destacam-se, segundo Lopes (2002), a expansão urbana descontrolada, as degradações ambientais e o tráfico de animais, tendo o último papel fundamental neste processo.

O comércio ilegal de animais silvestres é um negócio que gera uma expressiva renda e movimenta um alto montante no mercado exterior. Há uma estimativa que esta prática ilegal movimente em todo o mundo, de 10 a 20 bilhões de dólares (Webb, 2001). No Brasil, esses animais são negociados em diversas feiras livres, espalhadas pelo país, que mostram bastante organização no modo como atuam (Pereira & Brito, 2005).

O processo de extinção está relacionado ao desaparecimento de espécies ou grupos de espécies em um determinado ambiente ou ecossistema. Semelhante ao surgimento de novas espécies, a extinção é um evento natural: espécies surgem por meio de eventos de especiação (longo isolamento geográfico, seguido de diferenciação genética) e desaparecem devido a eventos de extinção (catástrofes naturais, surgimento de competidores mais eficientes). Normalmente, porém, o

surgimento e a extinção de espécies são eventos extremamente lentos, demandando milhares ou mesmo milhões de anos para ocorrer (<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/>, acessado em 03/04/2007).

Ao longo do tempo, porém, o homem vem acelerando muito a taxa de extinção de espécies, a ponto de ter-se tornado, atualmente, o principal agente do processo de extinção. Em parte, essa situação deve-se ao mau uso dos recursos naturais, o que tem provocado um novo ciclo de extinção de espécies, agora sem precedentes na história geológica da terra (<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/>, acessado em 03/04/2007).

2. Aves

O grupo das aves é o mais conhecido e diverso entre os vertebrados, a maioria apresenta hábito diurno e vocaliza com frequência (Develey et al., 2003).

De acordo com Antas (2004) as aves formam um grupo de animais que nos desperta o maior interesse, seja pelas suas diferentes formas e coloridos, seja pela facilidade de encontrá-las em praticamente todos os ambientes do planeta. Segundo Sick (1983), existem cerca de 9.500 aves descritas na superfície terrestre, das quais perto de 1.650 foram listadas como de ocorrência no Brasil. Isto equivale à aproximadamente 57% das espécies de aves registradas em toda América do Sul, tendo uma das mais diversas avifaunas do mundo. Mais de 10% dessas espécies são endêmicas ao Brasil, fazendo deste país um dos mais importantes para investimentos em conservação.

As aves, pela beleza de suas cores e pelos seus cantos suaves e melodiosos são, sem dúvida, o grupo de animais mais procurados (Pereira, 2005). Apreensões do IBAMA em todo o Brasil, durante os anos de 1999 e 2000, mostraram que 82% dos animais comercializados naquela época eram aves (RENCTAS, 2001). Algumas aves chegam a valer verdadeiras fortunas como certos Psitacídeos e alguns Passeriformes, como curiós (*Sporophila angolensis*) e canários-da-terra (*Sicalis flaveola*). Esse tipo de comércio já contribui para a extinção de algumas espécies, um exemplo bem recente foi a ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) (RENCTAS, 2001). Outras espécies têm suas populações ameaçadas por tal comércio, como exemplo temos a Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) a Arara-azul-de-lear (*A. leari*), a Jandaia gangarra (*Aratinga cactorum*), o Pintor-verdadeiro (*Tangara fastuosa*), o Ferreiro-de-barbela (*Procnias averano*), Pintassilva

(*Carduelis yarrellii*) e o Bicudo (*Sporophila maximiliani*) (Sick, 1997; Guedes, 2001, Lima, 2004, Nascimento, 2000; Silva & Rego, 2004).

2.1. Psitacídeos

A família dos psitacídeos é composta por diversos grupos de aves, cujo tamanho varia de grande porte, como as araras até pequenos, como os tuins. Têm bicos curvos e fortes, como os quais escavam ninhos nos troncos das árvores (Frisch, 1981).

Para Sigrist (2006) os psitacídeos são das aves mais populares, papagaios, periquitos e araras distribuem-se em quase todos os biomas brasileiros especialmente em florestas. Muitas espécies possuem a capacidade de imitar a fala humana, o que aliada ao fato de possuírem belas plumagens, fazem com que essas aves sejam avidamente perseguidas na natureza por traficantes de animais.

São aves distribuídas pela zona tropical do globo, de onde se irradiam a áreas subtropicais e até frias como a Patagônia. Constituem uma família tão antiga que as especulações sobre sua filogenia tornam-se vagas. O Brasil é o país mais rico do mundo em *Psittacidae*, vivendo aqui inclusive seus maiores representantes, as araras. Nos primeiros mapas, de 1500 em diante, esta riqueza já era plenamente evidenciada, sendo nosso país designado como “Terra dos Papagaios” (Sick, 1997).

2.1.1. Papagaio Verdadeiro

O *Amazona aestiva* é freqüentemente considerado um dos papagaios mais comuns no Brasil Centro-oriental. Prefere áreas semi-abertas, bordas de florestas, capoeiras, cerrados, matas secas, caatingas, matas de galeria, buritizais, savanas de cupim e cerradão. Também é encontrado do Chaco ao Pantanal do Mato Grosso, assim como em cidade, parques e jardins. É facilmente reconhecido por sua fronte azulada, píleo e face amarelada. Ocorre no Brasil central, no Nordeste e em parte do Sudeste. Alimenta-se de frutos e possivelmente de larvas, ninfas e insetos, que procura sob a casaca das árvores. Deslocam-se em grupos de 10 ou mais aves ou aos casais. Reproduz-se em cupinzeiros terrestres ou em ocos de árvores (Sigrist, 2006).

O mais procurado dos papagaios para servir de animal de estimação, tendo a fama de ser o melhor “falador” (Sick, 1997)

Para Pereira (2005), uma das estratégias mais utilizadas pelos comerciantes de aves é o de realizar as transações em sua própria casa. Alguns deles comparecem às feiras, e o freguês faz seu pedido, que será atendido no máximo uma semana depois, em alguns casos até no mesmo dia. Geralmente os filhotes de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) são comercializados por esses grupos de comerciantes, pois essas aves despertam muito a atenção das pessoas sendo assim muito arriscado vendê-las em público. Em Fortaleza, Costa (2005) também observou essa tática sendo utilizada pelos comerciantes de aves.

O Papagaio-Verdadeiro é uma espécie considerada ameaçada de extinção no Estado de São Paulo, na categoria vulnerável (São Paulo, 1998 apud Gussoni, 2003). É fato que as populações nativas de *Amazona aestiva* na região do município de São Paulo foram extintas e que os indivíduos desta espécie hoje existentes na área devem ser provenientes de solturas de indivíduos de cativeiro (Gussoni, 2003).

A ordem dos Psitaciformes é um grupo diverso de pássaros que tem informações limitadas a respeito da endocrinologia reprodutiva. A maioria dos dados é primariamente de metabólitos de esteróides fecais para identificar o gênero (Bercovitz et al., 1979 apud Lee et al., 1999).

3. Endocrinologia da Conservação

“Estudo endócrino que pode contribuir para a conservação” (Cockrem et al., 2004). Reconhecido recentemente como uma área de pesquisa, inclui a neuroendocrinologia comportamental como objetivo para reduzir a perda da biodiversidade e melhorar a sobrevivência e reprodução dos animais ameaçados de extinção (Cockrem, 2005).

A neuroendocrinologia comportamental é o elo entre a função neuroendócrina e o comportamento em animais (Cockrem, 2005), sendo, portanto, uma importante ferramenta no suprimento à conservação, pois auxilia na avaliação da saúde de uma população ou de um indivíduo (Romero, 2004).

A pesquisa na área da Endocrinologia da Conservação divide-se em três tipos de estudo: teórico, diagnóstico e gestão. O estudo teórico recorre a questões básicas a respeito da biologia animal, tais como: de que maneira variações no ambiente afeta a reprodução. Estudos diagnósticos se referem a assuntos sobre o *status* fisiológico e comportamental de um indivíduo ou grupos de animais. Estudos

de gestão pesquisam diretamente questões práticas, como: de que forma estimular a reprodução em animais ameaçados de extinção (Cockrem & Ishii, 1999).

A análise não invasiva de concentrações de hormônios, especialmente de esteróides fecais, é o método endócrino mais comum associado à endocrinologia da conservação (Berger et al., 1999).

4. Hormônios do estresse

A arquitetura do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é similar em aves e mamíferos com o controle pelo ACTH, liberado pela pituitária, da liberação de corticosterona, liberada pela adrenal (Mikami, 1986).

Um adequado balanço entre o processo de catabolismo, induzido pelos hormônios do estresse como a epinefrina, norepinefrina e cortisol, e processos anabólicos, provocados por esteróides sexuais e hormônios de crescimento, são necessários para a sobrevivência e saúde do animal (Lundberg, 2005). Porém com o aumento da pressão antropogênica e dos distúrbios ambientais, este equilíbrio pode ser quebrado (Romero, 2004), induzindo ao estresse crônico.

Os animais respondem a um estressor com uma série de respostas endócrinas que aumentam imediatamente a energia disponível, em parte por inibição de processos biológicos que não são requeridos para sobrevivência imediata (Wingfield, 1994).

4.1. Glicocorticóides

Uma das respostas primárias ao estresse é um aumento da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical causando um aumento da concentração de glicocorticóides na circulação sanguínea. Em pouco tempo, os glicocorticóides se elevam redirecionando os recursos para mobilizar a energia, que pode ser usada para resolver a situação de estresse (Sapolsky, 1992). Caso o estressor não seja eliminado e os níveis destes hormônios continuem altos por mais que alguns dias, as conseqüências, que são prejudiciais, incluem a supressão do sistema imune, a diminuição de massa muscular e a supressão reprodutiva (Pottinger, 1999).

Em aves, anfíbios, répteis e muitos roedores o principal glicocorticóide é a corticosterona e em peixes e mamíferos é o cortisol (Romero, 2004)

O cortisol influencia no metabolismo das células, na distribuição da gordura e no sistema imune, seus níveis são controlados pelo sistema de feedback no hipotálamo e a formação hipocampal (Lundberg, 2005).

As respostas ao estresse por longo período de tempo afetam negativamente a sobrevivência, a reprodução e a resistência às doenças, devido à queda da imunidade de uma grande variedade de aves e mamíferos (Hofer & East, 1998 apud Dehnhard et al., 2003).

Lundberg (2005) descreve ainda outras implicações na saúde do animal devido ao elevado nível de cortisol circulante, que podem promover o acúmulo de gordura na região abdominal, infarto do miocárdio, problemas cardiovasculares, diabetes Tipo 2, redução da função do sistema imune, prejuízos de cognição entre outros.

5. Hormônios da Reprodução

Entender os processos básicos de reprodução é crucial para determinar porque alguns animais se reproduzem e outros não. Diversas espécies de felídeos não domésticos se reproduzem fracamente em cativeiro, e há poucas informações fisiológicas disponíveis para ajudar a identificar as causas desta falha na reprodução em certas espécies, sejam em populações ou indivíduos. Portanto, é conveniente desenvolver uma base de dados das inter-relações de regulação das atividades hormonais, monitorando padrões dos hormônios da reprodução, porém utilizar métodos por coleta de sangue não é prático para estas espécies. Em substituição, deve-se fazer o uso de técnicas não invasivas para avaliar a função reprodutiva (Brown et al., 1993).

As gônadas das aves produzem hormônios esteróides que atuam em todo o organismo, afetando o desenvolvimento do sistema dos ductos reprodutivos apêndices de cabeça (crista e barbela), penas, emissão de sons, composição do sangue, absorção de nutrientes e comportamento. O esteróide testicular predominante é a testosterona, enquanto o ovário secreta estrogênio progesterona e testosterona (Burke, 1996).

5.1. Período reprodutivo das aves

De acordo com Rodrigues et al. (2005) o período reprodutivo de várias espécies de aves inicia entre os meses de setembro e outubro, já para Link (1997), os papagaios iniciam a estação de reprodução por volta do mês de agosto.

5.2. Testosterona

Assim como os mamíferos, nos machos das espécies aviárias, os testículos têm a função dupla de produzir espermatozóides (espermatogênese) e produzir e secretar hormônios esteróides. Os hormônios reprodutivos pelos testículos são principalmente andrógenos, sendo a testosterona o mais importante (Sesti & Ito, 2000).

O comportamento paterno em pássaros é normalmente caracterizado por baixo nível plasmático de testosterona e elevado nível de prolactina. O pico plasmático de testosterona ocorre logo no início da época de reprodução seguido por uma diminuição aproximadamente na época em que a concentração de prolactina começa a aumentar (Ball, 1991). A testosterona no macho estimula o canto (Nottebohm, 1981) e a agressão (Wingfield et al., 1987) em pássaros.

5.3. Estrógenos

O estradiol é o estrógeno primário, biologicamente ativo produzido pelo ovário. Todos os estrógenos ovarianos são produzidos a partir de precursores androgênicos (Hafez & Hafez, 2004).

Os estrógenos atuam no SNC (Sistema Nervoso Central) induzindo comportamento de cio na fêmea, no útero aumentando a amplitude e frequência das contrações potencializando o efeito da ocitocina e PGF2 α . Nos mamíferos, estes esteróides são responsáveis pelas características sexuais secundárias femininas, estimulam o crescimento de ductos e desenvolvem as glândulas mamárias, exercem efeitos de retro alimentação negativa e positiva no controle, respectivamente, da liberação de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) através do hipotálamo (Hafez & Hafez, 2004).

Em aves, os estrogênios atuam na síntese da gema pelo fígado, mobilização de cálcio dos ossos medulares para a glândula da casca. As células da teca produzem androgênios e estradiol (Bahr & Johnson, 1991).

5.4. Prolactina

É um hormônio polipeptídico secretado pela adeno-hipófise. É reconhecida como um hormônio gonadotrófico por causa das suas propriedades luteotróficas em roedores. Pode ainda estar envolvida na mediação dos efeitos estacionais e lactacionais na reprodução em animais domésticos (Hafez & Hafez, 2004).

A prolactina está envolvida na incubação e induz ao comportamento de choco em aves. O Choco ocorre durante a estação de reprodução em muitas espécies de aves e consiste em 2 fases: a incubação dos ovos e o cuidado com os filhotes (Zadworny et al., 1999)

A prolactina plasmática eleva rapidamente seus níveis durante o estresse em mamíferos, este aumento é freqüentemente considerado como parte da resposta clássica ao estresse (De Vlaming, 1979 apud Chastel et al., 2005). Porém, segundo Chastel et al. (2005), em aves, está envolvida no desenvolvimento do papo, incubação e comportamento parental. Há várias indicações que os níveis de prolactina plasmática, em aves, aumentam por poucos minutos e depois diminuem rapidamente durante um evento de estresse, fazendo com que a ave deixe o ninho e procure segurança.

5.5. Progestágenos

Em mamíferos, a progesterona é o progestágeno natural de maior prevalência, sendo secretada pelas células luteínicas do corpo lúteo, pela placenta e glândulas adrenais. Prepara o endométrio para implantação e manutenção da prenhez, atua sinergisticamente com os estrógenos na indução do cio, auxilia no desenvolvimento do tecido secretor da glândula mamária, provoca inibição do cio e do pico pré-ovulatório do LH quando em níveis elevados, inibe motilidade uterina (Hafez & Hafez, 2004).

Uma das principais funções dos ovários é a produção de hormônios esteróides, essenciais para o crescimento e função do trato reprodutivo. Em aves, a progesterona atua na secreção de albúmen e indução do pico de LH. Ao contrário de mamíferos, nas aves, as células da granulosa são a principal fonte de progesterona e de pequenas quantidades de androgênios, É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, porque não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, uma estrutura associada à prenhez (Bahr & Johnson, 1991).

A liberação pré-ovulatória de progesterona na galinha, em contraste com a de estrogênio que ocorre na maioria dos mamíferos, induz a secreção de LH, que, em aproximadamente 4 a 6 horas, desencadeia a ovulação. O folículo pós-ovulatório permanece após a ovulação e exerce um papel na sincronização da postura, pois a remoção cirúrgica deste folículo retarda a postura (Johnson, 2006)

Em fêmeas de aves o estradiol e a progesterona aumentam suas concentrações no sangue no máximo 1 dia antes da postura do primeiro ovo. Entretanto, o estradiol declina, mas a progesterona permanece alta por 2 dias após esta postura (Sockman & Schwabl, 1999).

Segundo Bluhm et al. (1983), os níveis de progesterona em patos-reais (*Anās platyrhynchos*) aumentam acentuadamente com a postura do segundo ao quarto ovo, decrescendo bastante com a postura do sexto ovo, e volta a aumentar ligeiramente com o término do ciclo de postura.

Uma abordagem para estudar o problema de infertilidade em bovinos é mimetizar a resposta ao estresse (pituitária-adrenal), pela aplicação de ACTH (Hormônio adrenocorticotrópico). Este hormônio causa aumento nas concentrações de progesterona no sangue (Stoebel & Moreberg, 1982).

De acordo com Dobson e Smith (1995) em bovinos adultos, o estresse e o ACTH causam liberação de cortisol e progesterona pela adrenal e ambos podem afetar a regulação do eixo endócrino reprodutivo.

Em experimentos realizados com vacas leiteiras ovariectomizadas, em lactação, Yoshida e Nakao (2005) aplicaram ACTH e observaram que após a administração a concentração de progesterona no plasma elevou-se a níveis comparáveis aos encontrados na fase luteal, indicando que a provável fonte do hormônio foi a adrenal estimulada pelo ACTH.

O estresse agudo não específico deprime a expressão do estro pelo aumento da progesterona plasmática originária do córtex da adrenal em mamíferos (Wagner et al., 1972; Stoebel & Moreberg, 1982; Yoshida & Nakao, 2005).

6. Avaliação dos hormônios

Para avaliar a saúde de uma população, estudos sobre mensuração de resposta ao estresse têm aumentado nas áreas de ecologia, biologia e medicina da conservação (Wasser et al., 2002).

6.1. Métodos invasivos

De acordo com Good (2003), a mensuração de esteróides no plasma reflete a situação de um indivíduo em um momento pontual, portanto, mudanças rápidas e em curto prazo nas concentrações de glicocorticóides, como aquelas provocadas por um novo ambiente ou situação, são mais bem determinadas utilizando amostras de plasma.

Para Brown & Wildt (1997) uma única coleta de sangue pode produzir valores que representam apenas um único momento, o pico ou o ponto médio de uma secreção pulsátil.

No passado a atividade hormonal em espécies de pássaros, inclusive em psitacídeos era determinada por mensuração dos níveis plasmáticos Cocrem & Seddon, 1994). Ensaios baseados em amostras de sangue (soro ou plasma) mensuram o nível destes hormônios avaliados em resposta biológica imediata do animal (Wingfield et al., 1994). Contudo, o uso de avaliação sangüínea é restrito a algumas espécies, pois normalmente o animal precisa ser capturado e contido, o que, inevitavelmente acaba comprometendo a avaliação do estresse agudo, devido à elevação dos níveis plasmáticos dos hormônios ligados ao estresse (Cook et al., 2000).

Devido à necessidade de contenção extrema e a intensa alteração endócrina conseqüente, este tipo de abordagem endócrina não é adequada para a avaliação dos indicadores endócrinos de estresse em animais selvagens. Em adição, a amostra sangüínea pontual produzida pode não ser representativa para análises de níveis hormonais para um longo tempo, devido a padrões de secreção pulsátil dos glicocorticóides no sangue (Harper & Austad, 2000).

Uma abordagem empregada na coleta sangüínea em animais selvagens é a sedação ou a anestesia geral. Estes procedimentos, apesar de relativamente seguros, podem interromper temporariamente a dinâmica da secreção hormonal, amplitude do pulso e freqüência (Johnson & Gay, 1981), o que também levará a conclusões errôneas.

De acordo com Brown & Wildt (1997) o uso de anestesia no intervalo peri-ovulatório para colheita sangüínea em felídeos selvagens é contra-indicado porque os dados subseqüentes do hormônio podem estar comprometidos.

Portanto, para Brown et al. (1993) utilizar métodos com amostragem por coleta de sangue não é prático para espécies não domésticas, em substituição deve-

se fazer o uso de técnicas não invasivas para avaliar a função reprodutiva e os indicadores endócrinos de estresse.

6.2. Métodos não-invasivos

O uso da análise de esteróides fecais demonstrou ser uma ferramenta acurada da função hormonal em pássaros domésticos. Esta técnica pode ser aplicada em aves não domésticas de cativeiro (Ishii et al., 1994) e de vida livre (Cockrem & Rounce, 1995). Além do mais, a solubilização das fezes de aves é uma técnica simples, fornecendo material que pode ser analisado por radioimunoensaio (RIA) (Cockrem & Rounce, 1995) ou ensaio imunoenzimático (EIA) (Tell, 1997).

Métodos não invasivos para quantificar o estresse estão sendo desenvolvidos e aplicados em estudos de vertebrados, os quais oferecem diversas vantagens sobre os métodos invasivos. Os ensaios feitos com metabólitos fecais de hormônios estão sendo agora utilizados em uma variedade de áreas (ciência animal, ecologia comportamental, biologia conservacionista, ornitologia e primatologia) para examinar o *status* reprodutivo e adrenocortical (Dehnhard et al., 2001).

Estes métodos não invasivos são, em particular, usados porque amostras podem ser facilmente obtidas sem incômodo ao animal e sem colocá-lo em perigo durante a captura (Wasser et al., 2000). Conseqüentemente, amostras podem ser coletadas em intervalos regulares ao longo do tempo. Por não causar incômodo ao animal, técnicas não invasivas podem suprir uma avaliação acurada do estresse sem a influência do aumento nos glicocorticóides induzidos pela captura. Portanto, os ensaios feitos com metabólitos fecais de glicocorticóides refletem um nível médio destes hormônios circulantes por um período de tempo, melhor que uma amostra pontual, e por isso pode prover uma avaliação mais acurada de um longo tempo de seus níveis (Harper & Austad, 2000).

Métodos não-invasivos de análise de hormônios ligado ao estresse e a reprodução, realizados através das fezes, urina e saliva, têm demonstrado uma importante ferramenta para o monitoramento do bem-estar dos animais (Wasser et al. 2002; Dehnhard et al., 2003; Lundberg, 2005; McKenzie & Deane, 2005).

Nas fezes há uma grande quantidade de metabólitos de hormônios esteróides, como os andrógenos, estrógenos e progestágenos; glicocorticóides como os corticosteróides, cortisol e dehidroepiandrosterona e mineralocorticóides. Os hormônios protéicos, de alto peso molecular, como os luteinizantes e o hormônio

do crescimento são destruídos no intestino e vão para a urina, não podendo ser avaliados nas fezes. Em adição, hormônios de baixo peso molecular, como os tireóideos e prostaglandinas, são grupos pouco estudados e apresentam-se nas fezes (Wasser et al., 2002).

A variação da excreção dos hormônios esteróides pela urina e fezes varia conforme a espécie e o hormônio a ser avaliado (Palme et al., 1996 apud Wasser et al., 2002), devendo levar em conta possíveis contaminações ao avaliar as amostras (Wasser et al., 2002).

Morato et al. (2004) em estudos com jaguares machos demonstraram que a determinação dos metabólitos fecais de cortisol e andrógenos podem ser muito útil para um acesso não invasivo do bem-estar animal além de complementar estudos comportamentais, fisiológicos e patológicos. Ainda para os mesmos autores essas técnicas são importantes para avaliar condições de moradia, manejo ou outros procedimentos de manipulação que podem afetar a reprodução e/ou o status fisiológico geral de animais de cativeiro.

O monitoramento dos hormônios por métodos não invasivos proporcionou o entendimento da biologia reprodutiva de animais e que esta é uma das mais poderosas ferramentas de avaliação em zoológicos atualmente (Brown & Wildt, 1997).

A amostra fecal, ao contrário da amostra sangüínea, representa níveis de metabólitos hormonais de períodos longos, conseqüentemente refletindo o mínimo de oscilações, o conflito entre a dinâmica secretória normal e uma resposta fisiológica é improvável. Outra vantagem desta técnica é a de que os cientistas não têm um número limitado de amostras, as amostras podem ser coletadas por diversas vezes e por tempo indeterminado (Brown & Wildt, 1997).

Amostras fecais são mais fisiológicas, mais estáveis por um tempo maior quando armazenadas em temperaturas abaixo de zero (Whitten et al., 1998).

Brown e Wildt (1997) afirmaram que o monitoramento por metabólitos esteróides nas fezes habilita a avaliação do estado de puberdade, pois o início da atividade gonadal esteroidogênica é associada com o estabelecimento e manutenção da gametogênese; determinação da incidência de ovulação espontânea versus induzida; previsão de parição, identificação de prenhez e caracterização de período pós-parto; identificação de causas de inatividade reprodutiva (senescência reprodutiva) ou hiperatividade, incluindo várias patologias como cistos foliculares e

retenção de corpo lúteo; melhora de tratamentos com gonadotrofina exógena usada na reprodução assistida, por exemplo, determinando se o tratamento em particular resultou em uma resposta ovariana normal ou anormal; avaliação do nível do estresse fisiológico como uma ferramenta para avaliar e melhorar o habitat com a finalidade de aumentar o bem-estar e também o potencial reprodutivo; e comparações entre espécies para estudo da conservação e evolução de mecanismos reprodutivos.

6.2.1. Corticosteróides:

A concentração plasmática de glicocorticosteróides é um indicador de estresse confiável, acurado e preciso (Beuving & Vonder, 1986 apud Dehnhard et al., 2003), pois suas concentrações elevam-se rapidamente, em aproximadamente 3 a 5 minutos, após contenção e manipulação (Wingfield & Romero, 2001 apud Romero, 2004).

Para Denhard et al. (2003) o método não invasivo para mensurar metabólitos fecais de glicocorticóides nas fezes de galinhas foi estabelecido e validado. Em seus experimentos com galinha, corvo marinho e falcão, determinou as concentrações de corticosterona no plasma e seus metabólitos nas fezes.

Dehnhard et al. (2003) revisaram que em patos (*Anas platyrhynchos*) e galinhas (*Gallus domesticus*) os corticosteróides circulantes são metabolizados pelo fígado, apresentando meia-vida de 10 a 15 minutos, sendo excretados pelas fezes e urina. Posteriormente, observaram que em galinhas os níveis de corticosterona fecal, relacionados ao estresse, são detectados 4 horas após estimulação; os mesmos autores revisaram que há variações conforme a espécie de ave estudada.

6.2.2. Testosterona

Lee et al. (1999) em experimentos com fêmeas de psitacídeos relataram que a testosterona e o estrógeno foram liberados quase que exclusivamente nas fezes.

Morais et al. (1996), utilizando três espécies de felídeos selvagens, avaliaram pelo monitoramento não invasivo, metabólitos fecais de esteróides para gerar uma base de dados reprodutivos destas espécies. Foram pesquisados então: a ciclicidade do estro das fêmeas; a função testicular (esteroidogênica e espermática) em machos e a influência da estação do ano na atividade reprodutiva

em machos e fêmeas. Concluiu que as análises feitas com o monitoramento não invasivo por meio dos metabólitos fecais do ovário e do testículo demonstraram utilidade; em cada espécie houve influência da estação do ano na atividade reprodutiva. Apesar de muitos parâmetros terem efeitos modestos; estas informações são importantes para definir o processo reprodutivo normal, o qual prova a ajuda valiosa para melhorar as estratégias de auxílio à conservação de espécies.

Morais et al. (1997) em seus estudos com três espécies de pequenos felídeos machos, compararam a atividade adrenal com características reprodutivas, concluíram que apesar do estudo não ter estabelecido especificamente causa-efeito entre esta relação, houve uma modesta relação entre as altas concentrações fecal de corticóides e a função espermática prejudicada.

6.2.3. Progesterona e Estradiol

Diversos estudos foram feitos usando análises de metabólitos fecais de progesterona e estradiol para examinar a atividade ovariana, estas informações foram utilizadas para avaliar as possíveis causas de desempenho reprodutiva fraca em animais de cativeiro (Brown et al., 1996b).

Sockman & Scwabl (1999) em estudos com canários analisaram metabólitos fecais de estradiol e progesterona.

Brown et al. (1996b) em estudos com fêmeas de chitas (*Acinonyx jubatus*), esteróides fecais foram utilizados para avaliar eventos reprodutivos nesta espécie, para confirmar e explicar a aparente falta de ciclicidade ovariana. Em adição, um novo dado foi produzido na “regularidade” da resposta ovariana ao hormônio exógeno de indução, e ao protocolo de inseminação artificial em comparação ao perfil traçado pelo esteróide fecal nos animais prenhes e não prenhes após o acasalamento.

Czekala et al. (1994) analisaram metabólitos fecais do estradiol e progesterona para monitorar a atividade esteroidogênica de felídeos. Para Brown et al. (1996a) estes dados servem para auxiliar na reprodução assistida, pois com eles sabe-se o momento correto de fazer uma inseminação artificial, por exemplo, havendo assim menos chances de falha neste tipo de reprodução.

6.3. Interação entre os métodos:

Nos estudos de Dehnhard et al. (2003) com galinhas, corvo-marinho e falcão, a dinâmica das concentrações dos metabólitos fecais refletiu o curso da atividade biológica do hormônio no plasma. O pico do metabólito fecal acompanhou o do plasma sangüíneo com um atraso de $3,5 \pm 1,1$ h.

6.4. Cuidados com coleta e armazenagem:

Hormônios esteróides são excretados via intestinal através da bile, após clearance do sangue pelo fígado. Mudanças na dieta do animal alteram a excreção biliar, podendo incorrer em erros na avaliação. Em um estudo com babuínos, esta alteração foi eliminada através do método de congelamento a seco das amostras. (Wasser et al., 1993 apud Wasser et al., 2002). Assim é interessante um exame separado para cada *pool* de amostra fecal, de acordo com a dieta oferecida.

A longevidade dos hormônios excretados pode ser afetada pelo local de trabalho (temperatura/ umidade), pela forma de armazenagem de curto prazo (material utilizado durante o transporte da amostra – p.ex. sílica ou etanol) e pela forma de armazenagem de longo prazo (modo de conservação da amostra até a sua análise – p.ex. congelamento, secagem ou congelamento a seco). O melhor método de armazenagem varia conforme a espécie e o hormônio analisado (Wasser et al., 2002).

6.5. Análise dos hormônios:

É de fundamental importância o anticorpo escolhido para a análise das amostras, para evitar falsos positivo-negativos. Além da validação dos níveis de cortisol fecal devido a grande variabilidade de excreção com relação às espécies (Wasser et al., 2002).

Hormônios adrenal e gonadal nas fezes podem ser avaliados por técnicas de EIA (Ensaio Imunoenzimático), RIA (Radioimunoensaio), HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) (Dehnhard et al., 2003).

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

ANTAS, P. de T. Z. **Pantanal: guia de aves**. Rio de Janeiro: SESC, 2004. 246p.

Assessoria de Comunicação Social WWF Brasil. <Disponível em: http://www.agirazul.com.br/a2/_a2/000001e2.htm> Acesso em: 18 mar. 2006.

Animais em extinção.<Disponível em: <http://www.suapecquisa.com/animais>>. Acesso em: 03 abr. 2007.

BAHR JM, JOHNSON PA. 1991. Reproduction in poultry. In: CUPPS, PT (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. 3 ed. New York:: Academic Press, 1991. p. 555-575.

BALL, G.F.,. Endocrine mechanisms and the evolution of avian parental care, In: Bell, B. (Ed.), **Acta XX Congressus Internationalis Ornithologici**, Wellington: New Zealand Ornithological Trust Board, 1991. p. 984–991.

BERGER, J.; TESTA, J.W.; ROFFE, T.; MONFORT, S.L. Conservation endocrinology: a noninvasive tool to understand relationships between carnivore colonization and ecological carrying capacity. **Conserv. Biol.**, v.13, p.980–989, 1999.

BLUHM, C. K.; PHILLIPS, R. E.; BURKE, W. H. Serum levels of luteinizing hormone, prolactin, estradiol and progesterone in laying and nonlaying mallards (*Anas platyrhynchos*). **Biol. of Rep.**, n. 28, p. 295-305, 1983.

BROWN, J.L.; WASSER, S.K.; HOWARD, J.; ELLS, ; LANG, K.; COLLINS, L. Development and utility of fecal progesterone analysis to asses reproductive status en felids. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 273-276, 1993.

BROWN, J.L.; WILDT, D. E.; WIELBNOWSKI, N.; GOODROWE, K.L.; GRAHAM, L.H.; WELLS, S.; HOWARD, J.G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p.337-346, 1996(a).

BROWN, J.L.; TERIO, K.A.; GRAHAM, L. H. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 425-434, 1996 (b).

BROWN, J.L.; WILDT, D. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. **Int Zoo**, v.35, p.173-191, 1997.

BURKE, W. H. Effects of an in ovo injection of an antiandrogen on embryonic and posthatching growth of broiler chicks. **Poultry Sci.**, n. 75, p. 648-655, 1996.

CHASTEL, O.; LACROIX, A.; WEIMERSKIRCH, H; GABRIELSEN, G.W. Modulation of prolactin but not corticosterone responses to stress in relation to parental effort in a long-lived bird. **Hormones and Behavior**, v.47, p.459-466, 2005.

COCKREM, J.F; ROUNCE, J. R. Non-invasive assessment of annual gonadal cycle in free-living kakapo (*Strigops habroptilus*) using fecal steroid measurements. **Auk.**, v. 112, p. 253-257, 1995.

COCKREM, J.F; SEDDON, P. J. Annual cycle of sex steroids in the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) on south island, **J. Gen. Comp. Endocrinol**, New Zeland., v. 94, p. 113-121, 1994.

COCKREM, J.F.; ISHII, S. Conservation endocrinology—A new field of comparative endocrinology. In: KWON, H.B.; JOSS, J.M.P.; ISHII, S. (Eds.), **Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology.**, Kwangju, Korea: Hormone Research Center, 1999, p. 413–418.

COCKREM, J. F. Conservation and behavioral neuroendocrinology. **Hormones and Behavior**, v. 48, p. 492-501, 2005.

COOK, C. J.; MELLOR, D. J.; HARRIS, P. J.; INGRAM, J. R.; MATTHEWS, L. R. Hands-on and handas-off measurement of stress. In: MOBERG, G. P.; .MENCH, J.A. (Eds), **The biology of animal stress**, New York, New York: Cabi Publishing, p. 123-146, 2000.

COOPER,T. R.; TRUNKFIELD, H.R.; ZANELLA, A. J.; BOOTH, W. D. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. **J. Endocrinol.**, v. 123, p. 13-16, 1989.

COSTA, R.G.A. Comércio ilegal de aves silvestres em Fortaleza, Ceará. **Atualidades Ornitológicas**. n. 125, p. 3, 2005.

CZEKALA, N.M., DURRANT, B.S., CALLISON, L., WILLIAMS, M., MILLARD, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetahs. **Zoo Biology**, v. 13, p. 119-128, 1994.

CZEKALA, N.M.; McGEEHAN, L.; STEINMAN, K.J.; XUEBING, L.; GUAL-SILL, F.. Endocrine monitoring and its application to the management of the giant panda. **Zool. Biol.**, v. 22, p.389– 400, 2003.

DEHNHARD, M., SCHREER, A., KRONE, O., JEWGENOW, K., KRAUSE, M. and GROSSMANN, R. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative Endocrinology**, v.131, p.345–352, 2003.

DEHNHARD, M.; CLAUSS, M.; LECHNER-DOLL, M.; MEYER, H. H. D.; PALME, R. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 123, p. 111-120, 2001.

DEVELEY, P.F. Métodos para estudos com aves. In: **Métodos de Estudo em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. Paraná: Editora UFPR, 2003, Cap6, pp. 153-168.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 49, p. 451-461, 1995.

Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção, Sobre-explotadas ou Ameaçadas de Sobreexploração<Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/>. Acesso em: 03 abr 2007.

FRISCH, J.D. Aves brasieliras. São Paulo: Dalgas. Ecoltec.,1981.353p.

GOOD, T.; KHAN, M.Z.; LYNCH, J.W. Biochemichal and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in Oldfield mice (*Peromycus polionotus*). **Physiology & Behavior**, v.80, p.405-411, 2003.

GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In : Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds) **Williams' Textbook of Endocrinology**, 9ed. Philadelphia: Saunders, p 819–875, 1998.

GUEDES, N.M.R. Projeto arara azul dez anos de pesquisa e conservação. Apresentação na **1ª Conferência Sul Americana Sobre o Comércio Ilegal de Fauna Silvestre**. 17 a 21 de agosto. Brasília, Brasil. 2001

GUSSONI, C.O.A. Registro de reprodução do papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) na cidade de São Paulo. **Boletim do Centro de Estudos Ornitológicos**, São Paulo n. 15, jan. 2003

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**, Barueri-SP: Manole, 2004

HARPER, J.M.; AUSTAD, S. N. Fecal Glucocorticoids: A Noninvasive Method of Measuring Adrenal Activity in Wild and Captive Rodents. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, p. 12-22, 2000.

HAY, M.; MORMÈDE, P. Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and symphatoadrenaxis activity. **Vet Res**, v. 29, p. 119-128, 1998.

ISHII, S. WADA, M.; WAKABAYASHI, S.; SAKAI, H.; KUBODERA, Y.; YAMAGUCHI, N.; KIKUCHI, M. Endocrinological studies for artificial breeding of the japanese ibis (*Nipponia Nippon*), an endangered avian species in Asia. **J. Biosci.**, v. 19, p. 491-502, 1994.

IUCN <Disponível em: <http://www.iucn.org>> Acesso em: 18 mar 2006.

JOHNSON, L.M.; GAY, V. L. Luteinizing hormone in the cat. II. Mating-induced secretion. **Endocrinology**, v. 109, n.1, p. 247-252, 1981.

JOHNSON, P. A. Reprodução de aves. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2006.

LEE, J.; TELL, L.; LASLEY, B. A comparison of sex steroid hormone excretion and metabolism by psittacine species. **Zoo Biol.** n. 18, p. 247-260, 1999.

LIMA, P. C. Aves da pátria da Leiri. 1ª ed, Salvador: AO. 2004 <Disponível em: <http://www.ao.com.br/>> Acessado em: 12 nov 2007.

LINK, D. Reprodução do papagaio charrão, *Amazona petrei* (aves: psittacidae) em cativeiro. **Ciência Florestal**, n.1, v.7, p. 127-131, 1997.

Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção.<Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>> Acesso em: 26 abr. 2007.

LOPES, J.C.A. Operações de fiscalização da fauna: análise, procedimentos e resultados. In: RENCTAS (Ed.) **Animais silvestres – vida à venda**, Brasília: Dupligráfica,. p. 15-49, 2002

LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p.1017–1021, 2005.

McKENZIE, S., DEANE, E.M. Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.140, p.81– 87, 2005.

MIKAMI, S. Immunocytochemistry of the avian hipotalamus and adenohypophysis. **Int. Rev. Cytol.** v. 103, p. 189-248, 1986.

MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; MORAIS, W.; MUCCIOLO, R.G.; LACERDA, O.; GOMES, M. L. F.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L.H. ; BROWN, J. L.. Testicular and ovarian function in South America felids assessed by fecal steroids. **Proc. American Association of Zoo Veterinarians**, p. 561-565, 1996.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R. G.; GOMES, M.L.F. LACERDA, O.; MORAES, W.de; MOREIRA, N.; SWANSON, W.F., BROWN, J.L. Adrenal activity by fecal corticoids and male reproductive traits en three south American felid species. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 220-223, 1997.

MORATO, R.G.; BUENO, M. G.; MALMHEISTER, P.; VERRESCHI, I. T.N.; BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, p. 1903-1907, 2004.

NASCIMENTO, J. L.X. Estudo comparative da avifauna em duas Estações Ecológicas da Caatinga: Aiuaba e Seridó. **Melopsittacus**. v. 3, n. 1, p. 12-35, 2000.

NOTTEBOHM, F., A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. **Science** v. 214, p.1368–1370, 1981.

PEREIRA, G.A.; BRITO, M.T. de. Diversidade de aves silvestres brasileiras comercializadas nas feiras livres da região metropolitana do Recife, Pernambuco. *Atualidades Ornitológicas*, n. 126, jul.-ago, 2005, p. 14.
<Disponível em:
http://www.cepan.org.br/docs/publicacoes/artigos/artigos_comercio_animais_pe.pdf> Acesso em: 21 out. 2007.

Pottinger, T. G.. The impact of stress on animal reproductive activities. In Balm, P. H. M., (Ed.) **Stress Physiology**. Sheffield: Sheffield University Press, 1999. p. 130– 177.

RENCTAS, Disponível em : < www.renctas.org.br > Acessado em: 07 set. 2005.

RODRIGUES, M.; CARRARA, L. A.; FARIA L. P.; GOMES, H. B. Aves do Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 22, n. 2, p.326-338, 2005.

ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **TRENDS in Ecology and Evolution**., v.19, n.5, 2004.

SAPOLSKY, R.M. Neuroendocrinology of the stress response. In: Becker, J.B. *et al.*, (Eds) **Behavioral Endocrinology** Massachusetts: Institute of Technology Press, 1992. p. 287–324,.

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. Enfermidades do sistema reprodutor. In: BERCHIERI JÚNIOR, MACARI, A. (Eds.) **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 81-128..

SICK, H. **Migrações de aves na América do Sul Continental**. Brasília: Cemave., 1983.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

SIGRIST, T. **Aves do Brasil**. 2ed. São Paulo: Editora Avis Brasilis. 2006.

SILVA, W.A.G.; REGO, P.S. do. Conservação do soldadinho do Araripe *Antilophia bokermanni* (Aves Piripidae). Subsídios para elaboração do plano de manejo. Recife: **Observadores de Aves do Pernambuco**; Curitiba: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. p. 31, 2004.

SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset incubation in canaries. **General and Comparative Endocrinology**. n. 114, p. 257-268. 1999.

STOEBEL, D. P.; MOREG, G. P. Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows. **J. Dairy Sci.** v. 65, p. 1016-1024, 1982.

TELL, L. Excretion and metabolic fate of radiolabel estradiol and testosterone in the cocktail (*Nymphicus hollandicus*). **Zoo Biol.**, v. 16, p. 505-518, 1997.

WAGNER, W. C.; STROHBEHN, R. E.; HARRIS, P. A. ACTH, corticoids and luteal function in heifers. **J. of Anim. Sci.**, v.35, n. 4, p.281-288, 1972.

WASSER, S. K., HUNT, K. E., BROWN, J. L., COOPER, K., CROCKETT, C. M., BECHERT, U., MILLSPAUGH, J. J., LARSON, S. and MONFORT, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic

mammalian and avian species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, n.120, p.260–275, 2000.

WASSER, S.K., HUNT, K.E., CLARKE, C.M. Assessing Stress and Population Genetics Through Noninvasive Means. In: Conservation Medicine - **Ecological Health in Practice** Oxford University Press. 2002, Cap 11, p. 131-144.

WEBB, J. Prosecuting wildlife traffickers important cases, many tools, good results. Apresentação na 1ª **Conferência Sobre o Comércio Ilegal da Fauna Silvestre**. 17 a 21 de agosto. Brasília, Brasil, 2001.

WINGFIELD, J.C., Ball, G.F., DUFTY, J.A.M., HEGNER, R.E., RAMENOFISKY, M., Testosterone and aggression in birds. **Am. Sci.**, v. 75, p.602–608, 1987.

WINGFIELD, J.C. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In: Davey, K.G. et al (Eds) **Perspectives in Comparative Endocrinology**, National Research Council, p. 520- 528, 1994.

WHITTEN, P.L.; BROCKMAN, D.K.; STAVISKY, R.C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 107, p. 1-23, 1998.

YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. **J. of Reprod. And Development**, v. 51, n. 1, 2005.

ZADWORNÝ, D.; KANSÁKU, N.; BÉDÉCARRATS, G.; GUÉMÉNÉZ, D.; KUHNLEIN, U. Prolactin and its Receptor in Galliformes. **Proceedings of the International Congress on Bird Reproduction**, Tours, September, p. 223-228, 1999.

CAPÍTULO 2

“Determinação de metabólitos de progesterona nas excretas de papagaio verdadeiro (*amazona aestiva*) após desafio com ACTH”

Este artigo científico está escrito de acordo com as normas para publicação na revista **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, exceto a apresentação das figuras e tabelas.

Determinação de metabólitos de progesterona nas excretas de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) após desafio com ACTH

(Determination of progesterone metabolite on the excreta of blue-fronted amazons (*Amazona aestiva*) after ACTH challenge)

Ana Livia Rocha Monteiro Chaves¹, Caroline Junko Fujihara¹, Wolff Camargo Marques Filho¹, Eunice Oba¹, João Carlos Pinheiro Ferreira¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, CEP 18.618-000, Distr de Rubião Júnior, Botucatu, SP, Brasil

Correspondência: analiviarm@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da administração de ACTH nos níveis fecais de progesterona em Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*). Foram utilizados 8 papagaios verdadeiro, sendo 4 machos e 4 fêmeas, sexados por amostra de DNA por PCR. Fez-se dois dias de coleta tendo 7 dias de intervalo entre eles. Aplicou-se, no primeiro dia, 0,2 mL de solução fisiológica em 2 machos e 2 fêmeas (grupo controle) e nos outros 2 machos e nas outras 2 fêmeas solução de ACTH (25 UI/animal) (grupo tratamento). No segundo dia os grupos foram trocados, os papagaios que foram grupo controle passaram a ser grupo tratamento e os que foram tratamento passaram a controle. Em cada dia coletou-se as fezes a cada 1 hora durante 10 horas. Este material foi armazenados em criotubos e congelados a -20° C para posterior análise. As fezes foram liofilizadas. A progesterona foi extraída e depois analisada por radioimunoensaio no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da UNESP- Botucatu. A investigação do comportamento das variáveis estudadas, referente aos tratamentos aplicados, foi analisada como um delineamento crossover, sendo que para as dosagens hormonais, a média dos machos e das fêmeas foi observada em um período (horário), constituindo uma parcela principal. A análise estatística foi efetuada por meio do programa GLM (SAS, 1985) e as conclusões obtidas basearam-se ao nível de 5% de significância pelo teste F e de Tukey. Foi também feita a estatística descritiva, para todos os indivíduos, pelo cálculo das médias e dos desvios padrão. Houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratamento, sendo que o grupo controle teve os níveis de metabólitos de progesterona mais altos, quando os indivíduos foram analisados conjuntamente ou quando se analisou apenas os machos. Quando se analisou apenas os indivíduos fêmeas não houve diferença significativa entre os animais que foram do grupo controle dos que foram do grupo tratamento.

Palavras-chave: papagaio verdadeiro, progesterona, radioimunoensaio, ACTH

Abstract

The aim of this study was to examine the effect of the infusion of ACTH in the progesterone fecal levels in blue-fronted amazons (*Amazona aestiva*). It was used 8 blue-fronted amazons, being 4 females and 4 males, sexing for a sample of DNA for PCR. It has been made two days of sampling, taking 7 days of interval between the days. It was applied, on the first day, 0,2 ml of saline solution in 2 males and 2 females (control group) and in the other 2 males and the other 2 females ACTH solution (25 IU/animal) (treatment group). On the second day the groups have been exchanged, the blue-fronted amazons that were control group became the treatment group and the ones that were treatment became control group. In each day, it has been collected the feces every 30 min. for 10 hr. This material was stored in cryotubes and frozen at -20 °C for further analysis. The feces were dried. The progesterone was extracted and after

analyzed by radioimmunoassay in Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da UNESP – Botucatu. The statistical analysis was made using the program GLM (SAS, 1985) and the conclusions obtained based (to the level of 5% of significance by the test F and the Tukey. It was also made the descriptive statistics, for all individuals, by the calculation of mean and standard deviation. There was statistical difference between control group and treatment group, but the control group had the highest levels of progesterone metabolites when the individuals were analyzed jointly or when examined only the males. When examined only females, there was no significant difference between control and treatment group.

Keywords: blue-fronted amazons, progesterone, radioimmunoassay, ACTH

Introdução

Apesar da preocupação mundial com a conservação dos animais selvagens se observa um grande número destes em risco de extinção (Lopes, 2002).

No Brasil, de acordo com a nova lista do Ministério do Meio Ambiente, das cerca de 370 espécies de animais extintas ou em vias de extinção, 43% são aves (<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>, acessado em 26/04/2007), entre as quais se destaca o *Amazona aestiva*, por ser um dos papagaios mais procurados para servir de animal de estimação (Sick, 1997).

Esta realidade alerta para a necessidade do desenvolvimento e implantação de programas voltados à conservação de animais ameaçados de extinção e, conseqüentemente, para propiciar conservação das espécies, por meio de ações que promovam a procriação e criem condições para a sobrevivência das populações de vida livre em suas regiões de origem (Cockrem, 2005).

Contudo, para que os programas delineados tenham o efeito desejado, existe a necessidade de um profundo conhecimento dos processos fisiológicos e patológicos relacionados às espécies objeto desses programas. Entre os diversos sistemas corporais sujeitos a intensa investigação, destaca-se o endócrino, por sua função coordenadora de processos corporais relacionados ao crescimento, à reprodução e às respostas relacionadas às interações como meio ambiente (Cockrem, 2005).

Entretanto, a avaliação dos níveis plasmáticos dos diversos hormônios, apresenta, nos animais selvagens, importantes restrições relacionadas, principalmente a necessidade de contenção, que desencadeia alterações hormonais suficientemente intensas para inviabilizar a correta interpretação dos valores determinados. Para suplantar essa dificuldade, vêm sendo desenvolvidas técnicas de monitoramento não invasivo das concentrações hormonais, especialmente por meio da dosagem de esteróides fecais, extensivamente usada para acessar a função reprodutiva e o estresse em animais selvagens (Cockrem, 2005).

O estudo dos níveis plasmáticos e fecais dos hormônios relacionados ao eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, principalmente cortisol e corticosterona, considerados importantes indicadores de estresse, respectivamente, em mamíferos e aves, vem fornecendo informações importantes para a avaliação de animais em cativeiro e em vida livre.

Não existem nas aves estudos que sinalizem que os níveis plasmáticos e fecais de progesterona se elevem em situações de estresse ou após desafio com ACTH.

O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração fecal de progesterona em Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*) após a administração intramuscular de ACTH.

Material e Métodos

Durante os mês de junho de 2007, fora da estação de reprodução, foram selecionados 15 papagaios verdadeiro (*Amazona aestiva*) hígidos, adultos de idades variadas, identificados com anilha de centros de Triagem, oriundos de apreensões feitas pela Polícia Ambiental do Estado de São Paulo e recebidas pelo Projeto de Reabilitação e Soltura de Animais Silvestres do Centrofauna (Instituto Floravida-Anidro), no município de Botucatu-SP.

Após a sexagem dos animais, realizada pela técnica de PCR, empregando-se o material do canhão da pena colhido 15 dias após o seu arrancamento, 8 aves escolhidas ao acaso (4 machos e 4 fêmeas) foram divididas em dois grupos, Grupo Controle e Grupo Tratamento, cada um constituído por 2 machos e 2 fêmeas.

Doze horas antes do início do experimento, no final da tarde do dia anterior, os animais foram removidos do viveiro coletivo, acondicionados em gaiolas individuais forradas com plástico e transportados para uma sala onde permaneceram até a manhã seguinte.

Inicialmente, na manhã seguinte, foi realizada a colheita das fezes produzidas durante a noite e em seguida os animais dos grupos controle e tratamento receberam, respectivamente 0,2 mL solução salina (0,9% de NaCl) e 25 UI de ACTH diluídos em 0,2 mL de solução salina por via injetável no músculo peitoral.

Após a administração das soluções, a cada hora durante 10 horas, as fezes produzidas em cada gaiola foram colhidas, acondicionadas em criotubos, que permaneceram resfriados por até 10 horas a 5°C e em seguida armazenadas em freezer a -20°C.

Sete dias após a realização do experimento, este foi repetido invertendo-se os grupos experimentais; o grupo controle passou a ser o grupo tratamento e o grupo tratamento passou a ser o grupo controle, caracterizando um delineamento experimental do tipo *crossover*.

Antes da determinação da concentração fecal de progesterona, as fezes foram liofilizadas e novamente armazenadas a -20°C.

A extração hormonal foi realizadas diluindo-se 0,05 g de fezes em 1 mL de metanol a 80% em um tubo de ensaio que foi hermeticamente fechado e agitado em *vortex*. Posteriormente, o tubo foi acondicionado em misturador mecânico (agitador Klini), onde permaneceu por 12 horas, sendo em seguida centrifugado a 1.710 x g por 15 min e o sobrenadante foi transferido para microtubos e armazenado em freezer a -20°C.

A dosagem da progesterona fecal foi feita pela técnica de radioimunoensaio (RIA), empregando-se o Kit comercial (DPC Medlab®, Los Angeles, CA, USA), no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia veterinária da FMVZ - UNESP - Botucatu.

A investigação do comportamento das variáveis estudadas, referente aos tratamentos aplicados, foi analisada como um delineamento *crossover*, sendo que para as dosagens hormonais, para a média dos machos e das fêmeas que foi observada em um período (horário), constitui uma parcela principal. A análise estatística foi efetuada por meio do programa GLM (SAS, 1985) e as conclusões obtidas basearam-se ao nível de 5% de significância pelo teste F e de Tukey. Foi também feita a estatística descritiva, para todos os indivíduos, pelo cálculo das médias e dos desvios padrão.

Resultados

Quando os animais foram agrupados de acordo com o sexo, nos machos o grupo controle apresentou maiores concentrações fecais médias de progesterona que o grupo

tratamento, sendo os maiores valores observados 4, 6 e 10 horas após a aplicação da solução fisiológica para os animais do grupo controle e 8 horas após a administração de ACTH no grupo tratamento (tabela 1 e figura 1).

Esse comportamento não foi observado nas fêmeas onde o grupo controle e tratamento apresentaram valores semelhantes. Os maiores valores foram observados 1 e 10 horas após a aplicação da solução fisiológica para os animais do grupo controle e 4 e 8 horas após a administração de ACTH no grupo tratamento (tabela 1 e figura 2).

Quando os dados de todos os indivíduos, independente do sexo, foram agrupados de acordo com o grupo experimental, a semelhança do observado nos machos, o grupo controle apresentou maiores concentrações fecais de progesterona que o grupo tratamento. Os maiores valores foram observados 1, 3, 6 e 10 horas após a aplicação da solução fisiológica para os animais do grupo controle e 4 e 8 horas após a administração de ACTH no grupo tratamento (tabela 1 e figura 3).

Tabela 1. Valores médios (desvios padrão) da concentração fecal de progesterona (ng.g^{-1}) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, nos animais dos grupos controle e tratamento, agrupados de acordo com o sexo.

Horas	Fêmeas		Machos		Geral	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	*	123,71 (133,78)	*	26,57**	*	91,33 (109,97)
1	727,16 (534,81)	28,20**	51,83 **	85,91**	501,76 (543,29)	57,06 (40,80)
2	388,70 (307,74)	263,90**	35,54 **	*	318,07 (309,80)	263,9**
3	479,08 (494,01)	347,60**	546,13 (780,94)	51,67 (19,27)	512,61 (585,59)	149,31 (172,16)
4	244,40 (68,83)	599,81 (886,73)	604,82 (656,24)	141,78 (138,75)	388,57 (386,01)	370,8 (620,61)
5	196,72 (133,62)	154,25**	411,22 (103,63)	148,57 (32,58)	282,53 (159,43)	150,47 (23,27)
6	223,02 (169,19)	184,25 (235,40)	583,37 (251,63)	67,86 (40,52)	367,16 (262,86)	117,74 (152,19)
7	157,76 (108,09)	139,48 (112,05)	329,68 (70,18)	194,96 (270,72)	255,10 (121,66)	172,77 (201,76)
8	73,40 (60,70)	283,20 (284,97)	233,07 (23,22)	368,18 (381,81)	141,83 (96,47)	325,69 (315,19)
9	272,24 (173,37)	30,39 (19,92)	216,79 (136,64)	305,31 (392,75)	244,51 (147,51)	167,85 (296,43)
10	641,33 (622,25)	41,62**	563,77 (783,15)	75,35 (48,00)	594,79 (636,61)	68,60 (44,22)

*sem produção fecal, **produção fecal por apenas um animal

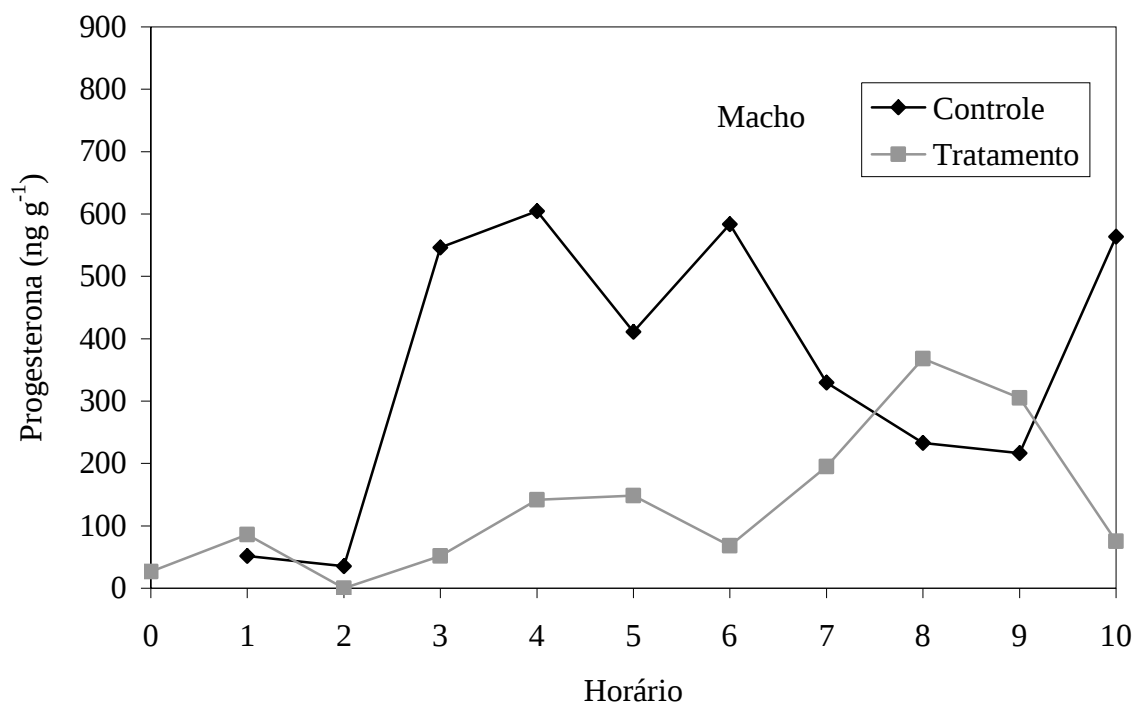


Figura 1: Valores médios da concentração fecal de progesterona (ng.g⁻¹) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, nos machos dos grupos controle e tratamento.

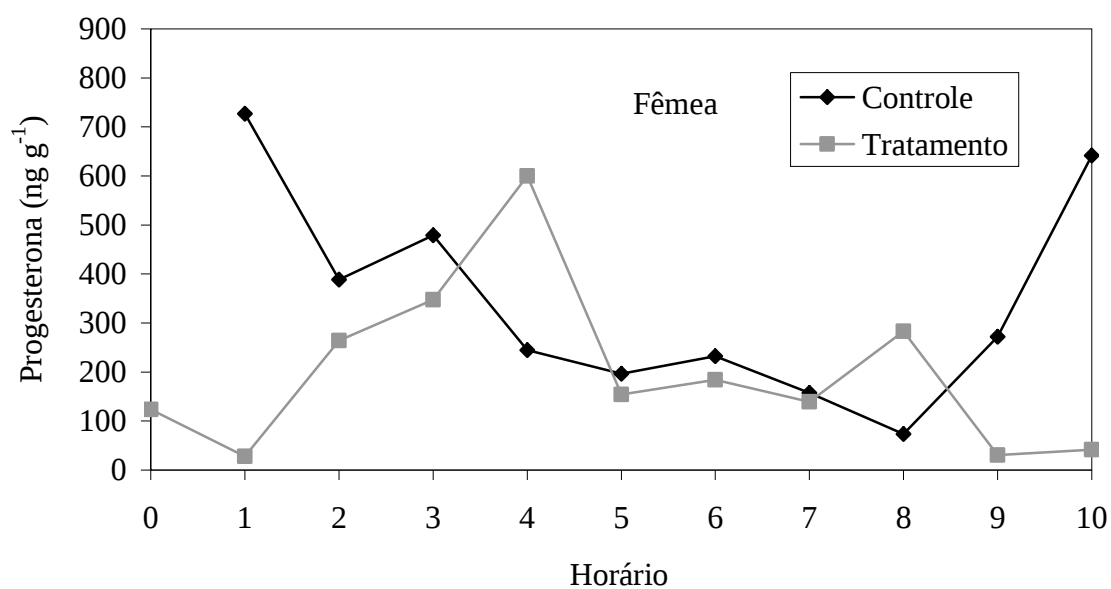


Figura 2: Valores médios da concentração fecal de progesterona (ng.g⁻¹) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, nas fêmeas dos grupos controle e tratamento.

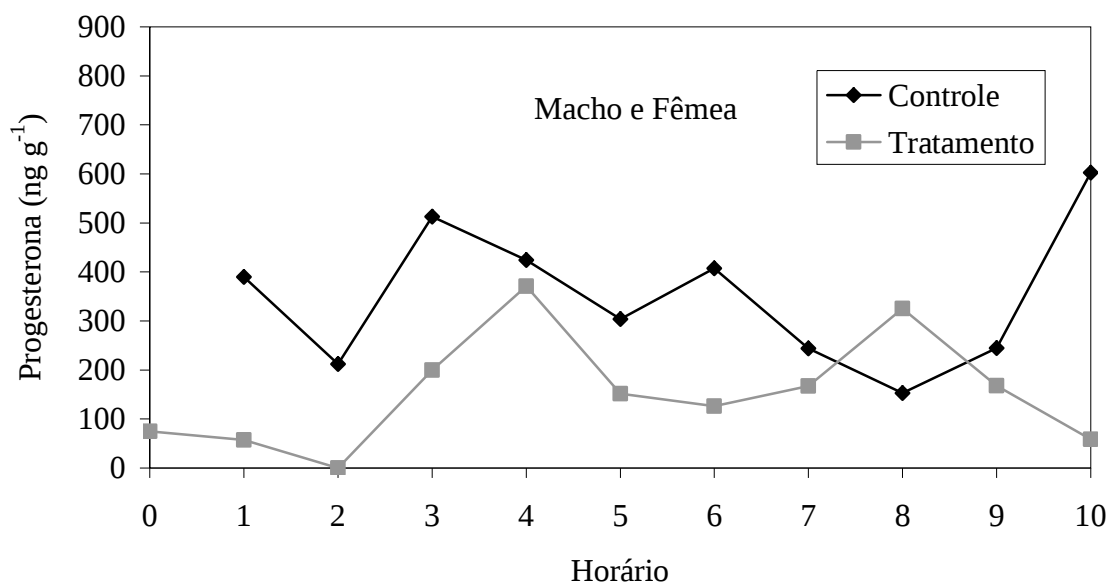


Figura 3: Valores médios da concentração fecal de progesterona (ng.g^{-1}) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), em diferentes momentos após a administração intramuscular de solução fisiológica ou ACTH, respectivamente, em todos os indivíduos (machos e fêmeas) dos grupos controle e tratamento.

Discussão

Observa-se, nos resultados encontrados que os valores médios da concentração fecal de progesterona elevaram-se nas primeiras horas do período experimental tanto no grupo controle quanto no grupo tratamento e, portanto, não foi possível relacionar esse comportamento apenas com a administração de ACTH; contudo, não se excluiu a influência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos resultados.

Nos bovinos, desde 1972 a adrenal vem sendo estudada como uma possível fonte de progesterona em situações de estresse (Wagner et al, 1972), por meio de desafios com ACTH. Entretanto, a interpretação adequada dos resultados do presente estudo fica prejudicada em função do limitado número de estudos e, consequentemente, de informações sobre a fisiologia dos animais da Ordem dos Psitaciformes (Bercovitz et al., 1979 apud Lee et al., 1999; Lee et al., 1999).

Levando-se em consideração que os animais empregados estavam fora da estação de reprodutiva e que metade destes eram machos, a progesterona fecal encontrada nos animais provavelmente foi secretada por uma fonte extra-gonadal: possivelmente a adrenal.

Diversos fatores reforçam essa hipótese: o primeiro deles está relacionado aos procedimentos de manejo a que os animais foram submetidos durante a realização do estudo. No fim da tarde do dia anterior, 12 horas antes do início do experimento, os papagaios foram, um a um, capturados e retirados de seu ambiente de permanência usual, viveiro coletivo, e colocados em gaiolas individuais. Na manhã seguinte, os animais foram novamente apanhados e contidos para a realização das injeções intramusculares. O conjunto de procedimentos realizados, que não estavam incorporados à rotina dos animais, portanto, pode ter desencadeado a liberação de ACTH endógeno e, consequentemente, estimulado a secreção adrenal de progesterona e

a subsequente elevação das concentrações fecais deste hormônio, como ocorre nos bovinos (Yoshida & Nakao, 2005).

Observando-se a figura três, que foram reunidos os valores médios de todo os animais, machos e fêmeas, dos grupos controle e tratamento, vê-se que o maior valor da excreção do metabólito de progesterona ocorreu entre 3 e 4 horas após as manipulações matinais, e que no grupo tratamento ocorreu um segundo valor elevado 8 horas após esses procedimentos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Lee et al. (1999), que estudaram a dinâmica de excreção fecal de esteróides sexuais, estradiol e testosterona, em duas espécies de psitacídeos e observaram que a partir da administração intramuscular dos dois hormônios, marcados com C14, o pico de excreção aconteceu 4 horas depois. Resultados também semelhantes foram encontrados por Denhard et al. (2003) que estudando galinha (*Gallus domesticus*), corvo marinho (*Phalacrocorax carbo*) e falcão (*Accipter gentilis*) determinaram que o pico de excreção fecal de glicocorticóides ocorreu 3,5 + 1,1 h após o pico no sangue.

Nas fêmeas, não é possível a exclusão total da progesterona fecal detectada ser também de origem ovariana, visto que apesar de as aves não formarem corpo lúteo (Mello, 1994), os folículos produzem progesterona (Hafez & Hafez, 2004; Johnson, 2006), contudo, o fato de ter sido observado o mesmo comportamento nos animais do sexo masculino, os altos valores encontrados nos dois sexos e os padrões de pico, sinalizam uma liberação aguda do hormônio e não uma produção contínua e regular como acontece na produção ovariana.

A hipótese de que a adrenal das aves secreta progesterona em situações de estresse não encontra respaldo no estudo de Bluhm et al., (1983), que observaram que fêmeas de pato real (*Anas platyrhynchos*) fora da estação de reprodução, mesmo sob estresse mantém os níveis basais de progesterona plasmática; contudo, como esses autores submeteram apenas um animal a um protocolo de indução de estresse, esses resultados devem ser interpretados com cautela e sinalizam a necessidade de novos estudos.

A partir dos resultados obtido não foi possível confirmar a hipótese de que os níveis fecal de progesterona se elevam em papagaio verdadeiro após a o desafio com ACTH, contudo, também não foi possível excluir essa possibilidade, sendo necessária a condução de estudos mais controlados, principalmente no que diz respeito a minimização do estresse nos animais experimentais, para que a resposta endócrina ao ACTH seja mais bem esclarecida.

Bibliografia

- Bluhm CK, Phillips RE, Burke WH.** Serum levels of luteinizing hormone, prolactin, estradiol and progesterone in laying and nonlaying mallards (*Anas platyrhynchos*). Biol. of Rep., n. 28, p. 295-305, 1983.
- Cockrem JF.** Conservation and behavioral neuroendocrinology. Hormones and Behavior. v. 48, p. 492-501, 2005.
- Dehnhard M, Schreer A, Krone O, Jewgenow K, Krause M, Grossmann R.** Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the

goshawk (*Accipiter gentilis*). General and Comparative Endocrinology., v.131, p.345–352, 2003.

Hafez ESE, Hafez B. Reprodução animal, Manole, Barueri-SP, 2004.

Johnson PA. Reprodução de aves. In: **Reece WO.** Fisiologia dos animais domésticos, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006

Lee J, Tell L; Lasley, B. A comparision of sex steroid hormone excretion and metabolism by psittacine species. Zoo Biol. n. 18, p. 247-260, 1999.

Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. <Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>> Acesso em: 26/04/2007.

Lopes JCA. Operações de fiscalização da fauna: análise, procedimentos e resultados. In: RENTAS (Ed.) Animais silvestres – vida à venda, Brasília: Dupligráfica,. p. 15-49, 2002.

Mello F. Fisiologia da reprodução de aves. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, 1994.

Sick H. Ornitologia brasileira. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1997.

Wagner WC, Strohbehn RE, Harris PA. ACTH, corticoids and luteal function in heifers. J. of Anim. Sci., v.35, n. 4, p.281-288, 1972.

Wasser SK, Hunt KE, Clarke CM. Assessing Stress and Population Genetics Through Noninvasive Means. In: Conservation Medicine - Ecological Health in Practice Oxford University Press. 2002, Cap 11, p. 131-144.

Yoshida C, Nakao T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. J. of Reprod. And Development, v. 51, n. 1, 2005.

APÊNDICE

Tabelas de Estatística

Tabela 2: Teste de Tukey para comparação de médias entre todos os indivíduos (machos e fêmeas), ao nível de 5% de significância, onde c é controle (aplicação de solução fisiológica) e t é tratamento (aplicação de solução de ACTH). * Estatisticamente significativo a 5%.

Variáveis	G.L	S.Q	Q.M	F	Pr>F
Horário	10	198841,2533	19884,1253	0,53	0,8560
Indivíduo	1	4972,8840	4972,8840	0,13	0,7192
Tratamento (c e t)	1	274892,8644	274892,8644	7,29*	0,0116
Resíduo	28	1055287,344	37688,834		
Total	40	1571759,853			

Tabela 3: Teste de Tukey para comparação de médias entre os indivíduos machos, ao nível de 5% de significância, onde c é controle (aplicação de solução fisiológica) e t é tratamento (aplicação de solução de ACTH). * Estatisticamente significativo a 5%.

Variáveis	G.L	S.Q	Q.M	F	Pr>F
Horário	10	247832,7175	24783,2718	0,68	0,7246
Tratamento (c e t)	1	245257,9479	245257,9479	6,68*	0,0323
Resíduo	8	293542,5515	36692,8189		
Total	19	763996,6429			

Tabela 4: Teste de Tukey para comparação de médias entre os indivíduos fêmeas, ao nível de 5% de significância, onde c é controle (aplicação de solução fisiológica) e t é tratamento (aplicação de solução de ACTH).

Variáveis	G.L	S.Q	Q.M	F	Pr>F
Horário	10	233075,2283	23307,5228	0,45	0,8860
Tratamento (c e t)	1	89789,1122	89789,1122	1,73	0,2210
Resíduo	9	467355,5560	51928,3951		
Total	20	805462,2579			

Tabela 5: Média estatística dos animais

Parâmetros	Macho e Fêmea	Macho	Fêmea
Controle	339,8551 Aa*	348,7528 Aa	333,6852 Aa
Tratamento	171,1264 Bb	115,2967 Bb	199,6784 Ba

* Letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade.

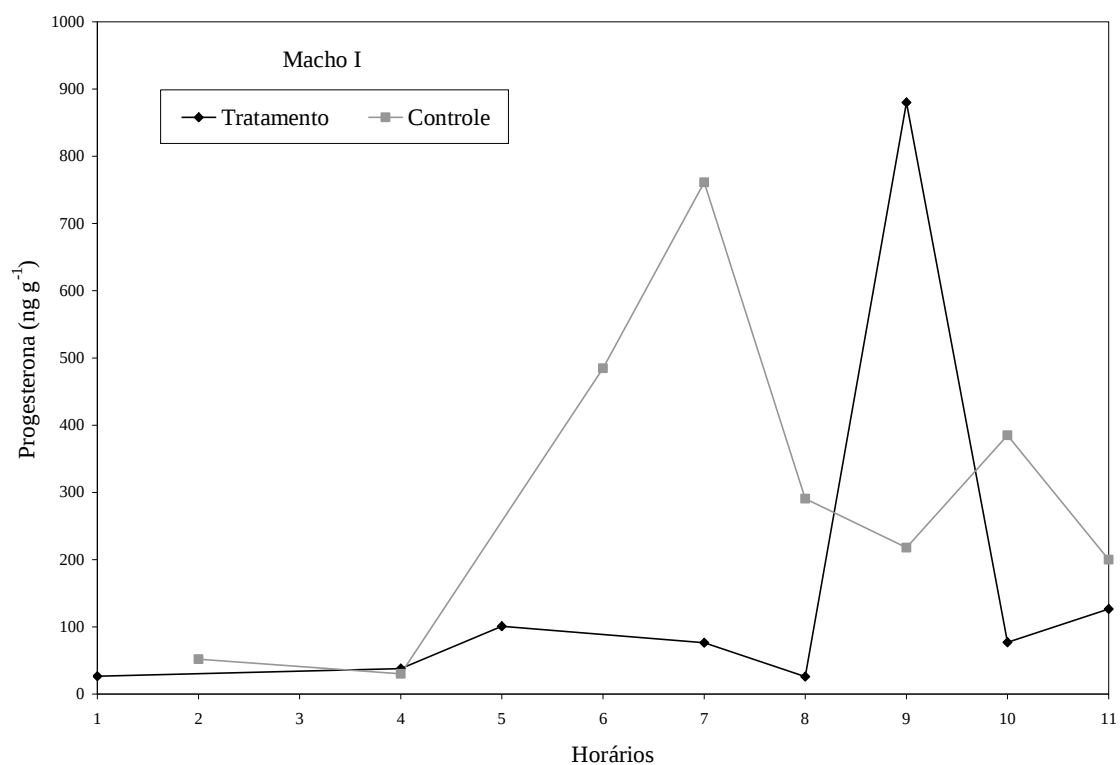


Figura 4: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo macho I.

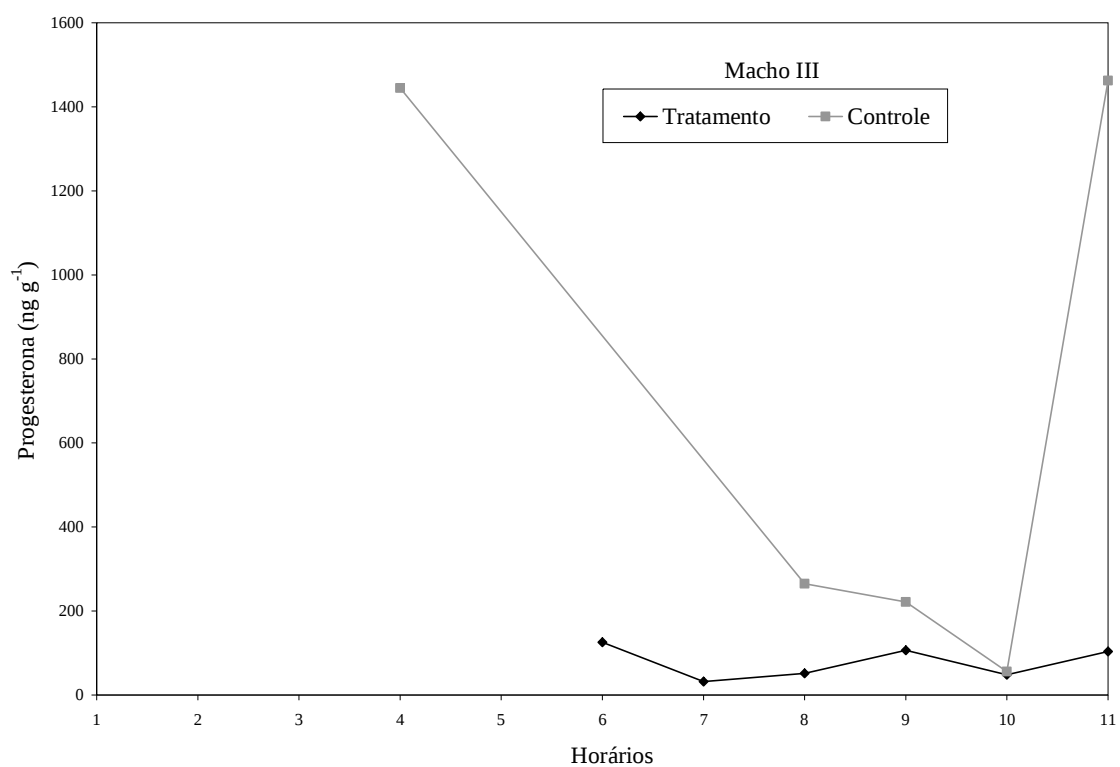


Figura 5: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo macho III.

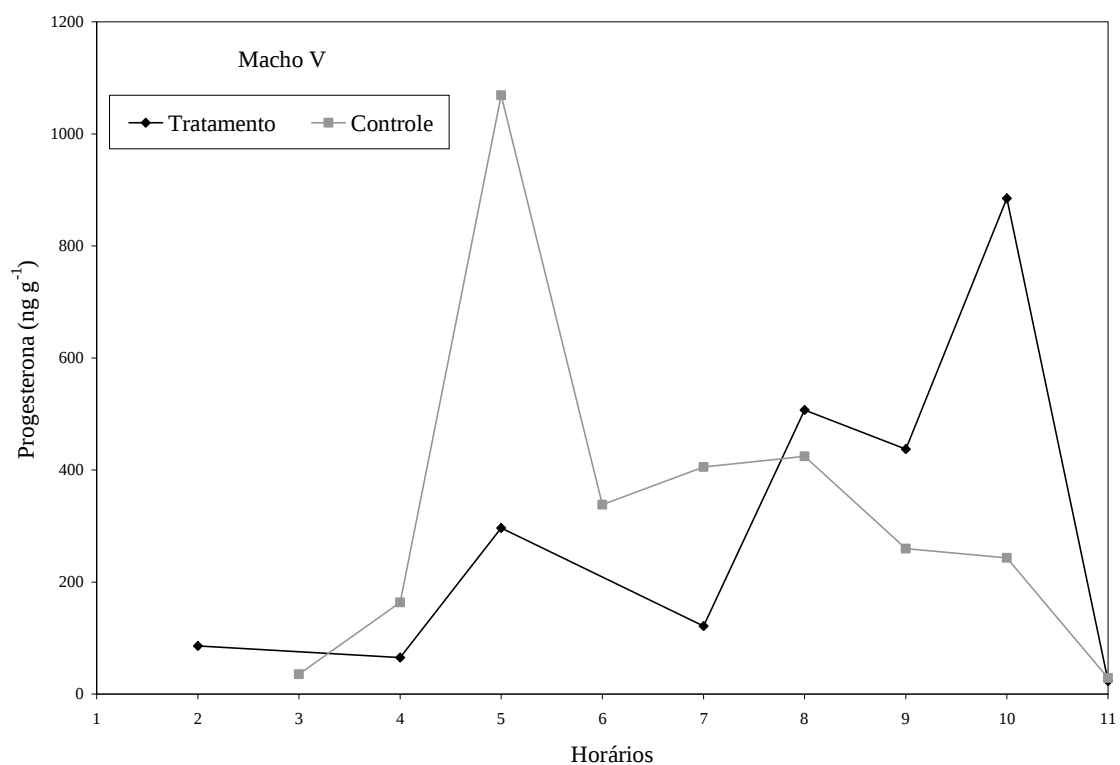


Figura 6: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo macho V.

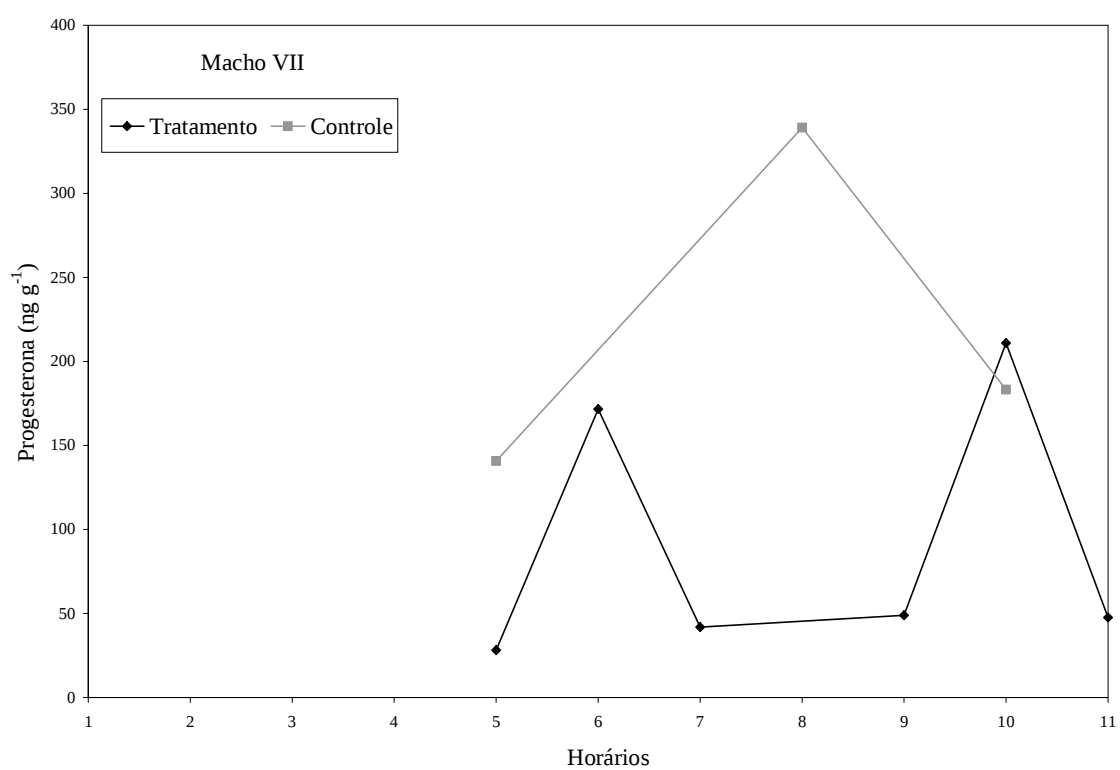


Figura 7: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo macho VII.

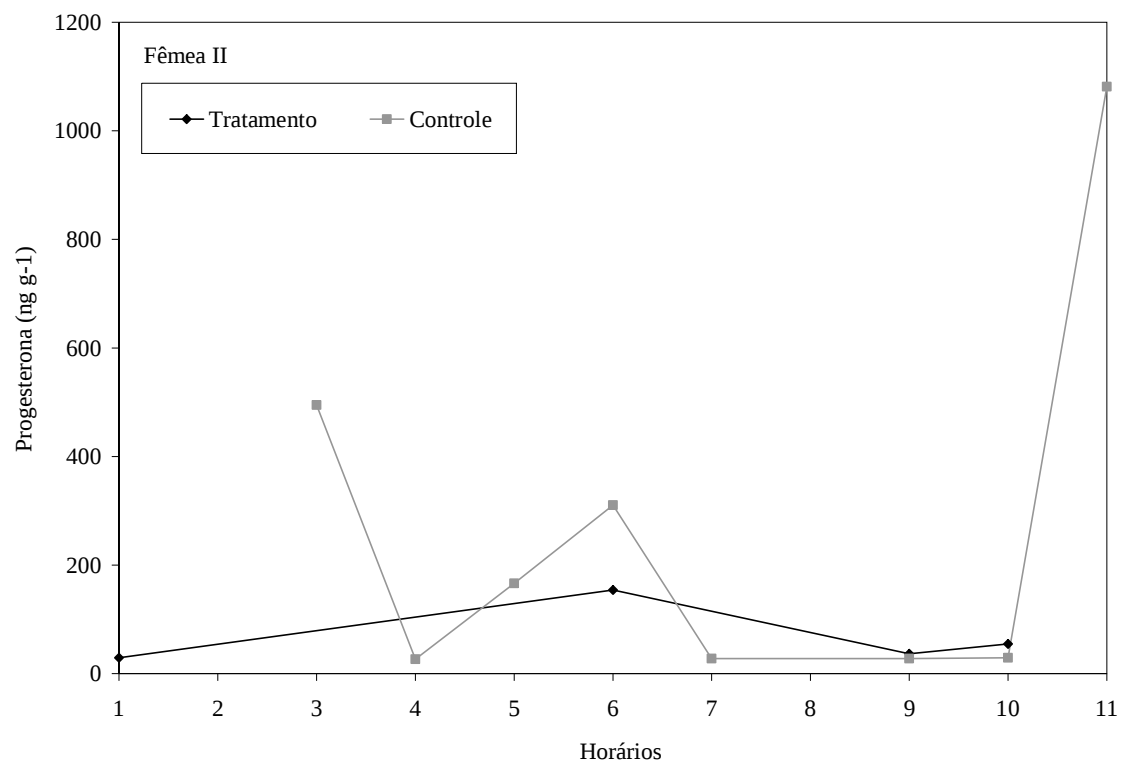


Figura 8: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo fêmea II.

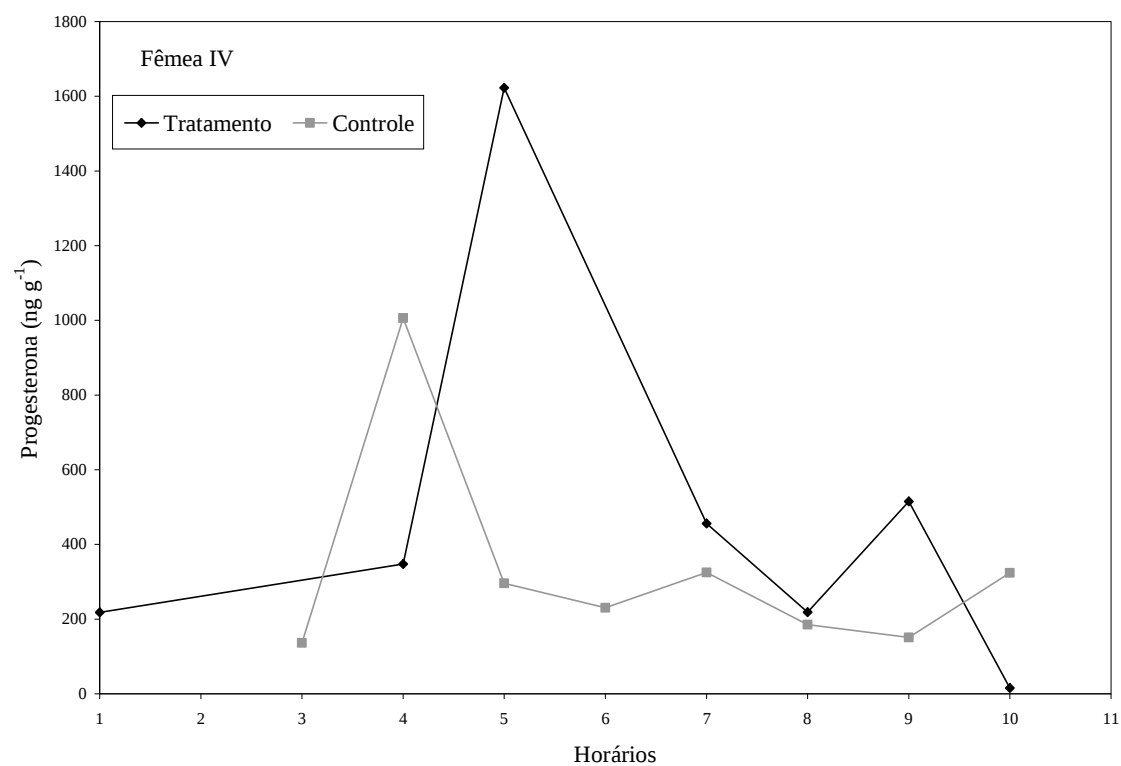


Figura 9: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo fêmea IV.

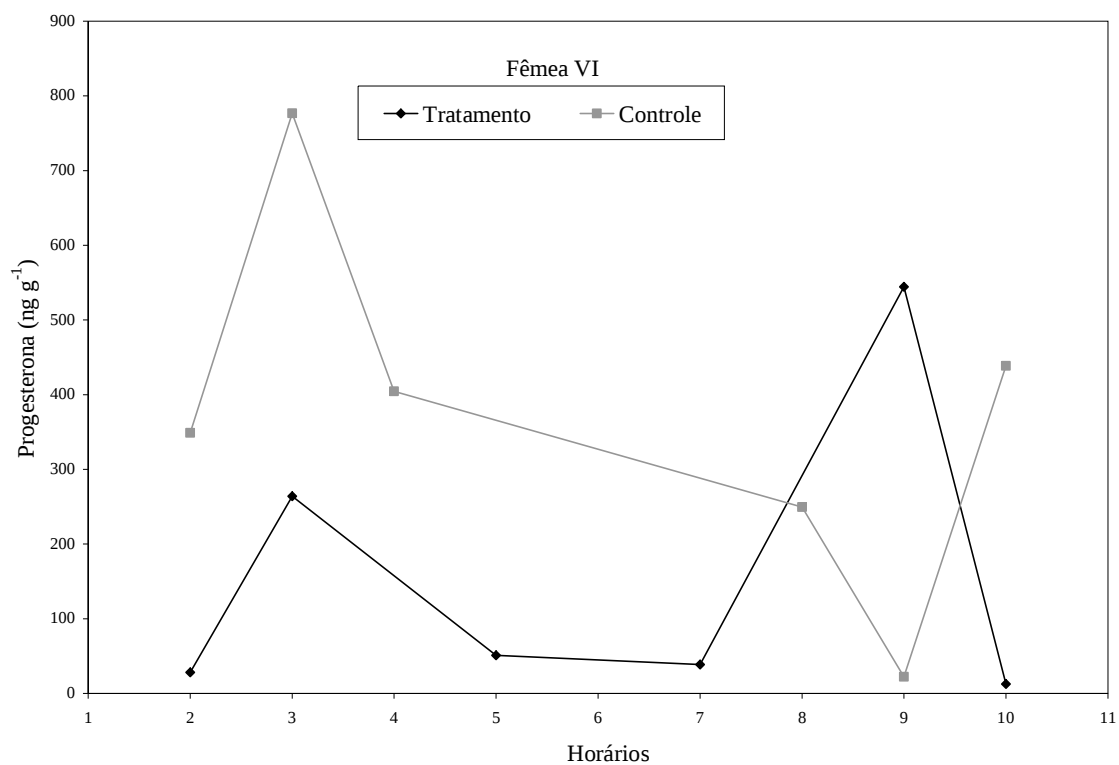


Figura 10: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo fêmea VI.

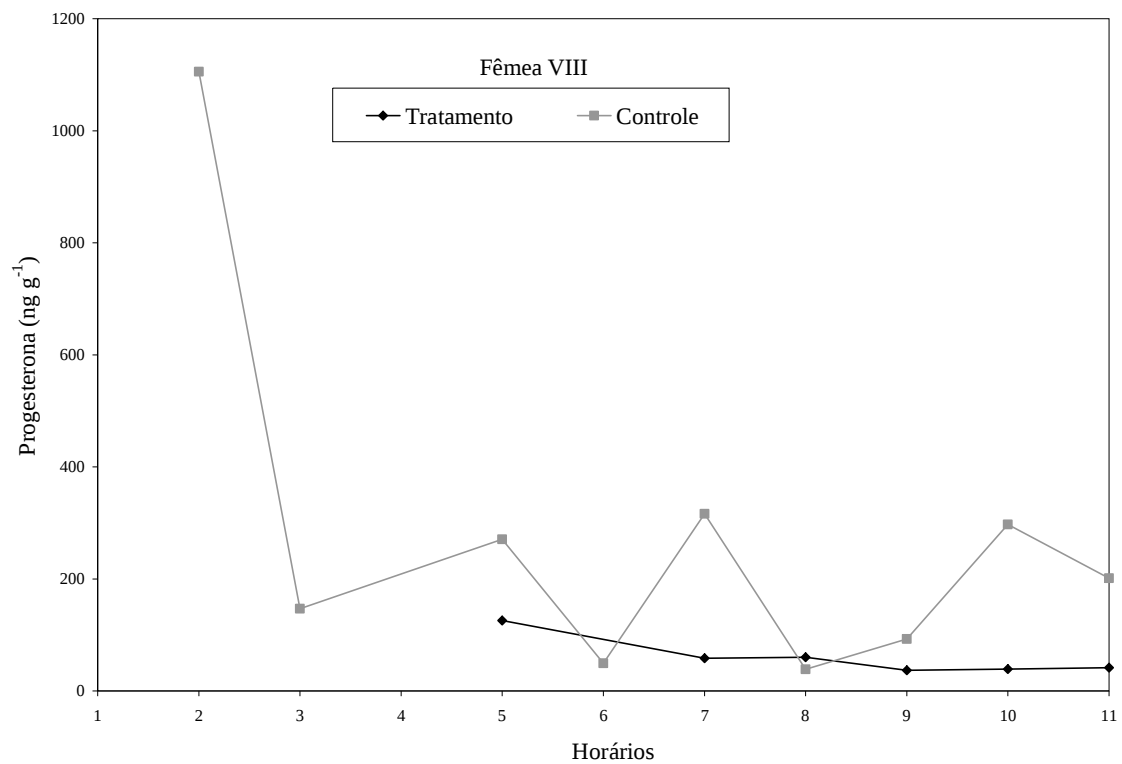


Figura 11: Médias da quantidades de metabólitos de progesterona encontradas nas fezes a cada hora de coleta de fezes, no indivíduo fêmea VIII.