

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DA DOSAGEM DOS METABÓLITOS
DE GLUCOCORTICÓIDES EM FEZES DE PAPAGAIO-
VERDADEIRO (*AMAZONA AESTIVA*)

CAROLINE JUNKO FUJIHARA

Botucatu – SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DA DOSAGEM DOS METABÓLITOS
DE GLUCOCORTICÓIDES EM FEZES DE PAPAGAIO-
VERDADEIRO (*AMAZONA AESTIVA*)

CAROLINE JUNKO FUJIHARA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Botucatu, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Fujihara, Caroline Junko.

Validação fisiológica da dosagem de metabólitos de glucocorticóides em fezes de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) / Caroline Junko Fujihara. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Capes: 50504037

1. Papagaio (Ave) – Esterco. 2. Papagaio (Ave) - Fisiologia. 3. Hormônios.

Palavras-chave: Enzimaimunoensaio; Excretas; Metabólitos hormonais; Método não-invasivo; Papagaio-verdadeiro.

Nome do Autor: Caroline Junko Fujihara

Título: VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DA DOSAGEM DOS METABÓLITOS DE GLUCOCORTICÓIDES EM FEZES DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (AMAZONA AESTIVA)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Adj. Dr. Cezinande Meira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Ass. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Membro

Departamento de Zootecnia

FCAV- UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ - USP

Dr. Ian Martin

Membro

Pós-doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Nei Moreira

Suplente

Curso de Medicina Veterinária

UFPR – Palotina

Prof^a Titular Dr Sony Dimas Bicudo

Suplente

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu

Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Suplente

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP- Botucatu

Data da Defesa: 24 de janeiro de 2012.

***Dedico aos amigos, que fazem a vida ficar mais leve,
apesar das pedras que carregamos...***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida que me deu, pela família e amigos que tenho.

À minha família, que após tantos acontecimentos e apesar da distância geográfica que agora nos separa sempre se manteve unida. Em especial à Chizuko, Sadao, Yuko, Lúcio, Yuji, Juliana, Yoko, Haruo, Toty, Tiaki, Daniel, Michiko, Minoro, Yuriko, Paes, Yoiti.

Ao meu companheiro, amigo e amado Fernando Correia, por dar colo e carinho, por tornar meu dia mais feliz. Obrigada pelo seu amor.

Aos amigos e colegas de experimento Wolff Marques Filho, Ian Martin, Erika Fruhvald, Caroline Destro, Eduardo Trevisol, Cinthia Rio Branco, por tanta dedicação e trabalho durante todo o projeto, pelas noites em claro, tornando possível a realização deste sonho.

Aos professores Marcelo Alcindo, Mauricio Barbante, Ricardo Garcia, Rupert Palme, Elizabeth Schmidt, Carlos Teixeira, Eunice Oba, Stélio Luna e ao MV Jean Joaquim que me auxiliaram em diversas fases do experimento.

Ao Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira por ter acreditado em mim e ter aceitado este desafio. Por ser mais que um professor, ser um amigo e grande mestre.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária: Cezinande de Meira, Eunice Oba, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Frederico Ozanam Papa, Marco Antonio Alvarenga, Maria Denise Lopes, Nereu Carlos Prestes e Sony Dimas Bicudo, por acreditarem no projeto e me receberem como pós-graduanda.

Aos funcionários do Departamento e do CEMPAS que mantém a ordem e a limpeza, tornando-os um ambiente agradável e propício para os estudos.

Ao Departamento de Patologia da FMB, em especial ao Claudinei por possibilitar a liofilização das amostras.

Aos Papagaios-verdadeiros que forneceram o material necessário para a realização da pesquisa.

Aos amigos de longa data ou de poucos meses: Cynthia Widmer, Carlos Abrahão, Rafael Haddad, Carolina Batista, Eliriane Jamas, Ricardo, Joyce, Alberto Carniel, Luciana Monteiro, Jaime Batista, Michele Honaga, Daniel Cazaes, entre tantos outros que tenho medo de faltar com o nome, obrigada por tornar a vida mais prazerosa.

FAPESP pelo Auxílio financeiro cedido, permitindo a realização do trabalho.

A todos, meu muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	19
REVISÃO DE LITERATURA	21
1 Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	22
2 Síntese, metabolização e excreção de glucocorticóides.....	24
3 Validação da mensuração de metabólitos hormonais.....	28
4 Métodos de validação da mensuração dos metabólitos hormonais	31
4.1 Validação laboratorial.....	31
4.1.1 Curva de dose-resposta.....	32
4.1.2 Curva de paralelismo	32
4.1.3 Controle de qualidade	33
4.2 Validação fisiológica	33
MATERIAL E MÉTODOS	37
1 Animais	38
2 Experimento I. Determinação de Anticorpo para mensuração de metabólitos de glucocorticóides em amostras urofecais de Papagaio-verdadeiro, após desafio com solução de ACTH.....	40
2.1 Delineamento experimental	40
2.2 Processamento das amostras	40
2.3 Escolha do Ac	43
3 Experimento II. Validação fisiológica da mensuração de metabólitos de glucocorticóides nas excretas de Papagaio- verdadeiro.....	45
3.1 Delineamento experimental	45

4 Experimento III. Validação do método de separação manual do urato da porção fecal das excretas, para a identificação dos padrões de excreção urinária e fecal dos metabólitos de glucocorticóides em Papagaio-verdadeiro.....	47
4.1 Delineamento experimental	47
5 Análise estatística.....	48
RESULTADOS	50
1 Experimento I. Determinação de Anticorpo para mensuração de metabólitos de glucocorticóides em amostras urofecaís de Papagaio-verdadeiro, após desafio com solução de ACTH.....	51
2 Experimento II. Validação fisiológica da mensuração de metabólitos de glucocorticóides nas excretas de Papagaio-verdadeiro.....	52
3 Experimento III. Diferença de excreção de metabolitos de glucocorticoides em amostras Fecaís x Urofecaís.....	55
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	82
ARTIGO	86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 - Valores médios $\pm$ desvios padrão de metabólitos de glicocorticóides em amostras uofecais (ng/g fezes) de 24 Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada 03 horas durante 24 horas após a injeção (M0) de Solução Salina (0,2 mL), Dexametasona (1,0 mg/Kg) e ACTH (25UI), pela técnica de EIA 53
- Tabela 02 - Valores médios $\pm$ desvios padrão de metabólitos de glucocorticóides fecais e uofecais (ng/g excreta) de 22 Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada 03 horas durante 18 horas após a injeção (M0) de Solução de ACTH (25UI), pela técnica de EIA..... 55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Fotos da disposição das gaiolas 39
- Figura 02 - Ordem de pipetagem das soluções em placa de poliestireno contendo 96 poços, para realização de EIA. (NSB – Ligação não-específica, apenas a solução de ensaio; BO – Ausência de Ligação, solução de ensaio e solução de ligação. S1 a S7 – Curva padrão, padrões para cada ensaio; Px – Controle de baixa concentração; Py – Controle de alta concentração; 1 a 35 – Amostras. (Fonte: Möstl & Palme, 2008) 42
- Figura 03 - Níveis médios de metabólitos de glucocorticóides urofecais em Papagaio-verdadeiro (*A. aestiva*), obtidos em ensaios com os anticorpos policlonais referência Cortisone 32a (linha contínua -----) e Corticosterone 72T (linha tracejada - - - -) em amostras urofecais de dois machos (O) e duas fêmeas (Δ), após administração de ACTH (m0) e a cada três horas, por 21 horas consecutivas. 34
- Figura 04 - Bloxplots da dosagem de metabólitos de glucocorticóides (ng/g) obtidos de amostras urofecais de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) colhidas a cada 03 horas durante 24 horas após a administração de solução de ACTH (a, n=24, barra cinza), Dexametasona (a, n=24, barra branca) e Salina (b, n=24, barra branca cortada), pela técnica de EIA. Os animais Controle (b, n=24, barra cinza cortada) não foram manipulados. Valores atípicos representados por círculo cinza (a – ACTH, b - Controle), círculo branco (a – Dexametasona, b - Salina); * = diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$). Barra preta em cima dos gráficos indica período de coleta noturna 54
- Figura 05 - Bloxplots da dosagem de metabólitos de glucocorticóides (ng/g) obtidas de amostras fecais (n=22, barra branca) e urofecais (n=22, barra cinza) de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada 03 horas, durante 18 horas após a administração de solução de ACTH, pela

técnica de EIA. Valores atípicos representados por círculo
círculo branco (amostra fecal) e círculo cinza (amostra
urofecal). Barra preta em cima do gráfico indica período de
coleta noturna 56

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Esteroidogênese em glândula adrenal de aves. A via do Colesterol é a principal via após o nascimento da ave. O ramo à esquerda é significativa durante a fase embriogênica. O ramo à direita é possivelmente o caminho de degradação. As setas em negrito indicam o caminho predominante de produção da síntese de colesterol e produção de corticosterona (fonte: CARSIA & HARVEY, 2000 - Cap 19) 83
Anexo B -	Dados (sexo, identificação no estudo, peso e identificação de origem) dos animais utilizados nos experimentos. Animais provenientes de apreensão e doados pelo Parque Estadual do Tietê (PET), Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”- Sorocaba (nº). Todos os animais estavam alocados no CEMPAS – Botucatu desde 2008..... 84
Anexo C -	Descrição da composição básica e níveis de garantia da ração extrusada para psitacídeos de grande e médio porte- Biotron®, utilizada para alimentar as aves durante a realização do experimento 85

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico
cm = Centímetro
DNA = Ácido desoxirribonucleico
EIA = Enzimoimunoensaio
g = Grama
GC = Glucocorticoides
GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina
HPA = Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical
IM= intramuscular
m = Metro
M = Molar
mbar = Milibar
mg = Miligrama
min = Minutos
ml = Mililitro
mm = Milímetro
NaCl = Cloreto de sódio
ng = Nanograma
nm = Nanômetro
PA = Puro absoluto
pg = Picograma
rpm = Rotações por minuto
s = Segundos
UI = Unidade internacional
x g = Gravidade
µl = Microlitro

FUJIHARA, C.J. **VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DA DOSAGEM DOS METABÓLITOS DE GLUCOCORTICÓIDES EM FEZES DE PAPAGAIO-VERDADEIRO (AMAZONA AESTIVA)**. Botucatu, 2012, 85f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O estímulo estressante promove ativação do eixo neuronal e hormonal em todos os animais. No eixo hormonal observa-se a ativação do eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Adrenal (HHA), havendo a liberação de glucocorticóides na corrente sanguínea, que visam a disponibilização de energia para o animal lutar ou fugir contra o agente estressor. Em aves o principal glucocorticóide produzido pela córtex da adrenal é a corticosterona. Após o término do evento estressor, as concentrações plasmáticas retornam aos níveis basais pelo processo de retroalimentação e metabolização. Devido a variabilidade na porcentagem de produção, metabolização e excreção dos hormônios ligados ao estresse, é impressionante realizar a validação, tanto laboratorial quanto fisiológica dos métodos de dosagem a serem empregados para cada espécie. Com o objetivo de realizar a validação fisiológica da dosagem de metabólitos urofecais pela técnica de Enzimaimunoensaio em Papagaio-verdadeiro (*A. aestiva*), foram utilizados 24 animais (12 machos e 12 fêmeas) separados nos seguintes experimentos: Experimento I – 02 machos e 02 fêmeas, separados em dois grupos (01 macho/ 01 fêmeas) de acordo com o tipo de anticorpos (Corticosterona 72T e Cortisona 32a) utilizado no ensaio, as amostras urofecais de cada animal foram coletadas no momento da administração de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a cada 03 horas (h), por 21 h consecutivas; Experimento II – 12 machos e 12 fêmeas separados em quatro grupos (03 machos/03 fêmeas) de acordo com o desafio empregado (Controle, ACTH, Dexametasona, Salina), foram coletadas amostras urofecais no momento da administração intramuscular da solução correspondente para cada grupo e a cada 03 horas, por 24 horas consecutivas; Experimento III – 12 machos e 11 fêmeas separados em dois grupos (06 machos/05 fêmeas) de acordo com o tipo de coleta de amostras (fecal e urofecal), as amostras das excreções foram coletadas no momento da administração intramuscular de ACTH e a cada 03 horas, por 24 horas consecutivas. Foram observados os seguintes resultados: Maior sensibilidade do Anticorpo Cortisona 32a para mensurar metabólitos de corticosterona em excretas de Papagaio-verdadeiro; a técnica de EIA foi capaz de detectar aumentos nas concentrações dos metabólitos de corticosterona em excretas de Papagaio-verdadeiro, apresentando diferenças nos níveis de concentração entre os grupos Controle, ACTH, Salina e Dexametasona a partir de 03 h do início das coletas, porém não foi possível verificar o padrão de excreção entre amostra fecal e urofecal após desafio com ACTH pela técnica de separação empregada.

PALAVRAS-CHAVE: Papagaio-verdadeiro; metabólitos hormonais; método não-invasivo; enzaimunoensaio, excretas.

FUJIHARA, C.J. **Physiological validation of glucocorticoid metabolites assay in Blue fronted parrot (*Amazona aestiva*) feces.** Botucatu, 2012, 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Stress stimulate neuronal and hormonal axis in all animals. In the hormonal axis is observed activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA), with the release of glucocorticoids into the bloodstream, providing energy for the animal fly or fight in the front of stressor. Corticosterone is the major glucocorticoid produced by adrenal cortex in birds. After the stressor event, plasma concentrations returned to baseline levels by feedback process and metabolism. Due to variability in production, metabolism and excretion percentage of stress hormones, laboratorial and physiological validation are necessary for use methods of dosage for each species. In order to perform physiological validation of urofecal metabolites measurement by enzyme immunoassay in Blue-fronted parrot (*A. aestiva*), we used 24 animals (12 males and 12 females) separated in the following experiments: Experiment I - 02 males and 02 females, divided into two groups (01 male/01 female) according to type of antibodies (72T Corticosterone and Cortisone 32a). Urofecal samples from each animal were collected at the time of administration of ACTH and every 03 hours (h), during 21 h; Experiment II - 12 males and 12 females divided into four groups (03 males/03 females) according to the solution administared (control, ACTH, dexamethasone, Salina), urofecal samples were collected at the time of intramuscular administration, corresponding for each group and every 03 hours for 24 consecutive hours; Experiment III - 12 males and 11 females divided into two groups (06 males/05 females) according to the sample type (fecal and urofecal), samples were collected at the time of intramuscular injection of ACTH and every 03 hours for 24 consecutive hours. We observed the following results: Cortisone 32a presented increased sensitivity to measure corticosterone metabolites in feces of Blue-fronted parrot, EIA was able to detect increased concentrations of corticosterone metabolites in Blue-fronted parrot feces, showing different concentration levels between Control, ACTH, Saline and Dexamethasone Groups 03 h after start collections, but it wasn't possible verify excretion pattern of fecal and urofecal sample after challenge with ACTH, by the separation technique employed.

Key-words: Blue fronted parrot; corticosterone metabolites, non-invasive method; feces.

INTRODUÇÃO

As aves apresentam, na maioria, hábito diurno e vocalizam com frequência (SICK, 2001; DEVELEY, 2003), segundo a lista da IUCN (2011) há 9.990 espécies descritas no mundo, sendo 1.764 descritas no Brasil. Das 355 espécies da família Psittacidae, 97 correm risco de extinção, sendo que para 51% destas o risco é iminente (IUCN, 2011).

Os psitacídeos ocupam diferentes regiões da Terra, sendo representados pelas araras (*Ara* e *Anodorhynchus*), papagaios (*Amazona*), maracanãs (*Propyrrhura*), periquitos (*Brotogeris*), tuins (*Forpus*), maritacas (*Pionus*), além das espécies africanas (*Agapornis* e *Psittacus*), asiáticas e da Oceania (*Loris*, *Trichoglossus*, *Kakapo* e *Nestor*) (GALETTI et al., 2005; IUCN, 2011).

A *Amazona aestiva* é uma das espécies mais encontradas entre os psitacídeos apreendidos em cativeiro ou no comércio ilegal (CAMPEDELLI et al., 2009). Isto se deve a grande procura por esta espécie dado o seu comportamento de imitar a voz humana e companheirismo, fazendo-os ser frequentemente escolhidos como animais de estimação.

A degradação do habitat, a perseguição humana para comércio de animais e suas penas, bem como a coleta dos ovos e filhotes são os principais fatores para o declínio de muitos psitacídeos. Isto, associado à introdução de espécies predadoras ou competidoras, destruição das espécies de árvores utilizadas para nidificação e processos relacionados com o desenvolvimento antrópico provocam estresse crônico nos animais (GALETTI et al., 2005).

Os estímulos estressantes ativam o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical, desequilibrando os processos catabólicos (mobilização de

energia) e anabólicos (reparação, cicatrização e crescimento), que ao longo do tempo podem afetar negativamente a sobrevivência, a reprodução e a resistência às doenças (BOONSTRA, 2004; ROMERO, 2004; LUNDBERG, 2005).

Com a crescente preocupação com a biodiversidade, diversas pesquisas em busca de dados básicos sobre a biologia da espécie e procura de áreas de preservação estão em andamento (ICMBio/MMA, 2011), porém há necessidade de criação de programas que monitorem e verifiquem os impactos sobre a saúde dos animais.

Entre os diversos métodos de monitoramento destaca-se a dosagem hormonal, por meio da qual, entre outros, pode-se observar o *status* reprodutivo e o nível de estresse nos animais (WASSER et al., 2000; WIKELSKI et al., 2000).

O material utilizado para a dosagem hormonal pode ser plasma/soro, saliva, fezes, urina ou mistura de fezes e urina, como observado em aves devido à excreção conjunta (BEERDA et al., 1996; COOK, 2002; WASSER et al., 2002).

A mensuração hormonal através de amostras plasmáticas é amplamente empregada em animais domésticos, contudo em animais selvagens e, principalmente em aves de pequeno porte, a frequência e volume de amostra sanguínea coletada pode comprometer a saúde do animal. Outra influência negativa para a coleta de amostra sanguínea é a alteração na secreção de hormônios pelos eixos adrenocortical e gonadal, resultante da captura e manipulação, gerando variáveis indesejáveis durante a análise dos resultados (WINGFIELD, 1994; BISHOP e HALL, 1991; LEE et al., 1995; TELL, 1997).

Desta forma, a mensuração dos metabólitos de esteróides urinários e fecais vem se mostrando útil na investigação endocrinológica de animais selvagens, pois possibilita a coleta de inúmeras amostras sem que haja a perturbação do animal (BISHOP e HALL, 1991; COCKREM e ROUNCE, 1994; LEE et al., 1995; TELL, 1997, BALTIC et al., 2005; PEREIRA et al., 2010).

Porém, como existem particularidades nos padrões de excreção dos metabólitos hormonais de acordo com a alimentação, a espécie, o sexo, o tempo de excreção, o tipo de metabólito a ser avaliado e a técnica a ser empregada (PALME et al., 1999, MÖSTL et al., 1999; WASSER et al., 2000; GOYMANN et al., 2002; DENHARD et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2003; CHINNADURAI, 2006; CHELINI et al., 2006; _2010; PEREIRA et al., 2010), torna-se imprescindível a validação tanto laboratorial quanto fisiológica dos métodos de dosagem para a correta interpretação dos dados obtidos.

OBJETIVOS

Devido à variabilidade nos padrões de excreção dos metabólitos de hormônios esteróides nas excretas de acordo com a espécie estudada, o objetivo geral do presente trabalho foi validar fisiologicamente a técnica de Enzimaimunoensaio (EIA) para a dosagem de metabólitos de corticosterona em excretas de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).

Para tanto os objetivos específicos foram:

Experimento I: Determinar o Anticorpo (Ac) que apresenta maior capacidade de detecção de metabólitos de glucocorticóides em amostras uofecais de Papagaios-verdadeiros (*A. aestiva*) pela técnica de EIA, utilizando os Ac Cortisona - referencias 32a e Corticosterona - referencia 72T.

Experimento II: Determinar o perfil de excreção dos metabólitos de glucocorticóides nas excretas de Papagaio-verdadeiro após desafio com ACTH e Dexametasona.

Experimento III: Verificar se o método de separação das porções urinária e fecal das excretas de Papagaio-verdadeiro permite a identificação das diferenças nos perfis de excreção uofecal e fecal dos metabólitos de glucocorticóides.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)

O Papagaio-verdadeiro é considerado uma espécie monogâmica, vive em bandos, mantendo-se em casais durante a época reprodutiva e podem nidificar no mesmo ninho em épocas reprodutivas subsequentes (FORSHAW, 1989; SICK, 2001; SEIXAS e MOURÃO, 2000; LEITE, 2007).

Os animais apresentam corpo com penas verdes, fronte e loros azuis, penas amarelas na cabeça, ao redor dos olhos e bochecha, bico negro, possuem em média 36 centímetros (cm) de comprimento total e 370 gramas (g) de peso vivo (SEIXAS e MOURÃO, 2003).

A espécie pode ser dividida em duas subespécies: *A. aestiva aestiva*, que apresenta penas da região de encontro de asa de coloração vermelha, sendo a sua distribuição geográfica na região oriental do Brasil e *A. aestiva xanthopteryx*, que apresenta encontro de asa amarelo e ocorre na região da Bolívia, norte da Argentina e Brasil ocidental. Na região central do Brasil há sobreposição entre as subespécies, apresentando indivíduos com encontro de asa com coloração mista (DARRIEU, 1983 apud ICMBio/MMA, 2011).

Por apresentar a característica de imitar a voz humana e ser de fácil sociabilização, é uma espécie apreciada como animal de companhia. Os relatórios de Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) revelam que todos os anos grande quantidade de Papagaios-verdadeiros são capturados ilegalmente no Brasil, sendo a maioria deles filhotes, sem penas e com olhos fechados. Essas ações resultam em diminuição de indivíduos em populações

naturais e a perda dos sítios reprodutivos por destruição de árvores ninhos (CAMPEDELLI et al., 2009; ICMBio/MMA, 2011).

Apesar de estudos genéticos apontarem elevada diferenciação entre as populações e classificá-las como de “menor preocupação” para o risco de extinção (IUCN, 2011), Leite (2007) relata que os efeitos decorrentes de ameaças podem ainda não ter sido percebidos e detectados devido a fatores como a grande longevidade da espécie (acima de 50 anos) e o elevado tempo para a observação de perda genética (gerações).

Segundo o relatório semestral da RENTAS (2001), os animais continuam sendo transportados confinados em pouco espaço, sem água e alimento, presos em caixas superlotadas, onde brigam, se mutilam e morrem devido ao estresse crônico. É estimado que de 10 animais traficados apenas um sobreviva para o comércio de animais vivos e para cada produto animal comercializado sejam mortos pelo menos três espécimes (REDFORD, 1992).

Carvalho (2004), em análise de arquivos de necrópsia em aves silvestres, relatou que 34% dos psitacídeos necropsiados apresentavam doenças infecciosas como causas de morte, e que destas, 39% tinham como agente infeccioso a *Chlamydia psittaci*, uma bactéria com alto potencial zoonótico (HARKINEZHAD et al., 2007; HARKINEZHAD et al., 2009).

Assim, a retirada da natureza e o manejo inadequado dos indivíduos, causa riscos à saúde da população, tanto animal quanto humana, pois o processo de tráfico ocasiona o estresse e conseqüentemente alteração hormonal, tendo como consequência a diminuição da resistência às doenças (LUNDBERG, 2005).

2 Síntese, metabolização e excreção de glucocorticóides

Estímulos externos (por exemplo: presença de predador, perseguição) e internos (p.e.: fome) ativam mecanismos de respostas para que o animal possa lutar ou fugir (SEYLE, 1963 apud SIEGEL, 1980). Um dos sistemas ativados é o sistema neuronal, em que se observa o aumento da pressão sanguínea arterial, do tônus muscular, da sensibilidade do nervo, da frequência respiratória e da glicose sanguínea.

Outro sistema ativado é o endócrino, que visa a disponibilização de energia através de alterações endócrinas. Tais alterações desequilibram os processos catabólicos (mobilização de energia), induzido pelos hormônios como a epinefrina, norepinefrina e glicocorticóides, e anabólicos (reparação, cicatrização e crescimento), induzidos por esteróides sexuais e hormônios de crescimento (BOONSTRA, 2004; ROMERO, 2004; LUNDBERG, 2005).

Em resposta a eventos estressantes o sistema endócrino é ativado, tendo o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) como base, ou seja, o estímulo estressor (comportamental, ambiental ou demográfico) emite sinais elétricos que são reconhecidos pelo hipotálamo, que por sua vez promove a liberação de Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH). O CRH age na hipófise, havendo a liberação e a elevação das concentrações de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH age nos receptores presentes no córtex da adrenal, aumentando a secreção de hormônios glicocorticóides, que agem em células-alvo dos músculos e órgãos para disponibilização de energia (SAPOLSKY et al., 2000; CREEL, 2001; MATOS, 2008).

Em aves, a síntese de glicocorticóides é similar a dos mamíferos, ou seja, é dependente de estoque de colesterol. Porém, o principal glicocorticóide produzido pela glândula adrenal de aves é a corticosterona, formada a partir da hidroxilação do carbono 11 β do 11-deoxicorticosterona, e do carbono 21 do 11 β -hidroxiprogesterona, via enzima mitocondrial P450 (CARSIA e HARVEY, 2000). A corticosterona é composta por cadeias de carbono, sendo representada pela seguinte fórmula molecular: C₂₁H₃₀O₄ (Anexo) (De ROSS, 1961 apud CARSIA e HARVEY, 2000; SIEGEL, 1980).

Os glicocorticóides são transportados na corrente sanguínea de duas formas: a livre, que age diretamente nas células-alvo, e a conjugada com proteínas plasmáticas, sendo esta uma forma de reserva hormonal de fácil ação (SIEGEL, 1980).

Após o término do desafio, para a manutenção da sobrevivência e saúde dos animais, ocorre o retorno ao equilíbrio dinâmico pelo processo de retroalimentação e metabolização (CARSIA e HARVEY, 2000), mantendo um balanço adequado entre o processo de catabolismo e processos anabólicos (LUNDBERG, 2005).

A retroalimentação ocorre pela ação do glicocorticóide em receptores presentes no hipotálamo e na hipófise, sinalizando para a redução da produção de CRH e ACTH e consequentemente redução da produção de glicocorticóides (CARSIA e HARVEY, 2000).

Já a metabolização dos glucocorticóides é realizada pelo rim e pelo fígado. Na primeira via, os metabólitos são excretados diretamente pela urina, enquanto que na metabolização hepática, os metabólitos são carregados junto à

bile, ficando armazenados na vesícula biliar antes de passar para o intestino e serem excretados pelas fezes (MÖSTL e PALME, 2002).

Devido às diferenças na taxa de metabolização, no tempo de permanência da ingesta no trato gastro-intestinal e nas estruturas anatômicas conforme a espécie estudada, há variação na velocidade de excreção dos metabólitos hormonais. Essa variação também está relacionada com o tipo de alimentação e o modo de vida de cada animal (KLASING, 2005).

Um exemplo são os predadores, que se alimentam de carne, tendo digestão e metabolização mais lenta e conseqüentemente maior tempo de passagem da ingesta pelo trato gastrointestinal. Já as presas, que normalmente alimentam-se de folhas e frutos, apresentam digestão mais rápida e com isso, maior ingestão de alimentos, tendo excreção em maior quantidade e em tempo mais curto (KLASING, 2005).

Essas diferenças podem ser observadas ao comparar os dados de Pereira et al. (2010), com os de Goymann et al. (2002). No primeiro estudo foi observado excreção de metabólitos de corticosterona quatro horas após a injeção de ACTH em falcões quiri-quiri, enquanto que no segundo, a excreção de corticosterona ocorreu após uma e três horas após a administração de ACTH, respectivamente, em machos e fêmeas de tordos europeus.

As diferenças na excreção devido às espécies e a amostra analisada também podem ser observadas quando comparados os dados de Hiebert et al., (2000), Nakagawa et al. (2003) e Dehnhard et al. (2003).

Hiebert et al. (2000) observaram em Beija-flores (*Trochilidae*), que as amostras fecais colhidas dentro de 15 minutos após a contenção, representavam as concentrações basais. Após 30 minutos observaram traços

de corticosterona, com pico de excreção após 60 minutos e concentrações basais após 90 minutos. Ao suplementarem com corticosterona (HBC-CORT), os níveis fecais elevam-se após 30 minutos, provavelmente devido a não absorção pelo trato intestinal.

Dehnhard et al. (2003) observaram que em patos (*Anas platyrhynchos*) e galinhas (*Gallus domesticus*) os corticosteroides circulantes foram metabolizados pelo fígado e apresentaram meia-vida de 10 a 15 minutos, sendo excretados pelas fezes e urina após quatro horas da estimulação, demonstrando que a excreção fecal acompanha a dinâmica do plasma sanguíneo com um atraso de $3,5 \pm 1,1$ h. A dinâmica de concentrações dos metabólitos fecais reflete o curso da atividade biológica do hormônio no plasma, sendo a mesma observada em corvo-marinho e falcão (DEHNHARD et al., 2003).

Já Nakagawa et al. (2003) observaram, em pinguim de Adélia (*Pygoscelis adeliae*), picos excreção 13 ± 3 horas após desafio com ACTH. Isso demonstra que nessa espécie a excreção fecal acompanha a dinâmica do plasma sanguíneo com um atraso de 13 ± 3 h.

Quando levado em consideração o sexo do animal, Chelini et al. (2010) obtiveram concentrações mais elevadas em machos de hamster sirio (*Mesocricetus auratus*), demonstrando que em algumas espécies há diferenças nas excreções dos metabólitos hormonais entre machos e fêmeas. Essa diferença também pode ser observada ao analisar os dados obtidos por Rettenbacher et al. (2004), em que machos e fêmeas de galináceos apresentaram diferentes frações dos metabólitos excretados, ao analisar as amostras fecais por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

Whitten (1998), em estudos com chimpanzés observou diferenças nas excreções de metabólitos de cortisol fecal, de acordo com a amostra avaliada, sendo a excreção urinária mais rápida que a fecal, apresentando um dia de diferença entre as amostras analisadas.

Wasser et al. (1997) observaram em corujas dois picos de excreção de metabólitos de glicocorticóides fecal, assim como Wasser et al. (2000), Denhard et al. (2003), Rettenbacher et al. (2004) e Thiel et al. (2005). Porém Thiel et al. (2005) relataram que estes picos poderiam ser devido à falha na separação da amostra fecal da urinária, quando observaram elevadas concentrações de metabólitos de corticosterona na primeira hora em uma das fêmeas de perdizes.

Devido a variação na produção e excreção dos metabólitos hormonais conforme a espécie, o período do dia/ano e o material analisado (PALME et al., 1996; WASSER et al., 1997; CREEL, 2001; GOYMANN et al., 2002; MILLSPAUGH e WASHBURN, 2004; THIEL et al., 2005; PEREIRA, 2008), são indispensáveis as informações sobre os padrões de excreção dos metabólitos hormonais, para a correta interpretação de resultados obtidos, bem como a determinação do momento do pico de excreção hormonal após o evento estressante e o material analisado.

3 Validação da mensuração dos metabólitos hormonais

As técnicas de imunoensaio são capazes de dosar pequenas quantidades de hormônios (nanograma) por apresentar alta sensibilidade e especificidade (ANHALT, 1975; JERICO et al., 2002). Em aves os primeiros ensaios foram para o estudo de sexagem em aves monomórficas, utilizando a

razão entre estrógeno: testosterona (CZEKALA e LASLEY, 1977; BERCOVITZ et al., 1978; STAVY et al., 1979).

O princípio dos ensaios imunológicos baseia-se na competição entre Antígenos (Ag) e Anticorpos (Ac). Assim, levando em consideração a pesquisa de metabólitos de glucocorticóides, ocorre a competição entre os antígenos da amostra com o antígeno marcado (Ag*), pelos sítios de ligação disponível no Ac escolhido para a realização do ensaio. Ocorre a formação de duas espécies de complexo: Ag*/Ac e Ag/Ac (GOLDSMITH, 1975; PARKER, 1981). A quantidade de ligação entre o Ag* com o Ac é lido por aparelhos capazes de quantificar essa reação, sendo esses valores convertidos em concentrações hormonais das amostras avaliadas. Esses valores obtidos podem ser transpostos em gráficos, visualizando-se os padrões (SPECTOR, 1973; WISDOM, 1976).

Na técnica de Enzimaimunoensaio (EIA), são utilizadas enzimas como marcadores, tais como Ac marcado com biotina que se liga à estreptavidina, peroxidase, fluorceína, acetilcolinesterase, α -galactosidase, glucoamilase ou fosfatase alcalina. Estas enzimas reagem com o substrato (selecionado de acordo com a enzima) adicionado durante o ensaio, havendo alteração de cor ou emissão de espectro de luz. Os leitores ópticos são capazes de verificar o comprimento de onda de luz que passa por cada amostra, sendo esse comprimento de luz convertido em concentração de substâncias presente nos fluídos biológicos (WISDOM, 1976).

Assim, para a viabilidade da técnica de EIA, as enzimas devem ter alta atividade específica, estar disponível em solução, passar por processo de purificação a baixo custo e de qualidade reprodutível. Devem também ter alta

estabilidade na forma livre e conjugada, tanto enquanto armazenada quanto durante o ensaio, além da presença de grupos reativos para ligações covalentes. O método de marcação deve ser simples, feito com substratos baratos, não tóxicos e estáveis que formam produtos cromogênicos ou fluorogênicos estáveis (PORSTMANN e KIESSIG, 1992).

A escolha do Ac utilizado para mensuração hormonal, principalmente de metabólitos presentes nas excretas, também influencia o resultado, sendo observado que resultados obtidos para uma espécie, normalmente não pode ser utilizado para outra espécie (BROWN et al., 2004). Essa diferenças deve-se à maior ou menor sensibilidade e especificidade do Ac pela amostra (MÖSTL et al., 2005). Devendo levar em consideração que nas excretas é observado apenas a presença de metabólitos, ao contrário de amostras sanguíneas, em que se tem o hormônio propriamente dito (RETTENBACHER et al., 2004; RETTENBACHER et al., 2006).

Essas técnicas têm se demonstrado adequadas para a mensuração das concentrações de gonadotrofinas, estrógenos, testosterona, lactogênio placentário, progesterona e glicocorticóides presentes em amostras sanguíneas e seus metabólitos presentes em amostras de urina e fezes, nas mais diversas espécies animais, tais como: elefantes, hienas, bovídeos, equídeos, marsupiais, cervídeos, felinos e aves (LEE et al., 1995; PALME e MÖSTL, 1997; HIRSCHENHAUSER et al., 1999; HIRSCHENHAUSER et al., 2000a; MÖSTL e PALME, 2002; MÖSTL et al., 2002; GANSWINDT et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2003; QUILFELDET et al., 2003; FRIGERIO et al., 2004; RETTENBACHER et al., 2004; BALTIC et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; STOWE et al., 2008; VAN METER et al., 2008; DITCHAM, et al., 2009;

FLAUGER et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; STOWE et al., 2010), sendo utilizado de forma crescente nos estudos de endocrinologia relacionados ao estresse e à reprodução.

Porém, devido a variação tanto na excreção quanto no tipo de análise laboratorial que pode ser utilizado, Möstl et al. (2005) revisaram a importância da validação da técnica de acordo com a espécie estudada, para avaliação correta das mensurações das concentrações de hormônios obtidas.

Palme, em relato pessoal (2008) disse que o uso inadequado dessas tecnologias pode levar a erros de interpretação dos resultados, tanto por falha na aquisição das amostras, falha no uso dos reagentes ou falha na leitura dos resultados, podendo, em muitos casos serem confundidos com reações fisiológicas ou patológicas.

Brown et al. (2004) relataram que não há necessidade de estabelecer um protocolo específico de dosagem para cada espécie e sim, realizar a validação dos testes a serem utilizados em cada espécie.

4 Métodos de validação da mensuração dos metabólitos hormonais

4.1 Validação laboratorial:

Para evitar erros de interpretação dos dados obtidos é imprescindível a validação dos testes (validação laboratorial) quanto a sua especificidade, acurácia, precisão e sensibilidade para cada espécie animal e amostra a ser avaliada (STANCZYCK et al., 2003; BROWN et al., 2004). Outro fator é a reprodutibilidade do ensaio, que depende também do controle de precisão da

pipetagem, controle da temperatura, tempo de incubação e análise dos dados (BROWN et al., 2004).

Deve-se também saber a sensibilidade do ensaio, ou seja, a menor quantidade confiável de hormônios detectada no ensaio. Ela é dividida em 2 tipos: menor quantidade de hormônio mensurável, diferente de zero e com um nível de confiança de 95% na curva-padrão; e menor quantidade de hormônio que pode ser mensurada por unidade de fluido biológico/excretas (quantidade de hormônios/ml de plasma ou g de fezes) (BROWN et al., 2004).

4.1.1 Curva de dose-resposta:

A curva dose-resposta é a principal ferramenta utilizada para a quantificação dos hormônios, assim sendo, tem-se que dose é a concentração de hormônio na amostra e a resposta é o sinal quantitativo, gerado no ensaio em resposta a uma determinada dose. Serve para saber a acurácia do teste (quantidade exata do hormônio presente na amostra), ou seja, se na amostra há algo inespecífico que se ligue aos anticorpos presente nos poços da placa/tubo (MÖSTL et al., 2005) e saber qual a melhor diluição a ser utilizada para dosar as amostras (BROWN et al., 2004).

4.1.2 Curva de paralelismo:

O teste de curva de paralelismo é realizado para demonstrar se as amostras têm comportamento semelhante à curva padrão (quantidade conhecida de hormônios), ou seja, se os metabólitos dos extratos estão

interagindo com o anticorpo de forma similar ao hormônios usado como padrão, e se as amostras estão localizadas dentro de valores confiáveis dentro de dosagem, sem subestimar ou superestimar os valores (BROWN et al., 2004; MÖSTL et al., 2005).

4.1.3 Controle de qualidade:

O teste de controle de qualidade é realizado para saber a precisão do teste, ou seja, a capacidade de reprodutibilidade da técnica empregada (MÖSTL et al., 2005). Sendo assim, são avaliados 2 tipos, sendo eles:

- coeficiente de variação intra-ensaio (dentro do mesmo ensaio), dado através da análise entre as duplicatas da mesma amostra, serve para verificar se houve variação de pipetagem;
- coeficiente de variação interensaios (entre diferentes ensaios), dado obtido usando a análise de replicatas da mesma amostra em diferentes ensaios, serve para verificar se houve alteração nas concentrações de uma mesma amostra (controles) entre os ensaios.

Geralmente a variação entre ensaios é maior que a variação dentro do ensaio. É importante que a concentração de hormônio (dose) tenha valores de resposta próximos, com um coeficiente de variação (CV) de no máximo 20% (BROWN et al., 2004).

4.2 Validação fisiológica:

Como os níveis hormonais e a resposta aos estímulos variam conforme a atividade reprodutiva, hormônio analisados e os fatores ambientais

(RODRIGUES et al., 1996; KOTRSCHAL et al., 1998; SOCKMAN e SCHWABL, 1999; WIKELSKI et al., 2000; HIRSCHENHAUSER et al., 2000a; HIRSCHENHAUSER et al., 2000b; NAKAGAWA et al., 2003; CHASTEL et al., 2005; PEREIRA et al., 2010), a validação fisiológica também é imprescindível para correta avaliação dos dados (MÖSTL et al., 2005)

A validação fisiológica pode ser realizada através de indução ou supressão da liberação hormonal, verificando assim, o padrão de excreção do hormônio de acordo com a espécie a ser estudada. As técnicas utilizadas para tal validação podem ser: administração de hormônio radiomarcado, administração de fármacos, variações dos fatores ambientais e de manejo (glucocorticoides) e variações durante a época reprodutiva (estrógenos, progesterona, testosterona) (SCANES, 2000; WASSER et al., 2000; GOYMANN et al., 2002; MILLSPAUGH e WASHBURN, 2004; PALME et al., 2005; TOUMA e PALME, 2005).

Lee et al. (1999) estudando a dinâmica de excreção fecal de esteróides sexuais (estradiol e testosterona) em duas espécies de psitacídeos observaram que a partir da administração intramuscular dos esteroides radiomarcados com C_{14} , o pico de excreção aconteceu após 4 horas. Tell (1997) relatou em cacatua (*Nymphicus hollandicus*) que a excreção fecal de metabólitos de testosterona foi de 74% nas primeiras 24 horas após injeção intramuscular de hormônio radiomarcado (C_{14}).

Em aves, assim como nos mamíferos, a relação temporal entre os níveis plasmáticos de ACHT, o evento estressor e a produção de glicocorticóides já foi comprovada em algumas espécies ou pela administração farmacológica ou

por fatores ambientais (ZENOBLE et al., 1985; HARVEY e HALL, 1990; KOVÁCS e PÉCZELY, 1991).

Apesar de Lothrop et al. (1985), observarem elevação plasmática de cortisol após a administração de ACTH apenas em psitacídeos sexualmente imaturos ou que apresentavam hiperadrenocorticismismo, Wasser et al. (2000) observaram elevação na excreção de metabólitos de glicocorticóides após desafio com ACTH em duas espécies de corujas (*Strix vari* e *Bubo virginianus*). O aumento da excreção após administração de ACTH também foi observado por Goymann et al. (2002), em machos e fêmeas de tordo europeu (*Saxicola torquata rubicola*), Nakagawa et al. (2003) em pinguim de Adélia (*Pygoscelis adeliae*), Denhard et al. (2003) em galinhas (*Gallus domesticus*), corvo (*Phalacrocorax carbo*) e açor (*Accipiter gentilis*) e Thiel et al. (2005) em tetraz-grande (*Tetrao urogallus*).

Assim, ao realizar a indução da adrenal, deve-se levar em consideração o tipo de hormônio utilizado, pois as células da adrenal da espécie em estudo podem não ser responsivas à administração do fármaco heterólogo (Carsia e Harvey, 2000).

Além da variação na resposta, é observado também alterações nos padrões de excreção entre as espécies. Essas variações são devido às diferenças de morfologia, taxa de passagem do alimento no trato gastrointestinal e taxa de metabolismo hormonal (KLASING, 2005).

A supressão da liberação hormonal por administração de fármacos ainda não está bem definida em aves. Em humanos a supressão é realizada para avaliar pacientes com Síndrome de Cushing, assim como em cachorros.

Com relação à supressão do sistema pituitário-adrenocortical após administração de dexametasona, Westerhof et al. (1996) observaram em pombos (*Columba livia domestica*) a supressão à administração de Arginina-vasopressina por até 48 horas após a administração de dexametasona (0,5 µg/kg e 0,5 mg/kg).

Westerhof (1998), revendo experimentos com administração de dexametasona (0,5 mg/kg IV), corticosterona (15 mg/kg IV) e prednisolona (3,5 mg/kg IV) em pombos (*Columba livia domestica*), relata maior tempo de supressão da adrenal com o primeiro hormônio, retornando às concentrações basais de corticosterona após 53 horas da injeção.

Bamberg et al. (2001) observaram em ratos (Sprague Dawley) machos com redução dos níveis de corticosterona cerca de 24 horas após o desafio com 1,0 mg/kg de dexametasona, mantendo estes níveis por dois dias, alterando o ciclo diário de excreção de corticosterona.

As concentrações de glucocorticóides apresentam elevações nas primeiras horas após a injeção com dexametasona, sendo possível que a alta afinidade a albumina seja responsável pela secreção inicial mais elevada nas primeiras horas, pois há maior disponibilidade plasmática de glucocorticóide livres circulantes.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Animais

Foram utilizados 24 Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), 12 machos e 12 fêmeas (Anexo B), provenientes de apreensões. Os animais permaneceram no Centro de Manejo e Pesquisa de Animais Silvestres (CEMPAS) da FMVZ-UNESP-Botucatu, sendo inicialmente mantidos em viveiros coletivo, separados por sexo.

Para a separação dos animais, foi realizada a sexagem através da técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), no Laboratório de Biologia Molecular Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Campus Botucatu. A metodologia empregada para extração de DNA total baseou-se no protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001).

Trinta dias antes do início dos experimentos, os animais foram alocados individualmente em gaiolas de metal, medindo 100 x 50 x 50 cm (altura x comprimento x largura) equipadas com poleiro e abrigo. Durante esse período, denominado de fase de adaptação à gaiola, os animais foram alimentados com ração comercial (BIOTRON® - Anexo C) e água *ad libitum*. Esse período também foi empregado para acostumar os papagaios aos procedimentos de coletas de fezes a cada três horas durante 48 horas (retirada e recolocação do fundo de gaiola), à contenção física e à presença da equipe (composta por quatro pessoas, sendo as coletas realizadas por duplas que se revezavam a cada seis horas).

As gaiolas foram dispostas em arranjo de dois andares, em baia cimentada, sem teto, totalmente telada e provida lateralmente de cobertura de

telhas de fibrocimento, os machos dispostos na fileira superior e as fêmeas na inferior (Figura 01).

Os experimentos ocorreram de 18 de agosto a 21 de outubro de 2010, Na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, latitude (22° 53’ 16,67” – Sul), Longitude (48° 29’ 54,11” – Oeste), altitude 889 metros, localizado no município de Botucatu- SP.



FIGURA 01 - Fotos da disposição das gaiolas.

2 Experimento I. Determinação de Anticorpo para mensuração de metabólitos de glucocorticóides em amostras urofecaís de Papagaio-verdadeiro, após desafio com solução de ACTH

2.1 Delineamento experimental:

Para esse estudo foram utilizados quatro animais (dois machos e duas fêmeas). Os animais foram contidos manualmente e receberam 25 UI de ACTH (A; Hormônio Adrenocorticotrópico de suíno, Sigma Aldrich Brasil Ltda) diluídas em 0,2 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) por via IM no músculo peitoral.

A administração foi realizada às oito horas da manhã (momento zero – m0); nesse momento e posteriormente a cada três horas, durante 24 horas consecutivas à administração dos tratamentos, foram colhidas amostras das excretas urofecaís. Para tanto, o fundo das gaiolas foi forrado com plástico.

Os procedimentos de administração de ACTH e coletas de amostras urofecaís ocorreram de 29 de setembro de 2010 à 20 de outubro de 2010.

Após as coletas as amostras foram imediatamente acondicionadas em microtubos plásticos, identificadas e armazenadas em freezer à -20°C.

2.2 Processamento das amostras:

Inicialmente as amostras foram liofilizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Campus Botucatu. 24 horas antes do procedimento, as amostras foram acondicionadas à temperatura de -70° C. Para a realização da liofilização, os tubos foram abertos, recobertos com papel alumínio perfurado, para evitar aspiração de

seus conteúdos, dispostos em *rack* de papelão e levados à liofilizadora (Edward do Brasil) à -45° C e pressão de 60 mbar por 12 horas. Posteriormente, as amostras foram retiradas do aparelho, tampadas e mantidas em freezer à -20° C até o momento da realização da extração dos metabólitos hormonais.

A extração dos metabólitos hormonais das amostras urofecais foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Campus de Botucatu, seguindo-se a metodologia de Möstl et al. (2005) modificada. As amostras liofilizadas foram homogeneizadas mecanicamente e alíquotas de $0,05 \pm 0,002$ g transferidas em tubos de poliestireno, acrescidas de um ml de metanol 80%, mantidas em vortexmultitube por 30 minutos em velocidade alta.

Posteriormente todos os extratos foram centrifugados a 500 xg por 20 min, o sobrenadante recuperado em microtubos com tampa e um volume fixo de 500 µL de extrato foi seco em estufa a 50° C por 14 h. Os extratos secos foram mantidos em bancada, em ambiente livre de luz solar direta até o momento da dosagem.

Os níveis de metabólitos de glucocorticóides urofecais foram mensurados através da Técnica de Enzimaimunoensaio Direto (EIA), no Departamento de Ciencias Biomédicas/Bioquímica da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, Áustria, conforme a técnica descrita por Möstl & Palme (2008).

Para a realização da dosagem, foram utilizadas placas de poliestireno contendo 96 poços (F96 MaxiSorp, nº 442404). Inicialmente as placas foram preparadas com 50 µL de proteína de ligação (Proteína A, SIGMA P-7837) e

incubadas em temperatura ambiente por 12 horas, após este período, a solução foi descartada e acrescentada com 0,3 mL da “segunda” solução de ligação (Trishydroxyaminomethane+NaCl+BSA+NaN₃) . A placa foi tampada e mantida em temperatura ambiente por pelo menos três horas.

Após este período, para a utilização das placas, a solução foi descartada e os poços lavados três vezes com solução de lavagem (Tween 20, Merck 822184), retirando o resto de líquido batendo suavemente a placa em papel toalha. Em cada placa foi realizada a pipetagem, em duplicata, de 30 µL da curva padrão com leituras de 2,0 a 500 pg/celula (S1= 7,8; S2=15,6; S3= 31,2; S4= 62,5; S5=125; S6= 250; S7= 500 pg/célula), específico para cada ensaio, 30 µL das amostras diluidas em diluente de ensaio na proporção 1:10, 30 µL dos controles, conforme Figura 02.



FIGURA 2: Ordem de pipetagem das soluções em placa de poliestireno contendo 96 poços, para realização de EIA. (NSB – Ligação não-específica, apenas a solução de ensaio; BO – Ausencia de Ligação, solução de ensaio e solução de ligação. S1 a S7 – Curva padrão, padrões para cada ensaio; Px – Controle de baixa concentração; Py – Controle de alta concentração; 1 a 35 – Amostras. (Fonte: Möstl & Palme, 2008)

Em seguida cada poço, exceto os NSB, recebeu 0,1 mL do antígeno marcado. Posteriormente todos os poços receberam 0,1 mL do Anticorpo. As placas foram mantidas em agitação suave por 12 h à 4° C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem gelada. Foi adicionada solução com Estreptavidina POD-Conjugado (Boehringer 1089153), preparado pouco antes do uso, e incubadas em agitador de placa por 45 minutos a 04° C. Depois se realizou nova lavagem com solução de lavagem gelada, por quatro vezes, adicionou-se solução de substrato para peroxidase (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine a 0,4% + H₂O₂ a 0,6%), incubou-se novamente as placas por mais 45 minutos à 04° C em agitação e adicionou-se 0,05 mL de solução de interrupção da reação enzimática (H₂SO₄ a 95-97%); a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro MultiPROBE® (Packard), sendo de 360 a 540 nm o comprimento de onda empregado para a leitura das amostras.

As avaliações de dose resposta e de paralelismo para a dosagem de metabólitos de glicocorticóides fecais foram realizados anteriormente em outro estudo (FUJIHARA, 2008).

2.3 Escolha do Ac:

Frigerio et al. (2001), Dehnhard et al. (2003) e Baltic et al.(2005) descrevem que o principal glucocorticóide produzido em aves é a corticosterona, assim foram selecionados os seguintes anticorpos, com diferentes especificidades, para verificar qual deles apresentava melhor ligação para os metabólitos de glucocorticóides presentes em excretas de papagaio-verdadeiro:

1) Cortisone – referencia 32a:

Neste ensaio foi empregado o anticorpo policlonal 4-pregnene-17 α , 21-diol-3, 11, 20-trione-21-HS:BSA, que apresenta reação cruzada de 100% para 4-pregnene-17 α , 21-diol-3, 11, 20-trione; 30% para 4-androstene-17 α , 21-diol-3, 11, 17-trione; 20% para 5 α -androstane-3, 11, 17-trione; 9% para 4-pregnene-11 β , 17 α , 20 α , 21-tetrol-3-one; 2,3% para 4-pregnene-3, 20-dione; 2,2% para 5 β -androsterone-3,11,17-trione; 1,8% para 4-pregnene-11 β , 21-diol-3,20-dione; 0,9% para 4-androstane-3,17-dione; 0,5% para 5 α -androstane-3,17-dione; e abaixo de 0,1% para 5 α -androstane-3 α -ol-11,17-dione; 5 α -androstane-3 β -ol-11,17-dione; 5 β -androstane-3 α -ol-11,17-dione, descrito inicialmente em galinhas da linhagem ISA Brown (RETTENBACHER et al., 2004).

2) Corticosterone - referência 72T:

Neste teste foi empregado o anticorpo policlonal 11-oxoaetiocholanolone-17-CMO-BSA que apresenta reação cruzada de 100% para 5 β -androstane-3 α -ol-11,17-dione; 37% para 5 β -pregnane-3 α -ol-11,20dione; 3,3% 5 β -androstane-3 α ,11 β -diol-17-one; 1,2% para 5 β -androstane-3,11,17-trione; <1% para 11-ketosndrosterone, etiocholanolone, pregnanediol, tetrahydrocortisol, 5 β -dihydro-cortisol, cortol, 5 β -pregnane3 α -ol,11 β ,21-triol-20-one, 5 β -pregnane-3 α ,11 β ,17 α ,20 α ,21-petol, 5 β pregnane-3 β -ol-11,20-dione e 5 β -pregnane-3 α ,11 β -diol-20-one, descrito em ovelhas, cervideos (*Cervus elaphus*) e elefante africano (*Loxodonta africana*) (MÖSTL et al., 2002; HUBER et al., 2003; GANSWINDT et al., 2003).

Em cada ensaio foi empregado o Ag específico 32a: 4-pregnene-17 α , 21-diol-3, 11, 20-trione-CMO-biotinyl-LC ou Ag 72T: 11-oxoaetiocholanolone-

17-CMO-biotinyl-3,6,9-trioxaundecanediamin; biotinyl-LC, bem como seu respectivo Ac (referências 32a ou 72T).

As amostras que apresentaram leitura de absorbância acima da curva padrão foram diluída em diluente de ensaio na proporção de 1:100, repetindo-se a dosagem empregando-se os mesmos procedimentos descrito anteriormente.

Para mensurar todas as amostras foram realizados 02 ensaios para o Ac 32a e 01 ensaio para o Ac 72T. Os coeficientes de variação para as amostras de baixa concentração foram: Intraensaio: média de 5,86% (variando de 3,86 a 7,86%), Interensaio: 1,56% e para as de alta concentração: Intraensaio: média de 4,41% (variando de 2,11 a 6,71%); Interensaio: 1,81%. A sensibilidade do ensaio foi de 0,02 pg/celula.

3 Experimento II. Validação fisiológica da mensuração de metabólitos de glucocorticóides nas excretas de Papagaio-verdadeiro

3.1 Delineamento experimental:

Para esse estudo foram utilizados todos os 24 animais, separados ao acaso em quatro grupos contendo três machos e três fêmeas cada:

Grupo Controle (GC): os animais não foram manipulados e apenas testemunharam os procedimentos realizados nos demais grupos.

Grupo Salina (GS): os animais foram contidos manualmente e receberam 0,2 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) por via intramuscular (IM) no músculo peitoral;

Grupo ACTH (GA): os animais foram contidos manualmente e receberam 25 UI de ACTH (A; Hormônio Adrenocorticotrópico de suíno, Sigma Aldrich Brasil Ltda) diluídas em 0,2 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) por via IM no músculo peitoral (WASSER et al., 2000);

Grupo Dexametasona (GD): Os animais foram contidos manualmente e receberam 1,0 mg/Kg de peso vivo de dexametasona (D; 2,0 mg/mL, Azium®, COOPERS) via IM, no músculo peitoral (WESTERHOF et al., 1996).

Os procedimentos foram realizados sempre às oito horas da manhã (m0); nesse momento e posteriormente a cada três horas, durante 24 h consecutivas à administração dos tratamentos, foram colhidas amostras das excretas urofecais. Para tanto, o fundo das gaiolas foi forrado com plástico.

Os procedimentos experimentais foram repetidos quatro vezes de modo que todos os grupos de animais passassem por todos os tratamentos. Entre cada replicata foi mantido intervalo de cinco dias. Os procedimentos de administração das soluções e as coletas de amostras urofecais ocorreram de 29 de setembro de 2010 à 20 de outubro de 2010.

Após as colheitas, todas as amostras foram condicionadas e processadas seguindo-se a mesma metodologia empregada no Experimento I.

As dosagens de metabólitos de corticosterona foram realizadas empregando-se o ensaio Cortisone 32a, empregando-se a mesma metodologia descrita no Experimento I.

Foram realizados 23 ensaios para mensuração de todas as amostras, sendo obtidos os seguintes coeficientes de variação para as amostras de baixa concentração: Intraensaio: média de 3,1% (variando de 0,8 a 6,05%), Interensaio: 6,06% e para as de alta concentração: Intraensaio: média de

5,71% (variando de 0,48 a 13,21%); Interensaio: 11,84%. A sensibilidade do ensaio foi de 0,02 pg/célula.

4 Experimento III. Validação do método de separação manual do urato da porção fecal das excretas, para a identificação dos padrões de excreção urinária e fecal dos metabólitos de glucocorticóides em Papagaio-verdadeiro.

4.1 *Delineamento experimental:*

Para esse estudo foram utilizados 22 aves, sendo 12 machos e 10 fêmeas.

Os animais foram contidos manualmente e receberam 25UI de ACTH (A; Hormônio Adrenocorticotrópico de suíno, Sigma-Aldrich Brasil Ltda) diluídas em 0,2 mL de solução salina (NaCl a 0,9%), por via IM no músculo peitoral e a seguir separados ao acaso em dois grupos, contendo seis machos e cinco fêmeas cada. Os procedimentos foram realizados sempre às oito horas da manhã (m0); nesse momento e posteriormente a cada três horas, durante 24 horas consecutivas à administração de ACTH, foram colhidas amostras das excretas, conforme descrito a seguir:

Grupo Fecal (GF): nesse grupo as gaiolas estavam forradas com papel absorvente. No momento da colheita foi realizada a remoção manual do urato e, com auxílio de papel absorvente, removida a porção líquida das excretas.

Grupo Urofecal (GU): nesse grupo as gaiolas estavam forradas com manta plástica. No momento das colheitas as excretas foram colhidas integralmente.

Os procedimentos de coletas de amostras fecais e urofecais ocorreram de 18 de agosto de 2010 à 20 de setembro de 2010.

Após as colheitas as amostras foram condicionadas e processadas seguindo-se a mesma metodologia empregada no Experimento I.

As dosagens de metabólitos de glucocorticóides foram realizadas empregando-se o ensaio Cortisone 32a, empregando-se a mesma metodologia do Experimento I.

Foram realizados 05 ensaios para mensuração de todas as amostras, sendo obtidos os seguintes coeficientes de variação para as amostras de baixa concentração: Intraensaio: média de 5,33% (variando de 0 a 13,13%), Interensaio: 6,06% e para as de alta concentração: Intraensaio: média de 4,21% (variando de 1,23 a 7,50%); Interensaio: 7,77%. A sensibilidade do ensaio utilizando-se o Ac 23a foi de 0,02 pg/célula.

5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico GraphPAD Prism 5. Os valores referentes às amostras não coletadas (22 de 864 valores no Experimento II; 15 de 308 valores no Exp III) foram substituídas por interpolação linear (média dos valores do antecessor e sucessor). Os valores atípicos (52 de 864 valores no Experimento II) foram retirados para a montagem das planilhas, utilizando-se o critério de Chaveunet (FIGUEIRA, 1998). Como os dados não apresentaram distribuição normal e variância homogênea, foi realizada a transformação logarítmica.

Os animais foram considerados repetições e os protocolos experimentais tratamentos. Para a comparação das variáveis estudadas entre os tratamentos e o controle foi utilizado o Modelo Linear Geral para Medidas Repetidas. Com o teste de Comparações Múltiplas Newman-Keuls, avaliou-se também o efeito do sexo e dos diferentes momentos sobre as concentrações hormonais, utilizando-se nível de significância de 95% ($p < 0,05$), GraphPAD Prism 5.

Como medidas de tendência central e de variabilidade dos dados, empregou-se a média e o desvio padrão nas tabelas. Nos gráficos foram utilizados a mediana e os quartis 25% e 75%, bem como os maiores e menores valores. Em cada tratamento, os valores das concentrações que encontravam-se acima da soma da média do valor inicial (m_0) com duas vezes o desvio padrão dos valores no m_0 , foram definidos como pico de excreção fecal e urofecal dos metabólitos de corticosterona (pico de excreção = média do momento zero + $2 \times$ desvio padrão), conforme descrito por Popp (2006).

RESULTADOS

1 Experimento I. Determinação de Anticorpo para mensuração de metabólitos de glucocorticóides em amostras uofecais de Papagaio-verdadeiro, após desafio com solução de ACTH:

O Ac imunomarcado Cortisone 32a apresentou maior capacidade de detecção de metabólitos de corticosterona em fezes de Papagaio verdadeiro após desafio com Solução de ACTH, essa capacidade de mensuração foi de até 6 vezes quando comparados os valores dos picos em relação ao valor basal (Figura 03). Portanto, a partir desses resultados, foi escolhido o ensaio Cortisone 32a para realização das mensurações das demais amostras.

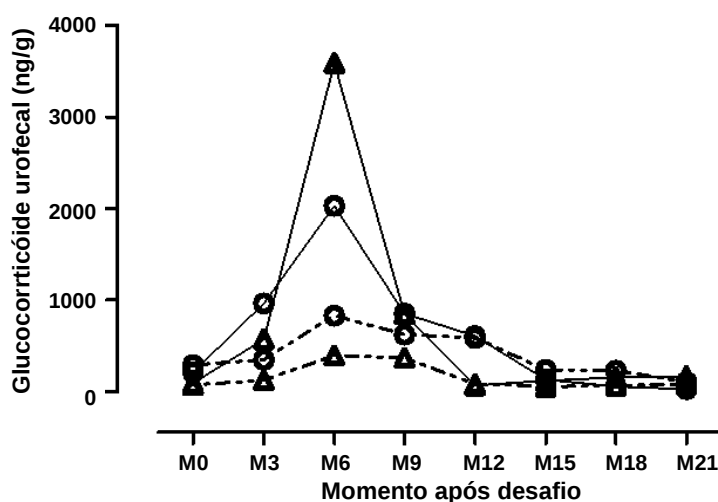


FIGURA 03: Níveis médios de metabólitos de glucocorticóides uofecais em Papagaio-verdadeiro (*A. aestiva*), obtidos em ensaios com os anticorpos policlonais referência Cortisone 32a (linha contínua ----) e Corticosterone 72T (linha tracejada - - -) em amostras uofecais de dois machos (O) e duas fêmeas (Δ), após administração de ACTH (m0) e a cada três horas, por 21 horas consecutivas.

Esses ensaios preliminares também serviram para identificar amostras de alta e baixa concentração, que foram empregadas para a confecção dos

controles de alta e baixa concentração, utilizados em todos os ensaios para a determinação dos coeficientes de variação intra e interensaio.

2 Experimento II. Validação fisiológica da mensuração de metabólitos de glucocorticóides nas excretas de Papagaio-verdadeiro:

A análise estatística dos resultados da dosagem de metabólitos de glucocorticóides em amostras uofecais de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), coletadas a cada três horas, durante 24 horas após desafio com solução salina, dexametasona e ACTH não detectou diferenças entre machos e fêmeas quando considerados efeitos de tratamento e de momento. Portanto, os dados de todos os animais foram reunidos e analisados conjuntamente. Os resultados obtidos, estão representados na Tabela 01 e Figura 04.

Quando analisados os momentos dentro de cada grupo (Tabela 01), foi identificado efeito de momento no grupo ACTH e detectado pico de excreção em m6 e m9; os valores retornaram às concentrações basais em m15.

No GC os valores permaneceram inicialmente estáveis, decresceram a partir de m9 e retornaram aos valores semelhantes aos iniciais a partir de m21.

No GS, observou-se efeito de momento com aumento na excreção detectado no m3, seguido da diminuição progressiva das concentrações, que alcançaram os menores valores em m12 e m15, retornando, posteriormente, à valores semelhantes aos iniciais em m24.

No GD foi também detectado efeito de momento e os maiores valores foram observados em m3 e m6. Posteriormente, os valores declinaram, alcançando valores semelhantes aos iniciais em m9 e inferiores a partir de m12, mantendo abaixo do inicial até o final do período experimental.

TABELA 01 – Valores médios $\pm$ desvios padrão de metabólitos de glicocorticóides em amostras urofecais (ng/g fezes) de 24 Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada 03 horas durante 24 horas após a injeção (m0=oitto horas da manhã) de Solução Salina (0,2 mL), Dexametasona (1,0 mg/Kg) e ACTH (25UI), pela técnica de EIA.

Momento	CONTROLE	SALINA	ACTH	DEXA
m0 (05 as 08h)	308,3 $\pm$ 251,3 ^A	233,3 $\pm$ 160,2 ^{AC}	272,2 $\pm$ 166,9 ^A	352,9 $\pm$ 276,3 ^A
m3 (08 as 11 h)	356,9 $\pm$ 296,7 ^{Aa}	325,5 $\pm$ 249,0 ^{Ba}	*1529,7 $\pm$ 1119,3 ^{Bb}	605,4 $\pm$ 378,1 ^{Bc}
m6 (11 as 14 h)	194,5 $\pm$ 98,0 ^{ABa}	248,4 $\pm$ 188,9 ^{ABa}	*2596,3 $\pm$ 1166,0 ^{Cb}	475,2 $\pm$ 206,7 ^{Bc}
m9 (14 as 17h)	144,0 $\pm$ 78,9 ^{Ba}	204,9 $\pm$ 126,7 ^{ACDa}	*2562,5 $\pm$ 2322,4 ^{BCb}	328,0 $\pm$ 144,5 ^{Ac}
m12 (17 as 20 h)	105,9 $\pm$ 73,5 ^{Ca}	130,3 $\pm$ 89,5 ^{Ea}	524,7 $\pm$ 357,8 ^{Db}	197,4 $\pm$ 92,7 ^{Cc}
m15 (20 as 23 h)	142,6 $\pm$ 72,9 ^{Ba}	141,5 $\pm$ 88,3 ^{Ea}	217,5 $\pm$ 105,5 ^{Ab}	185,7 $\pm$ 99,8 ^{Ca}
m18 (23 as 02 h)	151,4 $\pm$ 90,4 ^{Ba}	138,0 $\pm$ 70,2 ^{DEa}	231,5 $\pm$ 152,4 ^{Ab}	175,4 $\pm$ 70,7 ^{Cab}
m21 (02 as 05 h)	186,3 $\pm$ 166,1 ^{ABa}	152,9 $\pm$ 70,6 ^{CDE}	201,9 $\pm$ 119,7 ^A	145,1 $\pm$ 61,7 ^C
m24 (05 as 08 h)	291,0 $\pm$ 247,7 ^{Aa}	219,5 $\pm$ 103,8 ^{ABa}	274,9 $\pm$ 203,6 ^{Aa}	171,5 $\pm$ 70,2 ^{Cb}

Controle: animais não manipulados; letras maiúsculas diferentes na mesma coluna = diferenças entre os momentos dentro do mesmo tratamento ($p < 0,05$); letras minúsculas mesma linha = diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$); * = pico de excreção urofecal. Para o cálculo de média, desvio padrão e picos, foram retirados os valores atípicos. Os valores entre parênteses na coluna Momentos referem-se ao período de defecação das amostras urofecais

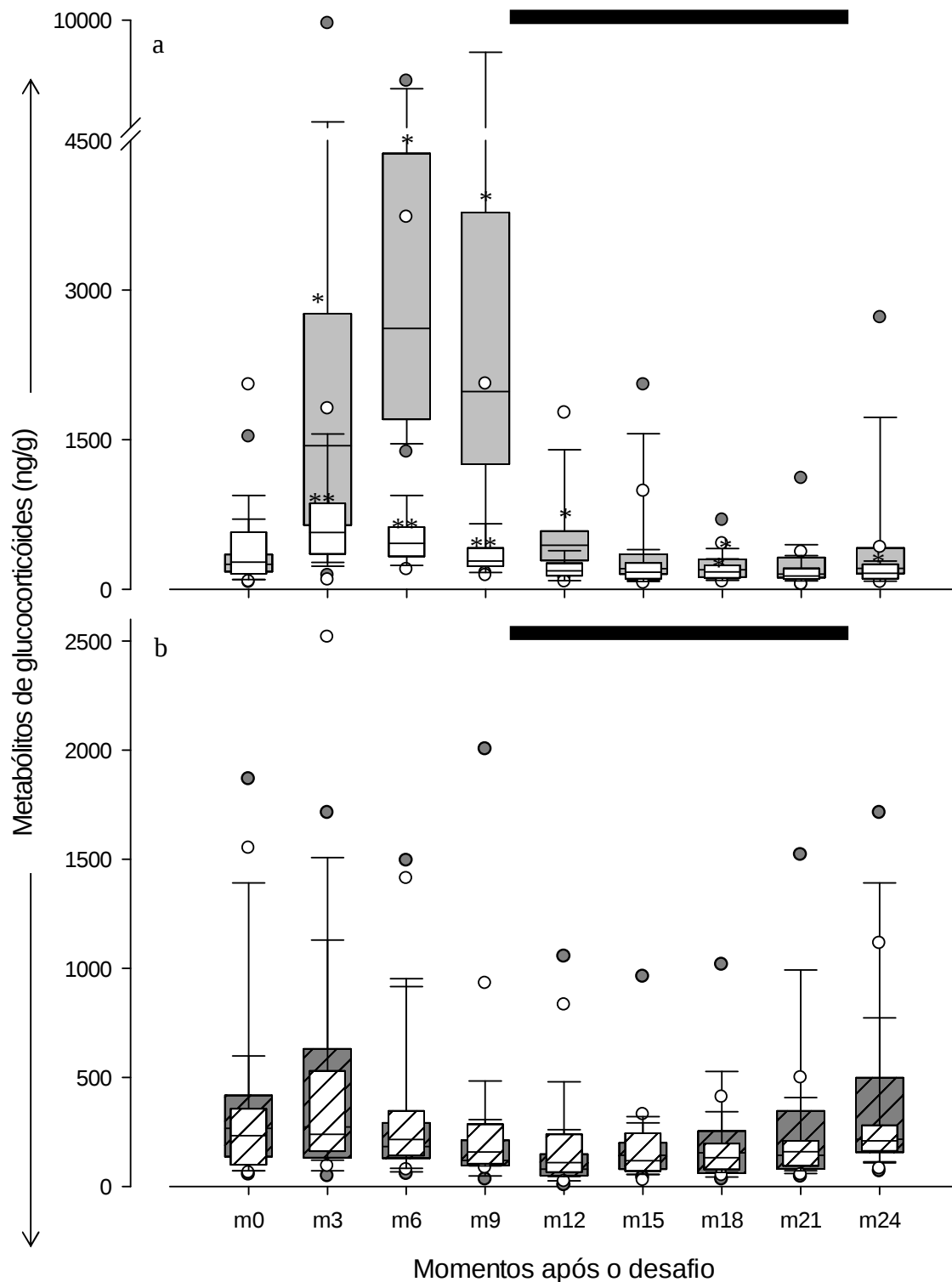


FIGURA 04 – Bloxplots da dosagem de metabólitos de glucocorticóides (ng/g) obtidos de amostras urofecaais de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) colhidas a cada 03 horas durante 24 horas após a administração de solução de ACTH (a, n=24, barra cinza), Dexametasona (a, n=24, barra branca) e Salina (b, n=24, barra branca cortada), pela técnica de EIA. Os animais Controle (b, n=24, barra cinza cortada) não foram manipulados. Valores atípicos representados por círculo cinza (a- ACTH, b- Controle), círculo branco (a – Dexametasona, b - Salina); * = diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$). Barra preta em cima dos gráficos indica período de coleta noturna.

3 Experimento III. Diferença de excreção de metabólitos de glucocorticóides em amostras Fecais x Urofecais:

A análise estatística dos resultados da dosagem de metabólitos de glicocorticóides em amostras fecais e urofecais de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), coletadas a cada três horas, durante 18 horas após desafio com solução de ACTH não detectou diferenças entre machos e fêmeas quando considerados efeitos de tratamento e de momento. Portanto, os dados de todos os animais foram reunidos e analisados conjuntamente. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 02 e na Figura 05.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre excreção fecal e urofecal. Quando analisados os momentos dentro de cada grupo (Tabela 02), foi identificado aumento de excreção de metabólitos de glucocorticóides em m3, com pico de excreção em m6 e retorno aos valores basais em m12, tanto nas amostras fecais quanto urofecais.

TABELA 02 - Valores médios $\pm$ desvios padrão de metabólitos de glucocorticóides fecais e urofecais (ng/g excreta) de 22 Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada 03 horas durante 18 horas após a injeção (m0 = oito horas da manhã) de Solução de ACTH (25UI), pela técnica de EIA.

Momento	FECAL	UROFECAL
m0 (05 as 08h)	256,7 $\pm$ 105,7 ^A	240,6 $\pm$ 159,2 ^A
m3 (08 as 11 h)	*1174,8 $\pm$ 830,9 ^{BD}	*1273,8 $\pm$ 767,5 ^{BD}
m6 (11 as 14 h)	*2053,3 $\pm$ 1278,2 ^C	*2425,1 $\pm$ 1237,0 ^C
m9 (14 as 17h)	*1583,6 $\pm$ 1037,7 ^{BC}	*1736,8 $\pm$ 1249,6 ^{BC}
m12 (17 as 20 h)	*565,9 $\pm$ 615,6 ^{AB}	*586,2 $\pm$ 533,8 ^{AD}
m15 (20 as 23 h)	321,6 $\pm$ 323,7 ^{AD}	253,3 $\pm$ 227,6 ^A
m18 (23 as 02 h)	242,4 $\pm$ 178,7 ^A	155,6 $\pm$ 119,8 ^A

letras maiúsculas diferentes na mesma coluna = diferenças entre os momentos dentro do mesmo tratamento ($p < 0,05$); * = pico de excreção. Para o cálculo de média, desvio padrão e picos, foram retirados os valores atípicos. Os valores entre parêntes na coluna Momento referem-se ao período de defecação das amostras fecais e urofecais.

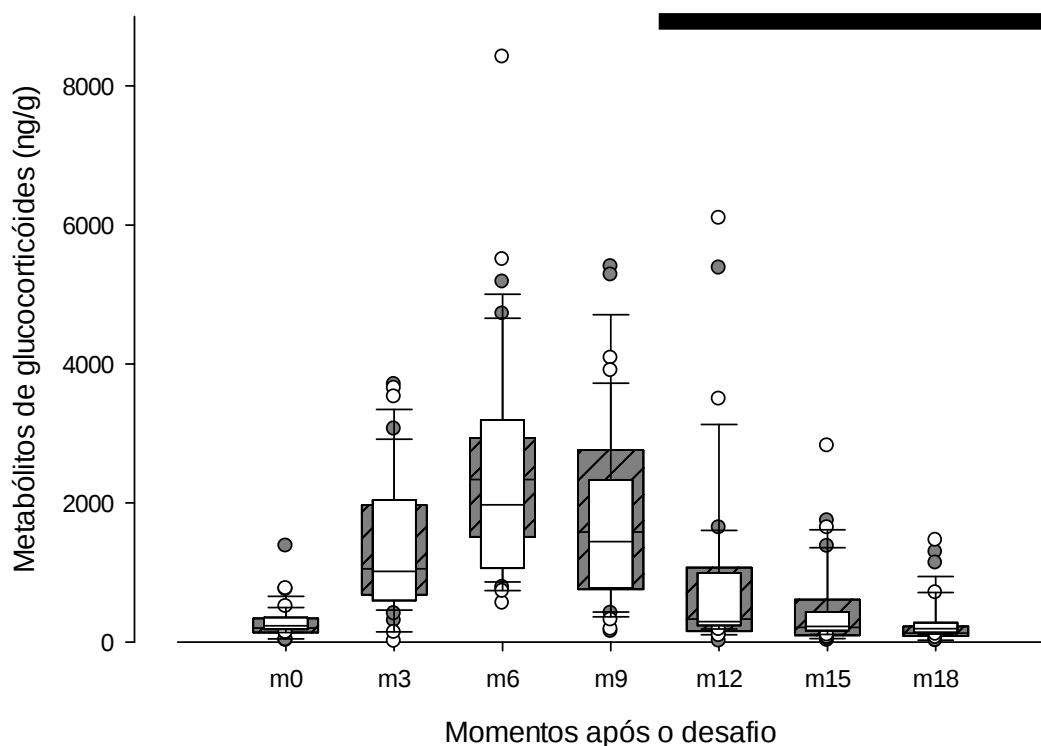


FIGURA 05 – Bloxplots da dosagem de metabólitos de glucocorticóides (ng/g) obtidas de amostras fecais (n=22, barra branca) e urofecais (n=22, barra cinza) de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), colhidas a cada 03 horas, durante 18 horas após a administração de solução de ACTH, pela técnica de EIA. Valores atípicos representados por círculo branco (amostra fecal) e círculo cinza (amostra urofecal). Barra preta em cima do gráfico indica período de coleta noturna.

DISCUSSÃO

O método não-invasivo de avaliação da adrenal, através da mensuração de metabólitos de glucocorticóides foi estabelecido e validado fisiologicamente pela primeira vez em Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*).

Utilizando-se a técnica de Enzimaimunoensaio (EIA), o anticorpo policlonal 4-pregnene-17 α , 21-diol-3, 11, 20-trione-21-HS:BSA (Cortisone - referencia 32a) apresentou maior capacidade de detectar as alterações nas concentrações de metabólitos de glucocorticóides nas excreções de Papagaio-verdadeiro, após administração de ACTH, quando comparado ao Ac Corticosterone 72T. Essa maior sensibilidade deve-se ao fato de nas excretas haver preservação da estrutura da molécula reconhecida pelo anticorpo 32a.

Ao avaliar o perfil da excreção de metabólitos de glucocorticóides dos animais do grupo controle, sugere-se que apresentam diferenças circadianas, ou seja, aumento da excreção às oito horas da manhã, pico de excreção às 11 horas e os menores níveis de excreção às 20 horas.

Ao contrário do revisado por Mormède et al. (2007), que em galinhas o aumento da secreção de glucocorticóides ocorria no final do período de luz, em Papagaio-verdadeiro a secreção parece estar relacionada com o final do período de escuro e início do período de luz. Os dados do presente estudo coincidem com o descrito por Kotrschal et al. (2000) que, em vertebrados diurnos, a secreção de glucocorticóides apresenta-se mais elevada nas primeiras horas do dia, preparando-os para o início do dia (CARSIA e HARLEY, 2000).

Levando em consideração que Westerhot et al. (1994) observaram aumento na concentração de corticosterona plasmática de pombas (*Columba*

livia domestica) uma hora antes do início do fornecimento de luz, mesmo quando invertido o fotoperíodo através de fornecimento de luz artificial, o perfil observado no presente estudo parece ser similar ao de pombas.

Hiebert et al. (2000) relataram que a padronização da técnica de restrição dos animais é essencial para comparar a resposta da adrenal ao estresse em diferentes indivíduos, populações ou ciclo anual, pois a presença humana foi capaz de influenciar a excreção de metabólitos de corticosterona em tetraz (*Tetrao tetrix*) (BALTIC et al., 2005). Já aves previamente contidas (logo após o nascimento) apresentaram menores valores de concentração plasmática de corticosterona quando submetidas à contenção manual para realização de vacinação quando comparadas com aves primo-contidas (COLLETTE et al., 2000).

Assim o processo de adaptação ao manejo realizado antes do início dos experimentos foi eficiente, pois a influência da contenção mecânica e do processo da injeção de substâncias no presente estudo pode ser considerada baixa, tendo em vista que os resultados obtidos no grupo salina em relação ao grupo controle não apresentaram diferenças nos níveis de excreção durante todo o Experimento II.

Outro fator importante que foi reduzido neste estudo é a influência de tipo de alimentação (WASSER et al, 1993; KLASING, 2005). Foi fornecimento de ração comercial e realizada a liofilização das amostras para a retirada do excesso de água. Porém foi impossível reduzir as influências das histórias da vida dos animais (ALTMANN et al., 2004), por serem aves provenientes de apreensões, podendo ser um dos fatores da presença de valores atípicos

encontrados em todos os grupos experimentais, principalmente em dois animais.

A solução de ACTH foi capaz de estimular a adrenal de Papagaio-verdadeiro em ambos os sexos. Foi observado aumento de nove vezes o valor basal na excreção dos metabólitos de glucocorticóides fecais, tanto nos machos (de 267,03 para 2.771,80 ng/g fezes) quanto nas fêmeas (de 229,31 para 2.782,68 ng/g fezes). Esses valores foram menores que os observados por Kotrschal et al. (2000) em gansos, que observaram valores de 80 a 140 vezes o valor basal após injeção de 3 UI de ACTH, e os dados observados por Nakagawa et al. (2003) em pinguins de Adelie (*Pygoscelis adeliae*) após a injeção de ACTH, que observaram aumento de 90 vezes o valor basal.

Lothrop et al. (1985) e Zenoble et al. (1985) injetaram ACTH em psitacídeos e dosaram cortisol e corticosterona plasmático. Lothrop et al. (1985) observaram que uma hora após a administração do ACTH (16 UI) as concentrações de corticosterona passaram de 3,25 para 26,47 ng/ml, mantendo as concentrações elevadas (25,69 ng/mL) até 2 horas após o ACTH. Já Zenoble et al. (1985) observaram elevação da corticosterona plasmática de 20,09 ng/mL para 105,8 ng/mL, 90 minutos após o ACTH (0,125 mg/ave). Em todos os estudos o cortisol manteve-se praticamente inalterado ou indetectável.

Walsh et al. (1985) em estudo feito com Cacatuas observaram aumento da corticosterona plasmático de 26 ng/mL para 108 ng/mL, 30 minutos após a injeção de ACTH. Os valores se mantiveram altos por três horas e decresceram para 40 ng/mL ao final de quatro horas.

Esses dados demonstram que a elevação da corticosterona sanguínea acontece antes de que se complete a primeira hora após a administração de ACHT.

Assim como Baltic et al. (2005), que observaram pico de excreção de metabólitos de corticosterona uma a duas horas após administração intravenosa de Corticosterona marcada em tetraz, o aumento de excreção de metabólitos de glucocorticóides em Papagaio verdadeiro foi observado nas primeiras horas após administração de ACTH.

Com base nos estudos de 1985 e, sendo que no presente estudo foram observados picos de metabólitos de glucocorticóides nas excretas após o momento da administração de ACTH (oito horas), tendo os valores mais elevados entre 11 e 17 horas, pode-se inferir que a elevação urofecal apresenta uma assincronia entre os valores sanguíneos de mais ou menos três horas.

No presente estudo não foram verificadas diferenças entre as concentrações de metabólitos fecais entre machos e fêmeas, a semelhança do observado em tetraz (*Tetrao tetrix*) (BALTIC et al., 2005).

Porém são descritas na literatura diferenças na excreção de metabólitos de glucocorticóides entre machos e fêmeas de diversas espécies de aves tais como corujas (*Strix occidentalis caurina* e *Strix occidentalis occidentalis*) (WASSER et al., 1997; WASSER e HUNT, 2005) e pardal (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) (ASTHEIMER et al., 1994). De maneira geral, esse autores observaram, após desafio com ACTH, maiores valores de metabólitos de glucocorticóides em machos, na época do acasalamento, o que parece estar envolvido com a defesa territorial, e em fêmeas, na época em que estão

envolvida com cuidados parentais (WASSER et al., 1997; WASSER e HUNT, 2005).

Como o presente estudo foi realizado no período de anestro dos Papagaios-verdadeiros (agosto à outubro) e com os animais não pareados; esses resultados são válidos para essa situação. Assim, existe a necessidade de se realizar novos estudos de mensuração de glucocorticóides nas excretas durante a estação reprodutiva e/ou com animais pareados para verificar se existe ou não um efeito da estação e da atividade reprodutiva na atividade adrenal nesta espécie.

Os valores fecais do presente estudo permaneceram elevados por até nove horas, indicando uma assincronia entre a queda dos níveis plasmáticos de cinco horas. A manutenção das concentrações de metabólitos de glucocorticóides em Papagaios-verdadeiros ocorreu por período mais prolongado em relação ao estudo de Walsh et al. (1985). Os achados de Walsh et al. (1985), apesar de não serem em Papagaios, sinaliza que existe uma persistência muito maior dos metabólitos nas fezes do que do hormônio no sangue. Esses dados contidos são de Cacatuas e necessitam ser avaliados com cuidado.

Semelhante ao verificado após o desafio com ACTH, em Papagaios-verdadeiros foi observado aumento das concentrações de metabólitos de glucocorticóides em amostras urofecais a partir de m3 após a administração de Dexametasona (1,0 mg/Kg); os valores contudo foram bem inferiores, decresceram ao longo do período experimental e tornaram-se semelhantes aos observados nos grupos Controle e Salina a partir do m15.

Entretanto, no final do período experimental os animais do grupo Dexametasona tinham valores inferiores ao observado antes do desafio, diferente do verificado nos outros grupos, em que houve o retorno aos valores iniciais.

Touma e Palme (2005) relatam que o teste de supressão da adrenal pela dexametasona é uma importante ferramenta para complementar os estudos de validação fisiológica da mensuração de glucocorticóides urofecaís. A Dexametasona, via mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA, reduz as concentrações plasmáticas de glucocorticóides e, conseqüentemente, as concentrações de metabólitos urofecaís (TOUMA e PALME, 2005), permitindo avaliar as mensurações reais dos valores de reação cruzada com outros esteróides. Além da validação fisiológica, o uso da dexametasona pode ser uma forma de reverter os efeitos deletérios devido às altas concentrações de glucocorticóides (PRATT & LISK, 1989 apud BONIER et al., 2007).

O teste com dexametasona foi realizado com sucesso em alguns mamíferos (ratos de laboratório, cachorros, gatos domésticos e humanos). Em aves, a inibição pela dexametasona foi detectada apenas no plasma de galinhas, não sendo observado inibição de liberação de metabólitos nas fezes (DEHNHARD et al., 2003; RETTENBACHER et al., 2004). Contudo Dehnhard et al. (2003) relata que a resposta à dexametasona pode estar relacionada com a dosagem administrada, a forma de manejo durante o experimento e a espécie animal avaliada.

Apesar da diferença estatística entre o grupo Dexametasona com os demais grupos no último momento de mensuração do Experimento II, não foi possível descrever a inibição da adrenal pela dexametasona em Papagaios-

verdadeiros, pois observa-se tendência de retorno dos valores à normalidade. A falta dos valores após 24 horas impede a confirmação da inibição ou não da adrenal após a administração da Dexametasona, necessitando de avaliação por tempo mais prolongado (mais de 24 horas após a administração).

No presente trabalho, após administração de ACTH, foi observado que o pico de excreção manteve-se desde o m3 até m12 no Experimento II e do m03 ao m12 no Experimento III, ao contrário do observado em duas espécies de corujas (*Strix vari* e *Bubo virginianus*) por Wasser et al. (2000), em que observaram picos de excreção de metabólitos de glucocorticóides às duas e às 12 horas.

Não foi possível verificar a assincronia entre os perfis de excreção fecal e urofecal em Papagaios-verdadeiros, pela técnica de separação do urato da porção fecal realizada no Experimento III. Sendo observado presença de picos de metabólitos de glucocorticóides de forma semelhante em ambas amostras.

Como os glucocorticóides são metabolizados pelos rins e pelo fígado, são excretado na urina e nas fezes dos animais em tempos diferentes. A bile fica armazenada na vesícula biliar e a sua secreção, em animais que apresentam essa estrutura, é estimulada pelo tipo de alimentação ingerido (CARSIA e HARVEY, 2000; KLASING, 2005). A ausência da vesícula em Papagaios pode ser um dos fatores que influenciou a não verificação de diferenças entre amostras fecais e urofecais, sendo os metabólitos provenientes do fígado, excretados diretamente nas fezes.

A consistência das fezes, que no presente estudo apresentaram-se mais pastosas, também pode ter dificultado na separação da porção do urato, sendo uma das possibilidades da observação de ausência de diferenças no

Experimento III, apesar de ter realizado a separação com auxílio de papel toalha.

Outra possibilidade de não poder ser descrita a supressão da adrenal é pelo fato de as injeções serem realizadas no período da manhã (08 horas), ao contrário do realizado por Bamberg et al. (2001) que realizaram a injeção às 18 horas e relatado por Mormède et al. (2007), com administrações às 20 horas. Ambos os autores relataram a supressão dos picos matutinos e, no presente experimento foi apenas observado redução ao longo do dia, conforme o ciclo observado no grupo controle.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos sob as condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que:

A técnica de Enzimoimunoensaio Direto, utilizando o Ac Cortisone – referência 32a, para dosagem de metabólitos de corticosterona presente em amostras fecais e uofecais é acurada, precisa e confiável, sendo capaz de detectar aumento de concentrações dos metabólitos de corticosterona tanto em machos quanto de fêmeas de Papagaios-verdadeiros.

A validação fisiológica por meio de desafio com solução de ACTH demonstrou que o ensaio imunoenzimático foi capaz de mensurar um aumento de nove vezes nos níveis de glicocorticoides fecais em relação à aplicação de dexametasona, solução salina e grupo controle. Com isso foi possível caracterizar um padrão de excreção de metabólitos fecais de glicocorticoides a partir do protocolo de validação fisiológica empregado.

No entanto não foi possível a identificação do padrão de excreção uofecal e fecal dos metabólitos de corticosterona, tanto em machos quanto de fêmeas de Papagaios-verdadeiros através do método de separação do urato das amostras fecais. Sendo possível avaliar as sem a separação do urato da porção fecal em amostras de Papagaio-verdadeiro.

Este trabalho fornece uma alternativa não invasiva para a realização de estudos relacionados ao estresse em Papagaios-verdadeiros, em substituição à colheita seriada de sangue.

REFERÊNCIAS¹

- ALTMANN, J.; LYNCH, J.W.; NGUYEN, N.; ALBERTS, S.C.; GESQUIERE, L.R. Life-History Correlates of Steroid Concentrations in Wild Peripartum Baboons. **Am. J. Primatol.**, v.64, p.95–106, 2004.
- ANHALT, J.E. Radioimmunoassay. **West. J. Med.**, v.132, p.300, 1975.
- ASTHEIMER, L.B.; BUTTEMER, W.A.; WINGFIELD, J.C. Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in Arctic passerine, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.94, p.33-43, 1994.
- BALTIC, M.; JENNI-EIERMANN, S.; ARLETTAZ, R.; PALME, R. A Noninvasive Technique to Evaluate Human-Generated Stress in the Black Grouse. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1046, p. 81–95, 2005.
- BAMBERG, E.; PALME, R.; MEINGASSNER, J.G. Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. **Lab. Anim.**, v.35, p.307–314, 2001.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; JANSSEN, N.S.C.R.M.; MOL, J.A. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. **Horm. Behav.**, v.30, n.3, p.272-279, 1996.
- BERCOVITZ, A.B.; CZEKALA, N.M.; LASLEY, B.L. A new method of determination in monomorphic birds. **J. Zoo Anim. Med.**, v.9, p.114-124, 1978.
- BISHOP, C.M.; HALL, M.R. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. **J. Zool.**, v.224, p.649-448, 1991.
- BONIER, F.; MARTIN, P.R.; WINGFIELD, J.C. Maternal corticosteroids influence primary offspring sex ratio in a free-ranging passerine bird. **Behav. Ecol.**, v. 18, p.1045–1050, 2007.
- BOONSTRA, R. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. **Integr. Comp. Biol.**, v.44, p.95–108, 2004.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BROWN, J.L.; WALKER, S.; STEINMAN, K. **Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. Thailand: Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park Endocrine Workshop on Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, 2004. 94p.

CAMPEDELLI, E. R.; FRANCO; M. R.; FÉLIX, T. M.; OLIVEIRA, N. J. F. **Levantamento das aves silvestres apreendidas no ano de 2007**, na cidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil 2009. In: Congresso ZOOTEC, 2009.

CARSIA, R.V; HARVEY, S. Adrenals, IN: WHITTOW, G.C. (ed): **Sturkie's Avian Physiology**, (ed. 5). San Diego, CA, Academic Press, 2000, pp 489-537.

CARVALHO, P.P. **Alterações patológicas encontradas em psitacídeos mortos em cativeiro de janeiro de 1994 a dezembro de 2002 no estado do Paraná**. Curitiba, 2004. 43p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2004.

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. **Horm. Behav.**, v.47, p.459– 466, 2005.

CHELINI, M.O.M.; SOUZA, N.L.; CORTOPASSI, S.R.G., FELIPPE; E.C.G.; OLIVEIRA, C.A. Assessment of the physiologic stress response by quantification of fecal corticosteroids. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, v. 45, p.7-10, 2006.

CHELINI, M.M.; OTTA, E.; YAMAKITA, C.; PALME, R. Sex differences in the excretion of fecal glucocorticoid metabolites in the Syrian hamster. **J. Compar. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol.**, v.180, p.919–925, 2010.

CHINNADURAI, S.K. **Evaluation of fecal glucocorticóides metabolite assays for short-term stressors and validation for stress monitoring in African herbivores**. 2006. 59f. Dissertação Mestrado. Universidade de Missouri, Columbia, 2006.

COCKREM, J.F.; ROUNCE, J.R. Faecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentrations in the Domestic Fowl. **Br. Poult. Sci.**, v.35, p.433-443, 1994.

COLLETTE, J.C.; MILLAM, J.R.; KLASING, K.C.; WAKENELL, P.S. Neonatal handling of Amazon parrots alters the stress response and immune function. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 66, p.335–349, 2000.

COOK, C.J. Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. **Physiol.Behav.**, v.75, p.169– 181, 2002.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. **Trends Ecol. Evol.**, v.16, n.9, p.491-497, 2001.

CZEKALA, N.M.; LASLEY, B.L. A technical note on sex determination in monomorphic birds using faecal analysis. In: OLNEY, P.J.S. (Eds.) **International Zoo Yearbook**. London: Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland, 1977. v.17, p.209-211.

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*). **Gen. Comp. Endocrinol.**,v.131, n.3, p.345-52, maio 2003.

DEVELEY, P.F. Métodos para estudos com aves. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. (Eds.) **Métodos de estudo em biologia da conservação & manejo da vida silvestre**. Curitiba: Editora UFPR, 2003. p.153-68.

DITCHAM, W., PALMER, C., WARREN, K., MONAGHAN, C., KAPPELLE, W., MATSON, P. Development of an Immunoassay to Measure Progesterone using Printed Biosensors, and its Application to the Assessment of Ovarian Function in the Numbat (*Myrmecobius fasciatus*). **J. Immunoassay Immunochem.**, v.30, p.232–243, 2009.

FIGUEIRA, M.M.C. **Identificação de outliers**. Millenium, nº12, 1998. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millenium/arq12.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

FLAUGER, B.; KRUEGER, K.; GERHARDS, H.; MÖLTL, E. Simplified method to measure glucocorticoid metabolites en faeces of horses. **Vet. Res. Comm.**, v.34, p.185-195, 2010.

FORSHAW, J. M. **Parrots of the World**. (ed.3) Melbourne, Editora Lansdowne. 1989.

FRIGERIO, D.; MOESTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted Metabolites of Gonadal Steroid Hormones and Corticosterone in Greylag Geese (*Anser anser*) from Hatching to Fledging. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.124, p.246–255, 2001.

FRIGERIO, D.; DITTAMI, J.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted corticosterona metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male greylag geese (*Anser anser*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.137, p.29-36, 2004.

FUJIHARA, C.J. **Validação de método não-invasivo para análise de hormônios ligados as estresse em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2008. 114 f. Dissertação Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

GALETTI, M.; GUIMARÃES JR, P.R.; MARSDEN, S.J. Padrões de riqueza, risco de extinção e conservação dos psitacídeos neotropicais. In: GALETTI, M.; PIZO, M. (Eds). **Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil**. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas, 2005. cap.1, p.17-26. Disponível em: <<http://ns.rc.unesp.br/ib/ecologia/fenologia/Papers/psitacideos.pdf>> Acesso em: 05 dez. 2005.

GANSWINDT, A.; PALME, R.; HEISTERMANN, M.; BORRAGAN., S.; HOLDGES J.K. Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male african elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.134, p.156-166, 2003.

GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: Review of Basic Principles. **Semin. Nucl. Med.**, v.5, p.125-152, 1975.

GOYMANN, W.; MÖLTL, E.; GWINNER, E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **Auk**, v.119, p.1167-1173, 2002.

HARKINEZHAD, T.; VERMINNEN, K.; VAN DROOGENBROECK, C.; VANROMPAY, D. Chlamydophila psittaci genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.1097–1100, 2007.

HARKINEZHAD, T.; VERMINNEN, K.; BUYZERE, M. DE; RIETZSCHEL, E.; BEKAERT, S.; VANROMPAY, D. Prevalence of *Chlamidophila psittaci* infection in a human population in contact with domestic and companion birds. **J. Med. Microbiol.**, v.58, p.207 – 1212, 2009.

HARVEY S.; HALL, T.R. Hormones and stress in birds: activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.342, p.453-460, 1990.

HIEBERT, S.M.; RAMENOFISKY, M.; SALVANTE, K.; WINGFIELD, J.C.; GASS, C.L. Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.120, p.235–247, 2000.

HIRSCHENHAUSER, K., MÖSTL, E., KOTRSCHAL, K. Within-pair testosterone covariation and reproductive output in greylag geese *Anser anser*. **Ibis**, v.141, p.577-586, 1999.

HIRSCHENHAUSER, K; MÖSTL, E; PÉCZELY, P; WALLNER, B.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Seasonal relationships between plasma and fecal testosterone in response to GnRH in domestic ganders. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.118, p.262–272, 2000a.

HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; WALLNER, B.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Endocrine and behavioural responses of male greylag geese (*Anser anser*) to pairbond challenges during the reproductive season. **Ethology** v.106, p.63–77, 2000b.

HUBER, S.; PALME, R.; ZENKER, W.; MÖSTL, E. Non-invasive monitoring of the adrenocortical response in Red Deer. **J. Wildl. Manage.**, v.67, p.258-265, 2003.

ICMBio/MMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Ministério do Meio Ambiente. **Lista animais ameaçados de extinção**. Brasília, 2011. Disponível em <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 20 DEZ. 2011.

IUCN – International Union for Conservation of Nature. **Red list of threatened species. Versão 2011.2**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 29 janeiro 2012.

JERICO, M. M.; MENDONÇA, B. B.; OTSUKA, M.; MARGANIN JR, A.; LARSSON, C. E. Non Radiometric Immunoassays [Fluoroimmunoassay (FIA) and Fluorometric Enzyme Immunoassay (FEIA)] with Radioimmunoassay (RIA) for Evaluation of Adrenal Function in Normal and Hypercortisolemic Dogs. **Cienc. Rural**, v.32, p.259-262, 2002.

KLASING, K.C. Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1046, p.5-165, 2005.

KOTRSCHAL, K.; HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E. The relationship between social stress and dominance is seasonal in greylag geese. **Anim. Behav.**, v.55, p.171–176, 1998.

KOTRSCHAL, K.; DITTAMI, J.; HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; PECZELY, P. Effects of physiological and social challenges in different seasons on fecal testosterone and corticosterone in male domestic geese (*Anser domesticus*). **Acta Ethol.**, v.2, p.115–122, 2000.

KOVÁCS, K.J.; PÉCZELY, P. Plasma adrenocorticotropin in domestic geese: Effects of ether stress and endocrine manipulations. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.84, p.192-198, 1991.

LEE, J.V.; WHALING, C.S.; LASLEY, B.L.; MARPER, P. Validation of an enzyme immunoassay for measurement of excreted estrogen and testosterone metabolites in the white-crowned sparrow (*Zootrichia leucophrys oriantha*). **Zoo Biol.**, v.14, p.97-106, 1995.

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

LEITE, K. C. E. **Análise da Estrutura Genética e Biologia reprodutiva do Papagaio- Verdadeiro (Amazona aestiva)**. 2007. XXX f. Dissertação Mestrado, Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília - DF, 2007.

LOTHROPS, C.D.; OLSEN, J.H.; LOOMIS, M.; JENSEN, J.M.; LENHARD, A. Evaluation of adrenal function in psittacine birds, using the ACTH stimulation test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.187, n.11, p.1113-1115, 1985.

LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1017–21, 2005.

MATOS, R. DE. Adrenal Steroid Metabolism in Birds: Anatomy, Physiology, and Clinical Considerations. **Vet. Clin. Exot. Anim. Practic.**, v.11, p.35–57, 2008.

MILLSPAUGH, J.J.; WASHBURN, B.E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.138, p.189-199, 2004.

MORMÈDE, P.; ANDANSON, A.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C.G.; RICHARD, R.; VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiol. Behav.**, v.92, p. 317–339, 2007.

MÖSTL, E; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Dom. Anim. Endocrinol.** v. 23, p. 67:74, 2002.

MÖSTL, E.; PALME, R. Measuring faecal steroid metabolites with enzyme immunoassays (EIA) on microtitre plates using biotinylated steroids as labels. Viena. 2008. 16p.

MÖSTL, E.; MESSMANN, S.; BAGU, E.; ROBIA, C.; PALME, R. Measurement of Glucocorticoid Metabolite Concentrations in Faeces of Domestic Livestock. **J. Vet. Med. A.**, v.46, p.621–631, 1999.

MÖSTL, E.; MAGGS, J. L.; SCHRÖTTER, G.; BESENFELDER, U.; PALME, R. Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. **Vet. Res. Comm.**, v.26, p.127-139, 2002.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone in bird's droppings: an analytical approach [review]. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1046, p.17-34, 2005.

NAKAGAWA, S.; MÖSTL, E.; WAAS, J.R. Validation of an enzyme immunoassay to measure faecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): a non-invasive tool for estimating stress? **Polar Biol.**, v.26, p.491–493, 2003.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M.N. Excretion of infusion ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Anim. Reprod. Sci.**, v.43, p.43-63, 1996.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **Int. J. Mammal. Biol.**, v.62, p.192-197, 1997.

PALME, R.; ROBIA, C.; MESSMANN, S.; HOFER, J.; MÖSTL, E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenocortical function. **Wien. Tierärztl. Mschr.**, v.86, p.237-241, 1999.

PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S.M.; MÖSTL, E. Stress hormones en mammals and birds - Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1040, p.162-171, 2005.

PARKER, C. W. Radioimmunoassay. **Ann. Rev. Toxicol.** v. 21, p. 113-132. 1981.

Disponível

em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pa.21.040181.000553>>

Acesso em 21 ago. 2011.

PEREIRA, R.J.G.; POLEGATO, B.F.; SOUZA, S.; NEGRÃO, J.A.; DUARTE, J.M.B. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, v.65, p.387–399, 2006.

PEREIRA, R.J.G. **Acompanhamento endócrino e comportamental da atividade reprodutiva anual de machos de falcão Quiri-quiri (*Falco sparverius*) de vida livre**. Jaboticabal, 2008. 83p. Tese (Doutorado) –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2008.

PEREIRA, R.J.G.; GRAZINOLLI, M.A.M.; DUARTE, J.M.B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.166, p.94–103, 2010.

POPP, L.G. **Sazonalidade da excreção de corticóides urofecaís e sua relação com o aspecto reprodutivo e de manejo em papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) em cativeiro.** 36f. 2006. Dissertação Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PORSTMANN, T. KIESSIG, S.T. Enzyme Immunoassay Techniques: An Overview. **J. Immunol. Methods**, v.150, p.5-21, 1992.

QUILLFELDT, P.; MÖSTL, E. Resource allocation in Wilson's storm-petrels *Oceanites oceanicus* determined by measurement of glucocorticoid excretion. **Acta Ethologica**, v.5, 115–122, 2003.

REDFORD, K.H. The Empty Forest. **BioScience**, v.42, p.412, 1992.

RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre.** 2001. Disponível em: <<http://www.rentas.org.br/pt/home/>>. Acesso em: 27 jan. 2012

RETTENBACHER, S.; MÖSTL, E.; HACKL, R.; GHAREEB, K.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **Br. Poult. Sci.**, v.45, p.407–711, 2004.

RETTENBACHER, S.; PALME, R.; BAMBERG, E. Distribution and elimination of radiolabelled corticosterone in chicken broilers. **Wien. Tierärztl. Mschr.** v.93, p.283-7, 2006.

RODRIGUEZ, A.B.; BARRIGA, C.; LEAF, R.W. Effect of prolactin, in vivo and in vitro, upon heterophil phagocytic function in the ring dove (*Streptopelia risoria*). **Dev. Comp. Immunol.**, v.20, n.6, p.451-457, 1996.

ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends Ecol. Evol.**, v.19, n.5, p.249-255, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SAPOLSKY, R.M.; L. MICHAEL ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr. Rev.**, v.21, p.55–89, 2000.

SCANES, C.G. Pituitary gland. IN: WHITTOW, G.C. (ed): **Sturkie's Avian Physiology**, (ed. 5). San Diego, CA, Academic Press, 2000, pp 437-460.

SEIXAS, G.H.F.; MOURÃO, G.M. Assessment of restocking blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Brasil. **Ararajuba**, v.8, p.73-78, 2000.

SEIXAS, G.H.F.; MOURÃO, G.M. Growth of nestlings of the Blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) raised in the wild or in captivity. **Ornitol. Neotrop.**, v.4, p.295–305, 2003.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. 3^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 2001. 912p.

SIEGEL, H.S. Physiological stress in birds. **Bio. Sci.**, v.30, p529-534, 1980.

SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.114, p.257-268, 1999.

SPECTOR, S. Radioimmunoassay. **Ann. Rev. Pharmacol.**, v.13, p.359-370, 1973.

STANCZYK, F.Z.; CHO, M.M.; ENDRES, D.B.; MORRISON, J.L.; PATEL, S.; PAULSON, R.J. Limitations of Direct Estradiol and Testosterone Immunoassay Kits. **Steroids**, v.68, p.1173-1178, 2003.

STAVY, M.; GILBERT, D.; MARTIN, R.D. Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. **Int. Zoo Yearb.**, v.19, p.209-214, 1979.

STÖWE M., BUGNYAR, T., SCHLOEGL, C., HEINRICH B., KOTRSCHAL, K., MÖSTL, E. Corticosterone excretion patterns and affiliative behavior over development in ravens (*Corvus corax*). **Horm. Behav.**, v.53, p.208-216, 2008.

STÖWE M.; ROSIVAL, B.; DRENT, P.J.; MÖSTL, E. Selection for fast and slow exploration affects baselines and stress-induced corticosterone excretion in great tit nestlings, *Parus major*. **Horm. Behav.**, In press: Doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.08.011.

TELL, L.A. Excretion and Metabolic Fate of Radiolabeled Estradiol and Testosterone in the Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). **Zoo Biol.**, v.16, p.505-518, 1997.

THIEL, D.; JENNI-EIERMANN, S.; PALME, R. Measuring corticosterone metabolite in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1046, p.96-108, 2005.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1046, p. 54–74, 2005.

VAN METER, P.E.; FRENCH, J.A.; BIDALI, K.; WELDELE, M.L.; BROWN, J. L.; HOLEKAMP, K.E. Non-invasive measurement of fecal estrogens in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.155, p. 464–471, 2008.

WALSH, M.T.; BELDEGREEN, R.A.; CLUBB, S.L.; CHEN, C.L. Effect of exogenous ACTH on serum corticosterone and cortisol concentrations in the Moluccan cockatoo (*Cacatua moluccensis*). **Am J Vet Res.**, v.46, p.1584-8, 1985.

WASSER, S.K.; HUNT, K. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1046, p.109-137, 2005

WASSER S.K.; THOMAS, R.; NAIR, P.P.; GUIDRY, C.; SOUTHERS, J.; LUCAS, J.; WILDT, D.E. Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus*). **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.569-574, 1993

WASSER, S.K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern Spotted Owl. **Conserv. Biol.**, v.11, p.1019-1022, 1997.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; BROWN, J.L.; COOPER, K.; CROCKETT, C.M.; BERCHERT, U.; MILLSPAUGH, J.; LARSON, S.; MONFORT, S. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.120, p.260–275, 2000.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; CLARKE, C.M. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOS, G.M.; HOUSE, C.; PEARL, M.C. (Eds.) **Conservation Medicine - Ecological Health in Practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p.131-144.

WESTERHOF, I. Pituitary-adrenocortical function and glucocorticoid administration in pigeons (*Columba livia domestica*). **J. Avian Med. Surg.**, v.12, p.167-177, 1998.

WESTERHOF, I.; VAN DEN BROM, W. E.; MOL, J. A. Responsiveness of the Glucocorticoid-Suppressed Pituitary-Adrenocortical System of Pigeons (*Columba livia domestica*) to Stimulation with Arginine Vasopressin. **Avian Dis.**, v.40, p.312-320, 1996.

WESTERHOF, I.; MOL, J.A.; VAN DEN BROM, W.E.; LUMEIJ, J.T.; RIJNBERK, A. Diurnal rhythms of plasma corticosterone concentrations in racing pigeons (*Columba livia domestica*) exposed to different light regimens, and the influence of frequent blood sampling. **Avian dis.**, v.38, p.428-434, 1994.

WHITTEN, P. L.; STAVISKY, R.; AURELI, F.; RUSSELL, E. Response of Fecal Cortisol to Stress in Captive Chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Am. J. Primatol.**, v.44, p.57-69, 1998.

WIKELSKI, M. ; HAU, M. ; WINGFIELD, J. Seasonality of reproduction in a Neotropical Rain forest bird. **Ecology**, v. 81, p.2458–2472, 2000.

WINGFIELD, C. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In: DAVEY, K.G.; PETER, R.E.; TOBE, S.S. (Eds.). **Perspectives in Comparative Endocrinology**. Ottawa: National Research Council Canada, 1994. p.520-528.

WISDOM, G.B. Enzyme-Immunoassay. **Clin. Chem.**, v.22, p.1243-55, 1976.

ZENOBLE, R.D.; KEMPPAINEN, R.J.; YOUNG, D.W.; CARPENTER, J.W. Effect of ACTH on plasma corticosterone and cortisol in eagles and condors. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.187, n.1, p.1119-1120, 1985.

ANEXOS

Anexo B

Dados (sexo, identificação no estudo, peso e identificação de origem) dos animais utilizados nos experimentos. Animais provenientes de apreensão e doados pelo Parque Estadual do Tietê (PET), Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” - Sorocaba (nº). Todos as animais estavam alocados no CEMPAS – Botucatu desde 2008.

sexo	ID animal	Peso (g)	ID de origem	sexo	ID animal	Peso (g)	ID de origem
MACHO	A	444	461	FÊMEA	M	365	FPZSP 121
	B	454	FPZSP C283		N	320	S/anilha
	C	412	FPZSP C245		O	480	FPZSP 676
	D	384	FPZSP C248		P	400	PET 10.5 14304
	E	470	FPZSP C321		Q	380	PET 10.5 14308
	F	448	460		R	345	FPZSP 130
	G	306	YURI 033		S	460	S/ anilha
	H	525	463		T	366	Anilha sem nº
	I	432	FPZSP C291		U	380	PET 10.5 14281
	J	404	FPZSP C237		V	430	PET 10.6 14306
	K	430	S/ anilha		X	392	S/ anilha
	L	410	FPZSP C 305		Z	435	PET 10.5 14292

ANEXO C

Descrição da composição básica e níveis de garantia da ração extrusada para psitacídeos de grande e médio porte- Biotron®, utilizada para alimentar as aves durante a realização do experimento.

Composição Básica do Produto: Quirera de Arroz, Calcário Calcítico, Fosfato de Bicalcico, Aroma de Frutas, Farelo de Soja, Milho Moído, Óleo Vegetal, Cloreto de Sódio (Sal Comum), Corante, Premix Vitamínico Mineral.

Vitaminas:	Minerais:	Amioácidos:
Vitamina A	Selênio (orgânico)	Lisina
Vitamina D	Manganês	Metionina
Vitamina E	Ferro	Triptofano
Vitamina K3	Cobre	Triosina
Vitamina B1	Iodo	
Vitamina B2	Zinco (orgânico)	
Vitamina B12	Cobalto	
Vitamina B6	Cromo	
Acido Pantotênico		
Niacina		
Colina		
Ácido fólico		
Biotina		
Vitamina C		

Níveis de Garantia:

Umidade (máx.)	13 %
Proteína bruta (mín.)	16 %
Extrato etéreo (mín.)	1,2 %
Matéria fibrosa (máx.)	3 %
Matéria mineral (máx.)	4,8 %
Cálcio (máx.)	1,6 %
Fósforo (mín.)	0,45 %

fonte: <http://www.biotronzootecnica.com.br/produtos-interna.aspx?codigo=30>

ARTIGO

Dosagem de metabólitos de glucocorticóides e progesterona em fezes de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)

Este artigo científico está descrito de acordo com as normas para a publicação da revista *Ciência Animal Brasileira*, descrito abaixo:

Como parte do processo de submissão, autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão com todos os itens listados a seguir. Serão devolvidas aos autores as submissões que não estiverem de acordo com as normas. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Em caso de citação de autores, "Autor" e ano são usados na bibliografia e notas de rodapé, ao invés de Nome do autor, título do documento, etc.

Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Os textos devem ser organizados da seguinte forma: 1- título; 2- nomes dos autores (por extenso); 3- filiação científica (informar departamento, instituto ou faculdade, universidade, CEP, cidade, estado país e e-mail); 4- resumo (na língua principal do texto e em inglês - Summary, com um máximo de 200 palavras); 5- palavras-chave (máximo de cinco, apresentadas na língua do texto e em inglês - Keywords); 6- introdução; 7- material e métodos; 8- resultados e discussão (separados se necessário); 9- conclusões; 10- agradecimentos (se necessário) e 11- referências bibliográficas, em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e seguir a NBR 6023, da ABNT.

Dosagem de metabólitos de glucocorticóides e progesterona em fezes de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)

Glucocorticoid and progesterone metabolites in feces of Blue-fronted-Parrot (*Amazona aestiva*)

RESUMO

Quinze *A. aestiva* foram inicialmente avaliados por sexagem, sendo selecionado oito animais e separados em dois grupos, um controle e outro com administração de ACTH. A estimulação da adrenal com 25UI/animal de ACTH resultou na elevação das concentrações de metabólitos de cortisol, corticosterona e progesterona fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). O estudo demonstrou picos de concentração de metabólitos de cortisol, corticosterona e progesterona uma entre duas e quatro horas e outra entre oito e dez horas. Não foram detectados diferenças significativas entre os grupos controle e tratamento, exceto quando comparados fêmeas e machos de grupos distintos.

Palavras-chave: Cortisol; corticosterona, progesterona; psitacideos, *Amazona aestiva*, aves, avaliação não-invasiva de estresse.

SUMARY

Fifteen *A. aestiva* evaluated, were sexed and was select eight animals, separated into two groups with four animals per group and receiving or not ACTH. Adrenal stimulation of Blue-Fronted Parrot (*Amazona aestiva*) was achieved after ACTH administration (25UI/animal), and shown by an increase in cortisol, corticosterone and progesterone metabolites in feces This study has shown cortisol, corticosterone and progesterone metabolites concentrations peaks at 2-4 hour and 8-10h post ACTH inoculation, although lacking hormone metabolites standards for parrot feces. No significant differences were observed between levels found in control and cortisol groups, although different in female and male collections. **Keywords:** Cortisol; corticosterone, progesterone, psittacines, *Amazona aestiva*, bird, noninvasive evaluation of stress.

INTRODUÇÃO

As aves representam o grupo o mais abundante e diverso entre os vertebrados, a maioria apresenta hábito diurno e vocaliza com frequência (SICK, 2001; DEVELEY, 2003). Segundo a lista de aves da IUCN (2004) há 9.917 espécies descritas no mundo, no Brasil há cerca de 1.700 espécies descritas, sendo 170 endêmicas.

A ordem Psittaciformes está entre as mais ameaçadas deste grupo; das espécies da família Psittacidae, cujos representantes mais conhecidos são as araras (*Ara* e *Anodorhynchus*), papagaios (*Amazona*), maracanãs (*Propyrrhura*), periquitos (*Brotogetis*), tuins (*Forpus*), maritacas (*Pionus*), além de espécies africanas (*Agapornis* e *Psittacus*), asiáticas e da Oceania (*Loris*, *Trichoglossus*, *Kakapo* e *Nestor*), 95 correm risco de extinção sendo que para 28% destas o risco é eminente (IUCN, 2004; GALETTI et al., 2005).

A degradação do habitat, a perseguição humana para comércio de animais e suas penas, bem como a caça e coleta dos ovos e filhotes são os principais fatores para o declínio de muitos psitacídeos. Isto, associado à introdução de espécies predadoras ou competidoras, endogamia, destruição das espécies de árvores utilizadas para nidificação e processos relacionados com o desenvolvimento antrópico (GALETTI et al., 2005), provocam estresse crônico e, com isso, alterações no sistema hipotálamo-pituitária-adrenal, desequilibrando os processos catabólicos (mobilização de energia) e anabólicos (reparação, cicatrização e crescimento), que ao longo do tempo podem afetar negativamente a sobrevivência, a reprodução e a resistência às doenças (BOONSTRA, 2004; ROMERO, 2004; LUNDBERG, 2005).

Com a crescente preocupação com a biodiversidade há a necessidade da criação de programas de conservação (COCKREM, 2005), que monitorem e verifiquem os impactos sobre a saúde dos animais. Entre os diversos métodos de monitoramento, destaca-se a dosagem hormonal, por meio da qual, entre outros, pode se observar o nível de estresse nos animais (WASSER et al., 2000).

Em amostras fecais, para que as dosagens possam ser realizadas, torna-se necessária a validação das técnicas de quantificação hormonal, pois a forma e o tempo de excreção dos metabólitos dos hormônios variam consideravelmente entre as espécies (WASSER et al., 2000; GOYMANN et al., 2002; DENHARD et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2003; CHINNADURAI, 2006).

Devido à variabilidade dos níveis hormonais de acordo com a espécie estudada e a carência de trabalhos de dosagem hormonal por método não-invasivo em espécies

67 brasileiras, os objetivos do presente trabalho foram: verificar o tempo de excreção fecal
68 do cortisol, corticosterona e progesterona, pelo uso do Enzimoimunoensaio Direto
69 (EIA) para mensurar metabólitos de Cortisol e do Radioimunoensaio (RIA) para
70 mensurar os metabólitos de Corticosterona e Progesterona fecal em papagaio-verdadeiro
71 (*Amazona aestiva*).

72

73 MATERIAL E MÉTODOS

74 Foram selecionados 15 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) hígidos,
75 adultos, porém com idades variadas e sem comprovação do status reprodutivo,
76 provenientes de apreensões realizadas pela Polícia Militar Ambiental e destinadas ao
77 Centrofauna (Projeto de Reabilitação e Soltura de Animais Silvestres), localizado no
78 município de Botucatu-SP.

79 Entre os meses de março à maio de 2007, foram realizadas colheitas de canhão
80 de pena das aves, para realização da sexagem, através da técnica de PCR (“Polymerase
81 Chain Reaction”), no Laboratório de Biologia Molecular Animal do Departamento de
82 Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Campus Botucatu.

83 As amostras de tecido obtidas (bulbos de penas em crescimento) foram mantidas
84 em álcool 100% em freezer a -20°C até seu processamento para isolamento de DNA. A
85 metodologia empregada para extração de DNA total baseia-se no protocolo descrito por
86 Sambrook & Russell (2001) que emprega fenol-clorofórmio.

87 A partir dos resultados obtidos foram selecionados, de forma aleatória, 8
88 indivíduos, sendo 04 machos e 04 fêmeas. Os animais foram inicialmente divididos em
89 2 grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo Tratamento (GT), composto por 2 machos e 2
90 fêmeas em cada grupo. Os animais do GC receberam 0,2 ml de solução salina (0,9%
91 NaCl)/indivíduo e os do GT receberam 25 UI/animal de ACTH (Hormônio
92 Adrenocorticotrópico de suíno, Sigma-Aldrich Brasil Ltda), ressuspenso em solução
93 salina, totalizando 0,2 ml de solução de ACTH/indivíduo, todos por via intramuscular
94 no músculo peitoral.

95 O procedimento foi repetido após intervalo de 7 dias, de modo que, os animais
96 que inicialmente foram alocados no GC passaram a fazer parte do GT e, os inicialmente
97 alocados no GT, passaram a fazer parte do GC.

98 As colheitas fecais foram realizadas entre maio a junho de 2007 no Centrofauna
99 (Projeto de Reabilitação e Soltura de Animais Silvestres), localizado no município de
100 Botucatu- São Paulo- Brasil.

101 No dia da realização do experimento, os animais foram removidos do viveiro
102 coletivo, acondicionados em gaiolas individuais (com aproximadamente 50 cm de
103 largura e profundidade, por 60 cm de altura) com fundo forrado com papel e
104 transportados para uma sala onde foi realizado o experimento. O tempo máximo entre a
105 captura das aves até a administração da solução foi de no máximo 15 minutos.

106 Todos os animais receberam ração extrusada para psitacídeos (Alcon®),
107 alimento para papagaio com frutas (Nutripássaros®), sementes e frutas frescas (girassol,
108 banana, abacaxi, pêra, kiwi, goiaba, maçã, laranja, caqui, maracujá doce e mamão),
109 sendo a água disponível à vontade. A temperatura média nos dias de colheita foi entre
110 05 a 18°C, sendo chuvoso apenas na 1ª coleta e os demais foram ensolarados.

111 Foram coletadas amostras individuais de fezes logo após a administração da
112 solução correspondente (ACTH para o grupo tratamento e solução salina para o grupo
113 controle), e a cada 30 minutos, sendo as amostras agrupadas a cada 01 hora, perfazendo
114 10 horas de coletas. O forro de papel era trocado após cada coleta para evitar possíveis
115 contaminações das amostras. Todas as amostras permaneceram resfriadas por até 10
116 horas, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável (5°C).

117 Todas as amostras foram acondicionadas em criotubos, submetidas à
118 liofilização, realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de
119 Botucatu, UNESP-Campus Botucatu, segundo protocolo do departamento. Os tubos
120 contendo as amostras foram protegidas com folha de papel alumínio perfurado para
121 evitar possível sucção da amostra pelo liofilizador, os mesmos foram dispostos em *rack*
122 de papelão, mantidas em freezer a -70°C e levados à liofilizadora (Edward do Brasil) à -
123 45°C e pressão de 60 mbar por 12 horas. As amostras foram retiradas do aparelho,
124 tampadas e mantidas em freezer à -20°C até a extração e dosagem hormonal.

125 A extração foi realizada no Laboratório de Dosagem Hormonal do
126 Departamento de Zootecnia da UNESP-Jaboticabal. Para a extração hormonal das
127 amostras fecais foi empregada a metodologia descrita por Grahnan et al. (2001)
128 modificada. Amostras de 0,05 g ($\pm 0,002$) de fezes liofilizadas foram diluídas em 1 ml
129 de metanol 80%, levadas ao agitador (vórtex) em velocidade máxima para a primeira
130 homogeneização, lembrando de manter o mínimo de amostra aderido à parede e
131 mantidos em agitador Kline® por 12 horas (*overnight*). O extrato foi centrifugado a 500
132 xg por 20 minutos, o sobrenadante recuperado em tubos de vidro com tampa e mantido
133 em freezer à -20°C até a dosagem.

Os níveis de metabólitos de cortisol fecal foram mensurados através de Enzimoimunoensaio Direto (EIA) no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Zootecnia da UNESP-Jaboticabal e os de corticosterona e progesterona fecal, através da Técnica de Radioimunoensaio, no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-Botucatu. Para tanto, os procedimentos para a validação laboratorial do método de dosagem hormonal foram realizados no trabalho descrito por Fujihara (2008).

No EIA foram utilizadas placas de poliestireno contendo 96 poços, as placas foram incubadas com 50 µl de anticorpo policlonal anti-cortisol (cortisol R4866- C. Munro, Universidade da Califórnia, Davis, CA) acrescido de 5 ml de solução coating *buffer* e mantidas em geladeira por 12 horas. Após esse período, as placas foram lavadas com solução de lavagem e 50 µl das amostras foram adicionadas em cada célula, assim como o padrão e os controles, sempre em duplicata, mantidas em incubação sem agitação por 01 hora. As placas foram novamente lavadas e adicionados 10 µl de solução ABTS (40 µl 0,5 M H₂O₂ + 125 µl 40 mM ABST + 12,5 µl solução tampão), mantidas em incubação com agitação por até 60 minutos ou até que a amostra contendo o padrão “zero” atingisse valores de leitura de densidade óptica entre 0,9 a 1,0. A leitura foi realizada pelo aparelho de contagem Revelation Dynex®.

Para dosagem de corticosterona e progesterona por Radioimunoensaio foram utilizados Kits comerciais de fase sólida Coat-A-Count® Rat-Corticosterone da DPC-MedLab (Ref. TKRC1-100 tubos; Los Angeles-Califórnia) e Cost-A-Count® Progesterona da DPC-MedLab (Ref. TKPG2- 200 tubos, Los Angeles-Califórnia), respectivamente, conforme as instruções do fabricante, as leituras foram realizadas pelo aparelho de contagem Gama Counter® – Cobra II (Packard BioScience Company).

Para saber o pico de excreção dos níveis fecais de metabólitos de glucocorticóides (GCs) e progesterona, após a administração de ACTH, os valores experimentais obtidos foram examinados empregando-se a média e o desvio padrão, respectivamente, como medidas de tendência central e de variabilidade dos dados.

A análise estatística dos dados de cortisol foi realizada pelo pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Os animais foram considerados repetições e os protocolos experimentais tratamentos. Para a comparação das variáveis estudadas entre os tratamentos e o controle foi utilizado o *Procedimento General Linear Model* (PROC GLM), com o teste de Student-Newman-Keuls (SNK), avaliando também o efeito do sexo e dos diferentes horários sobre as concentrações hormonais. As

possíveis correlações existentes entre as variáveis estudadas foram verificadas através do *Proc Corr.* Para todas as avaliações utilizou-se o nível de significância de 95% ($p < 0,05$)

171

172 **RESULTADOS**

173 As curvas de dose-resposta obtidas na validação laboratorial da dosagem por
174 EIA de metabólitos de cortisol em amostras fecais diluídas nas proporções de 1:4 e 1:8,
175 adicionadas de quantidades conhecidas de cortisol é representada, respectivamente,
176 pelas equações $y = 0,8458x$ com $r^2 = 0,9288$ (Figura 03) e $y = 1,1208x$ com $r^2 = 0,9816$; e
177 por RIA de metabólitos de corticosterona em amostras fecais adicionadas de
178 quantidades conhecidas de corticosterona, representada pela equação $y = 0,7837x$ com
179 $r^2 = 0,9988$.

180 Os resultados da dose-resposta e as curvas padrão e diluição construídas para a
181 realização do teste de paralelismo, tanto para dosagem de cortisol pela técnica de EIA
182 quanto de corticosterona pela de RIA, apresentaram valores dentro da região de
183 confiabilidade do ensaio, indicando que não houve fatores interferentes nos resultados
184 das análises (FUJIHARA, 2008).

185 Os coeficientes de variação inter-ensaio foram 7,26% ($n=6$) e 16,33% ($n=4$),
186 enquanto que o intra-ensaio foi de 6,8% e 13,97%, para as mensurações por EIA e RIA
187 respectivamente.

188 Os valores médios e os desvios-padrão para a dosagem de metabólitos de
189 cortisol em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) obtidas durante
190 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais
191 dos GC e GT, estão representados nas Figuras 03 (todos os animais), 04 (machos e
192 fêmeas).

193 Empregando-se o conceito de que o pico de excreção de metabólitos fecais
194 caracteriza-se quando o valor médio obtido em um dado momento for maior que a
195 média do GC adicionada de 1,5 vezes o desvio padrão observados quando são
196 considerados todos os valores encontrados, foram identificados os seguintes picos: três
197 horas após a administração da solução salina nas fêmeas e nos machos do GC e dez e
198 três horas após a administração de ACTH, respectivamente, nas fêmeas e machos do
199 GT. Considerando-se todos os animais, foram determinados os seguintes picos: três
200 horas após a administração da solução salina e dez horas após a administração de
201 ACTH.

Através do teste de SNK , não foram detectados efeitos de grupo, momento ou sexo nos resultados observados, exceto entre as fêmeas do GC e os machos do GT na hora cinco e entre os machos do GC e as fêmeas do GT na hora dez.

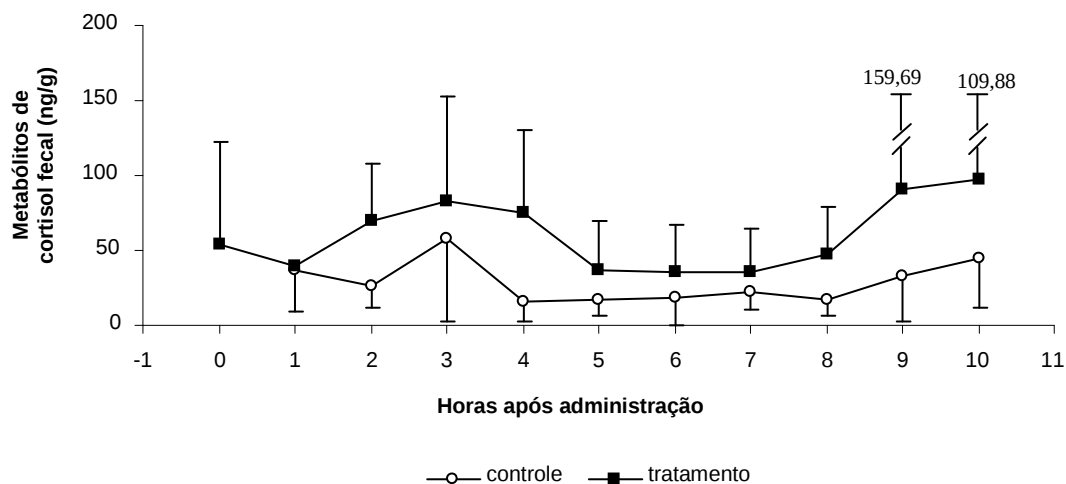


Figura 03- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de ambos os sexos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=8) e Tratamento (■ n=8).

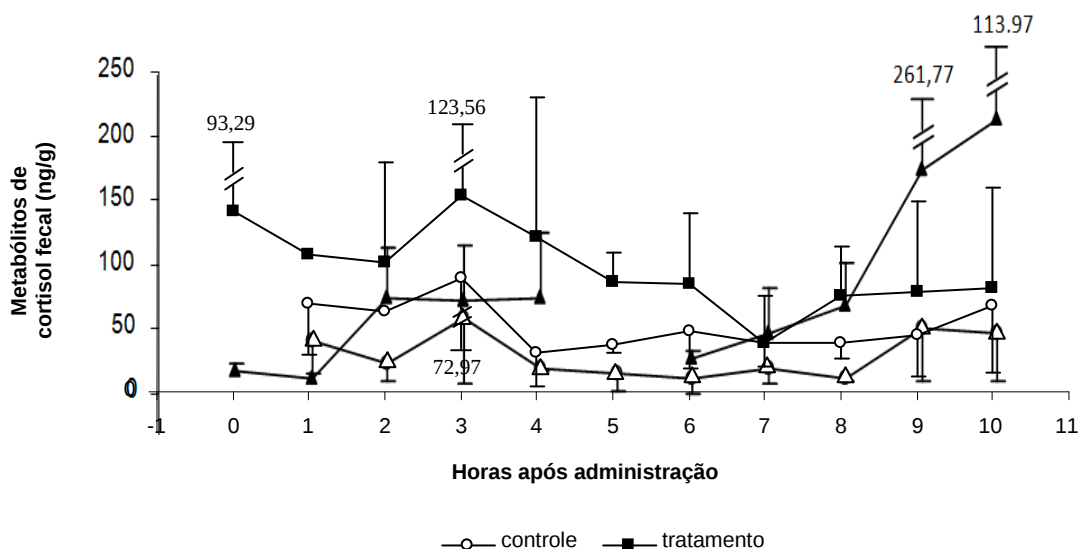


Figura 04- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos (○/■) e fêmeas (△/▲) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○/△ n=4) e Tratamento (■/▲ n=4).

Os valores médios e os desvios padrão para a dosagem de metabólitos de corticosterona em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) obtidas durante dez horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos

animais dos GC e GT, estão representados nas Figuras 05 (ambos sexos), 06 (machos) e 07 (fêmeas).

Para a excreção fecal de metabólitos de corticosterona foram identificados os seguintes picos: oito e duas horas após a administração da solução salina, respectivamente na fêmea e no macho, e quatro horas na fêmea e ausência de excreção no macho após a administração de ACTH. Considerando-se os dois sexos, foram determinados os seguintes picos: oito horas após a administração da solução salina e quatro horas após a administração de ACTH.

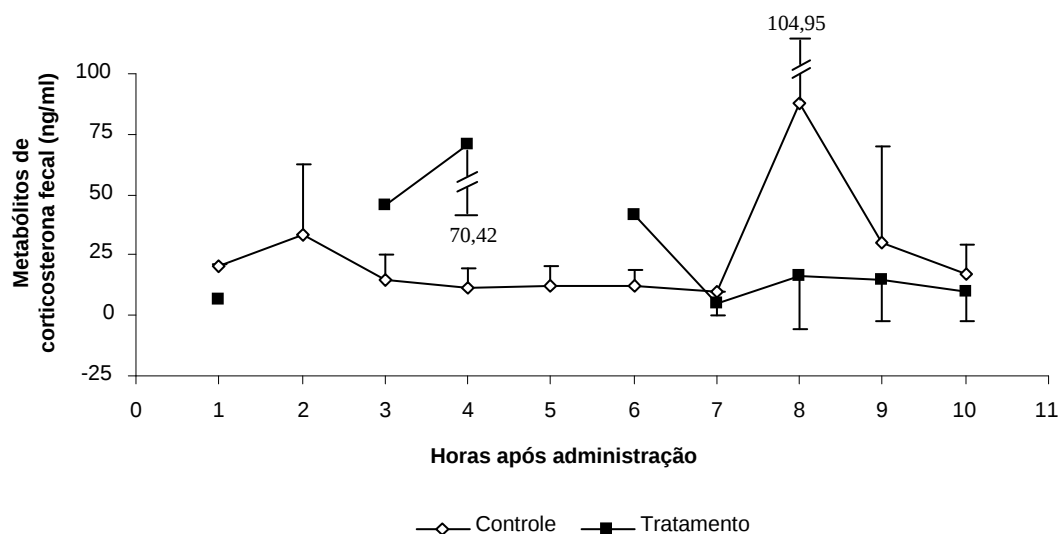


Figura 05 – Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) de ambos os sexos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=2) e Tratamento (■ n=2)

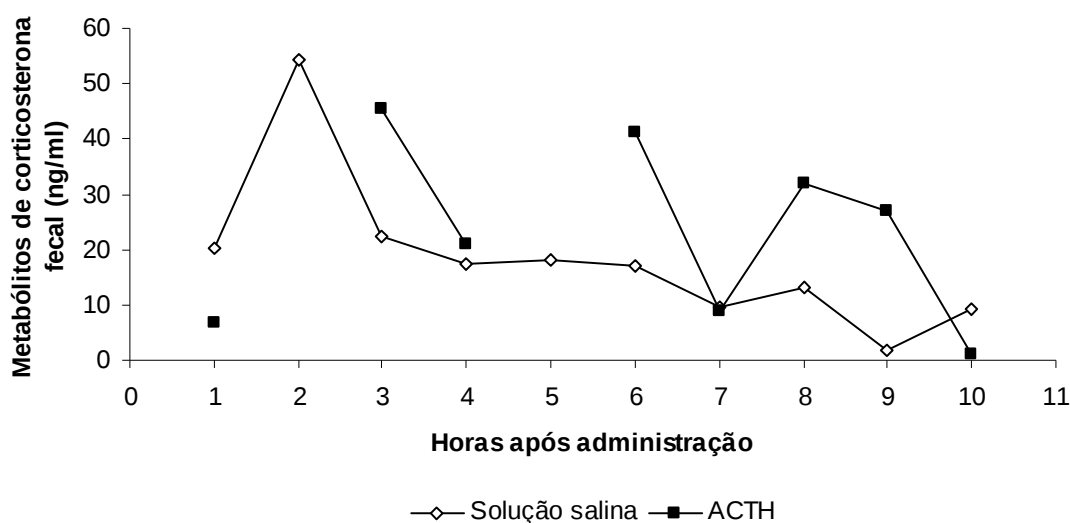


Figura 06 – Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

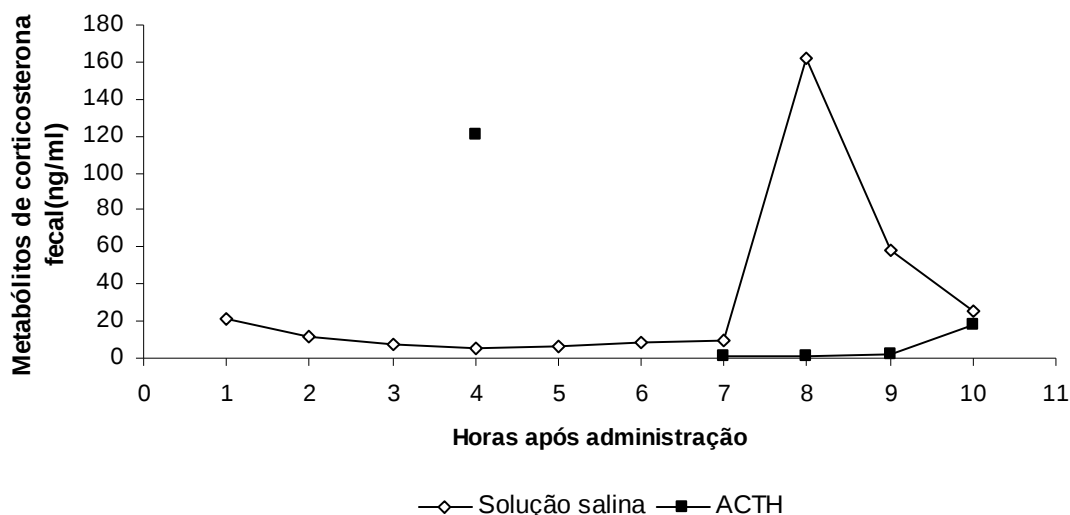


Figura 07 – Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) fêmeas obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

Os valores médios e os desvios padrão para a dosagem de metabólitos de progesterona em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) obtidas durante dez horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos GC e GT, estão representados nas Figuras 08 (machos e fêmeas), 09 (machos e fêmeas).

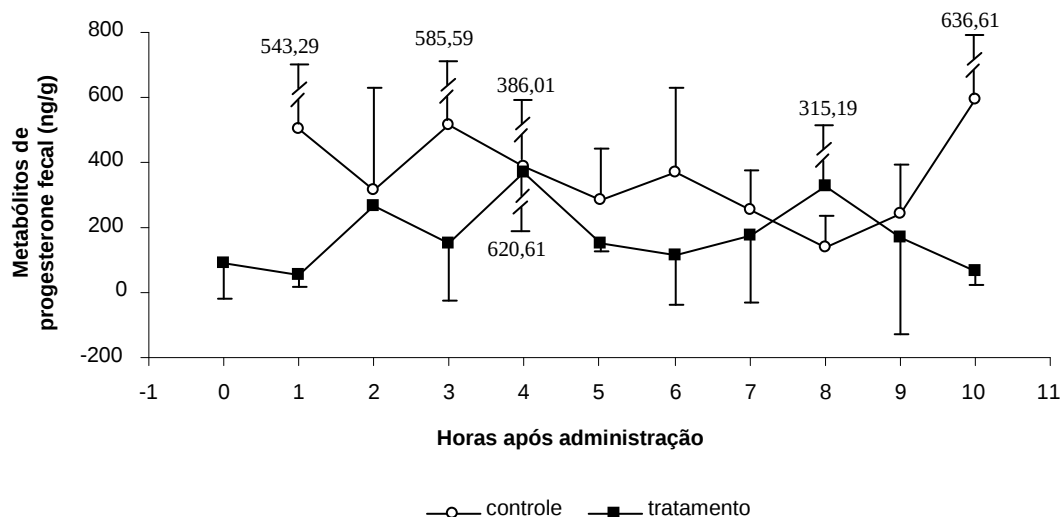


Figura 08- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de progesterona (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=8) e Tratamento (■ n=8)

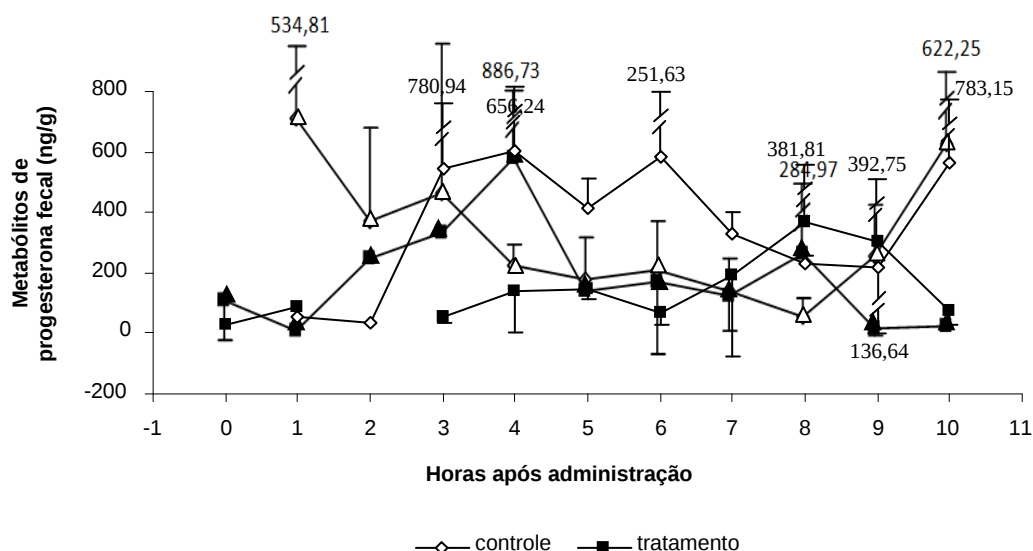


Figura 09- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de progesterona (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos (○/■) e fêmeas (△/▲) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○/△ n=4) e Tratamento (■/▲ n=4)

DISCUSSÃO

A dosagem hormonal em animais de produção e humanos normalmente é realizada através de mensurações plasmáticas, devido à fácil colheita de sangue e a possibilidade desta ser realizada com frequência. Em animais selvagens tais condições são raramente encontradas, pois estes são facilmente estressáveis, o que resulta na alteração dos valores hormonais plasmáticos em poucos segundos, principalmente no que se refere aos hormônios relacionados ao estresse. Adicionalmente, além da elevada probabilidade de ocorrência de traumas no momento da contenção, no caso de animais de porte muito pequeno, o volume de sangue possível de ser colhido pode ser insuficiente e as vias de acesso para a sua colheita restritas. Outra desvantagem é a invasibilidade do método.

Devido a todos esses fatores, em animais selvagens têm-se preconizado a mensuração hormonal nas excreções, tais como fezes e urina, por sua facilidade de obtenção e maior segurança tanto para o animal quanto para o pesquisador. Devido à presença de vários metabólitos hormonais nas excreções e da possibilidade de fatores desconhecidos influenciarem os resultados, são necessárias validações específicas dos métodos de dosagem para verificar se o que está sendo dosado relaciona-se ao hormônio analisado ou se existem reações cruzadas com outros metabólitos ou substâncias.

No presente experimento, os valores médios da concentração fecal de metabólitos de GCs e Progesterona elevaram-se tanto em machos quanto em fêmeas após contenção e desafio com ACTH/solução salina, sendo os valores nos machos tão elevados quanto nas fêmeas. Apesar de não ser possível relacionar esse comportamento

283 apenas com a contenção e administração de ACTH, não se pode excluir a influência do
284 eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos resultados, pois foram observados níveis elevados
285 em ambos os grupos.

286 Ao avaliar separadamente cada hormônio, observamos que, apesar da
287 corticosterona ser considerada o GC presente em maior concentração no plasma de ratos
288 e aves adultas (ZENOBLE et al., 1985a e 1985b; ROMERO, 2004), encontramos
289 também altas concentrações de metabólitos de cortisol em fezes de papagaios-
290 verdadeiros. Esses resultados diferem dos obtidos por Lothrop et al. (1985) que,
291 estudando sete diferentes gêneros de psitacídeos (n=35), entre eles seis exemplares do
292 gênero *Amazona*, não observaram a elevação plasmática de cortisol após a
293 administração de ACTH, exceto em animais sexualmente imaturos ou que apresentavam
294 hiperadrenocorticismos.

295 A hipótese de que a adrenal secreta progesterona em situações de estresse, por
296 meio de desafios com ACTH, vêm sendo estudada desde 1972 em bovinos (WAGNER
297 et al.), porém não encontram respaldo em aves, no estudo de Bluhm et al. (1983), que
298 observaram níveis basais de progesterona plasmático em fêmeas de pato real (*Anas*
299 *platyrhynchos*) fora da estação de reprodução, mesmo sob estresse, contudo, esses
300 resultados devem ser interpretados com cautela, pois esses autores submeteram apenas
301 um animal a um protocolo de indução de estresse, sinalizando a necessidade de novos
302 estudos.

303 Levando-se em consideração que os animais empregados estavam fora da
304 estação de reprodutiva e que metade destes eram machos, a progesterona fecal
305 encontrada nos animais provavelmente foi secretada por uma fonte extra-gonadal:
306 possivelmente da adrenal, como ocorre nos bovinos (YOSHIDA & NAKAO, 2005).

307 Apesar dos animais empregados no presente estudo serem todos adultos, os
308 animais estavam em inatividade gonadal, pois o experimento foi realizado fora da
309 estação reprodutiva e, portanto, em situação endócrina similar à observada nos animais
310 imaturos. A outra possibilidade, relacionada ao hiperadrenocorticismos, é remota, pois
311 seria necessário que todos os animais apresentassem a condição para justificar os
312 achados.

313 Zenoble et al. (1985a e 1985b), estudando águias (*Haliaeetus leucephalus*),
314 condores (*Vultur gryphus*) e psitacídeos (*Amazona autumnalis*, *A. aestiva* e *Psittacus*
315 *erithacus*), também não observaram elevação do cortisol plasmático após a
316 administração injetável de ACTH. Entretanto, esses autores monitorizaram os animais

317 por apenas 90 minutos após a injeção. No nosso estudo os picos de excreção de
318 metabólitos de cortisol fecal nos animais desafiados com ACTH ocorreram sempre após
319 o de excreção de corticosterona, o que sugere que o cortisol, pode se elevar mais
320 tardiamente após o desafio com ACTH. Ver se há outra descrição na literatura.

321 Outra possibilidade para detecção fecal de cortisol pode estar relacionada com o
322 fato de ter sido empregado, no presente estudo, anticorpo policlonal (anticorpo contra
323 cortisol R4866) para a dosagem pela técnica de EIA. Portanto, em vez de cortisol, é
324 possível que o que foi detectado nas fezes tenham sido metabólitos de corticosterona ou
325 de outro glicocorticóide, uma vez que o Anticorpo apresenta reação cruzada para
326 Cortisol (100%), Prednisolona (9,9%), Prednisona (6,3%), Cortisona (5,0%),
327 Corticosterona (0,5%) e <0,5% para os demais metabólitos testados (C. Munro,
328 Universidade da Califórnia, Davis, CA).

329 Quando considerados os resultados obtidos na dosagem de corticosterona,
330 também não houve sincronismo entre os animais e foram observados níveis elevados de
331 cortisol no mesmo momento em que se tinham baixos níveis de corticosterona.

332 A ausência de efeitos relacionados a grupo, momento ou sexo nos resultados,
333 exceto entre as fêmeas do GC e os machos do GT na hora cinco e entre os machos do
334 GC e as fêmeas do GT na hora dez, evidencia que não houve um padrão regular na
335 resposta de excreção fecal de cortisol, e os animais, individualmente, apresentaram
336 perfis particulares em relação ao momento de excreção máxima ou mínima a partir do
337 momento da contenção e administração da solução salina ou ACTH.

338 Apesar da ausência de efeitos significativos, a observação de picos de excreção
339 fecal de metabólitos de cortisol às três horas entre os machos e fêmeas do Grupo
340 Controle, e às três e dez horas, respectivamente, para os machos e fêmeas no Grupo
341 Tratamento, demonstra-se que aconteceram importantes variações nos valores
342 excretados, sugerindo que um aumento do número de animais em estudos dessa
343 natureza pode levar a descoberta de padrões mais regulares de elevação fecal desses
344 metabólitos.

345 Esses valores podem ser comparados com os dados encontrados por Lee et al.
346 (1999), que observaram pico de excreção de hormônios esteróides após quatro horas da
347 administração de esteróides radiomarcados em dois gêneros de Psittaciformes
348 (*Melopsittacus undulatus* e *Amazona amazonica*), e Wasser et al. (2000), Denhard et al.
349 (2003) e Thiel et al. (2005), que após administração de ACTH, observaram,
350 respectivamente, picos de excreção as duas e as 12 horas em duas espécies de corujas

351 (*Strix varia* e *Bubo virginianus*), aumento de excreção de metabólitos de
352 glucocorticóides após quatro horas em galinhas (*Gallus domesticus*), corvo
353 (*Phalacrocorax carbo*) e açor (*Accipiter gentilis*) e variação individual nos picos de
354 excreção em tetraz-grande (*Tetrao urogallus*).

355 No presente estudo, a grande variação individual dos resultados de excreção
356 fecal de metabólitos de cortisol, corticosterona e progesterona dosados após desafio
357 com ACTH ou solução salina não permitiu a validação fisiológica dos ensaios, diferente
358 do observado por Lothrop et al. (1985), que desafiaram psitacíformes com ACTH e
359 dosaram cortisol e corticosterona plasmáticos, Lee et al. (1995), que estudaram a
360 excreção fecal de esteróides sexuais radiomarcados em pardal-de-crista-branca
361 (*Zonotrichia leucophrys oriantha*), e Goymann et al. (2002) e Nakagawa et al. (2003),
362 que realizaram dosagens fecais de corticosterona, respectivamente, em tordo-europeu
363 (*Saxicola torquata rubicola*) e pingüim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*), após desafio
364 com ACTH. Todos esses autores que observaram aumento sincrônico nas
365 concentrações dos hormônios estudados enquanto que nos papagaios-verdadeiros
366 (*Amazona aestiva*) do presente experimento houve uma grande variação do momento de
367 ocorrência do pico de excreção

368 A primeira possibilidade para explicar a não validação fisiológica é a ausência
369 de amostras fecais em todos os momentos programados de colheita, que pode ter sido
370 uma consequência da não ingestão contínua de alimentos devido à falta de adaptação
371 das aves ao manejo contínuo e à presença do ser humano junto à elas o dia todo. Essa
372 ocorrência é relatada por Goymann et al. (2002), que também não obtiveram amostras
373 fecais em animais que interromperam a alimentação durante o período experimental e
374 atribuíram o fenômeno ao estresse relacionado ao manejo constante dos animais.
375 Contudo, a probabilidade de que as amostras perdidas apresentassem valores capazes de
376 uniformizar os resultados é muito pequena e, portanto, diminuem a possibilidade desta
377 explicação ser plausível.

378 Outro fator que pode ter interferido na excreção fecal tanto de cortisol quanto de
379 corticosterona e progesterona, são as alterações ambientais durante os dias da colheita,
380 ou seja, alteração da temperatura ambiental e do clima nos dias do experimento, como o
381 discutido por Astheimer et al. (1994) quando relataram as diferenças de respostas para a
382 contenção e administração de antagonista de glucocorticóides em diferentes épocas do
383 ano. Apesar de serem próximos, nos dias de colheita das amostras fecais a temperatura
384 variou de cinco à 18° C, em dois dias a temperatura ambiental aumentou

385 gradativamente durante o período de colheita e nos demais permaneceu constante.
386 Quanto a luminosidade, em um dia o tempo permaneceu chuvoso e nos demais,
387 ensolarado.

388 Frigerio et al. (2004) verificaram relação negativa entre a temperatura na noite
389 anterior e os níveis de metabólitos de corticóides fecais, sugerindo que os corticóides
390 estão envolvidos no processo de termorregulação das aves. A interferência devido a
391 fatores estressantes no dia anterior a colheita, como por exemplo, a baixa temperatura
392 ambiente, pode ser observada pelo pico de excreção de metabólitos cortisol fecal na
393 hora zero após administração de ACTH em um dos machos. Outra possível explicação
394 para o pico de excreção inicial é devido à ineficiente separação entre fezes e urina,
395 como sugere Thiel et al. (2005), que observaram elevados níveis de metabólitos de
396 corticosterona na primeira hora em uma das fêmeas de galo silvestre (*Tetrao urogallus*).

397 Deve-se levar em consideração também a alteração da temperatura ambiente no
398 momento da realização da dosagem hormonal, alterando o tempo de reação e possível
399 evaporação do metanol devido às altas temperaturas, principalmente para a dosagem de
400 corticosterona que teve como diluente o metanol absoluto (WASSER et al., 2002).
401 Durante o período de realização dos ensaios para cortisol, o condicionador de ar do
402 laboratório apresentou defeito e algumas análises foram realizadas sob elevada
403 temperatura ambiente, enquanto que outras aconteceram sob condições controladas.

404 Outra possibilidade para a ocorrência desses picos não sincrônicos seriam as
405 diferenças individuais de morfologia, taxa de passagem do alimento no trato
406 gastrointestinal e taxa de metabolismo hormonal (WASSER et al., 2002), ou também
407 devidos às diferentes histórias de vida das aves, refletindo as condições fisiológicas que
408 os animais se encontravam antes do experimento (WINGFIELD & KITAYSKY, 2002).
409 Está possibilidade no nosso estudo é bastante plausível, visto que as aves eram
410 provenientes de apreensão pelo IBAMA e constituíam lote heterogêneo quanto à idade,
411 escore corporal, *status* reprodutivo, histórico de cativeiro e tempo de chegada ao Centro
412 de Reabilitação.

413 Os procedimentos de manejo durante a realização do estudo podem ter
414 interferido nos resultados, assim como relatado por Queiroz (2006), pois, no dia do
415 experimento, os papagaios foram capturados um a um, retirados de seu ambiente de
416 permanência usual (viveiro coletivo), colocados em gaiolas individuais; depois foram
417 novamente contidos para a realização das injeções intramusculares e mantidos isolados
418 em gaiolas pequenas, dentro de um quarto e com a presença humana estranha constante.

419 Este conjunto de procedimentos, que não estavam incorporados à rotina dos animais,
420 pode ter desencadeado a liberação de ACTH endógeno e, conseqüentemente,
421 estimulado a secreção de hormônios pela adrenal e a subsequente elevação das
422 concentrações fecais destes nos dois Grupos experimentais, promovendo a liberação de
423 picos de GC e progesterona fecais de forma assincrônica. Deve-se ressaltar também que
424 durante o experimento, um grupo de pessoas ligadas à empresa (local do experimento)
425 foi visitar o local do experimento, tornando-se mais um fator interferente.

426 A influência desses fatores pôde ser observada no estudo de Wingfield (1994),
427 que demonstrou a elevação de CG em pardais-de-crista-branca (*Zonotrichia leucophrys*
428 *gambelii*) após serem submetidos aos procedimentos de contenção.

429 Finalmente, a interpretação adequada dos resultados de validação fisiológica do
430 presente estudo ficou prejudicada em função do limitado número de animais e das falhas
431 no delineamento experimental e processo de colheita das amostras, tornando-se
432 necessária a condução de estudos com maior quantidade de animais e delineamento
433 experimental mais controlado, principalmente no que diz respeito a homogeneização do
434 lote e minimização do estresse nos animais, por meio de protocolos de adaptação aos
435 procedimentos de manuseio e administração de solução injetáveis.

436

437 CONCLUSÃO

438 A partir dos resultados obtidos sob as condições experimentais do presente
439 estudo, foi possível concluir que as técnicas de EIA direto para dosagem de metabólitos
440 de cortisol e radioimunoensaio para dosagem de metabólitos de corticosterona e
441 progesterona presentes nas fezes, são capazes de detectar aumento de concentrações dos
442 metabólitos fecais, tanto em machos quanto de fêmeas de papagaios-verdadeiros, apesar
443 de não ter sido possível caracterizar um padrão de excreção de metabólitos fecais de
444 glucocorticóides e progesterona a partir do protocolo de validação fisiológica
445 empregado.

446

447 REFERÊNCIAS

448 ASTHEIMER, L.B.; BUTTEMER, W.A.; WINGFIELD, J.C. Gender and seasonal
449 differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in Arctic passerine,
450 *Zonotrichia leucophrys gambelii*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.94, p.33-43, 1994.

- 451 BLUHM, C.K.; PHILLIPS, R.E.; BURKE, W.H. Serum levels of luteinizing hormone,
452 prolactin, estradiol and progesterone in laying and nonlaying mallards (*Anas*
453 *platyrhynchos*). **Biol. Reprod.**, v. 28, n.2, p.295-305, 1983.
- 454 BOONSTRA, R. Coping with changing northern environments: the role of the stress
455 axis in birds and mammals. **Integr. Comp. Biol.**, v.44, p.95–108, 2004.
- 456 CHINNADURAI, S.K. **Evaluation of fecal glucocorticóides metabolite assays for**
457 **short-term stressors and validation for stress monitoring in African herbivores.**
458 2006. 59f. Dissertação Mestrado. Universidade de Missouri, Columbia, 2006.
- 459 COCKREM, J.F. Conservation and behavioral neuroendocrinology. **Horm. Behav.**,
460 v.48, p.492-501, 2005.
- 461 DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; JEWGENOW, K.; KRAUSE, M.;
462 GROSSMANN, R. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid
463 metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax*
464 *carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.131(3),
465 p.345-52, maio 2003.
- 466 DEVELEY, P.F. Métodos para estudos com aves. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.;
467 VALLADARES-PADUA, C. (Eds.) **Métodos de estudo em biologia da conservação**
468 **& manejo da vida silvestre.** Curitiba: Editora UFPR, 2003. p.153-68.
- 469 FRIGERIO, D.; DITTAMI, J.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted corticosterona
470 metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male greylag geese
471 (*Anser anser*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.137, p.29-36, 2004.
- 472 FUJIHARA, C.J. **Validação de método não-invasivo para análise de hormônios**
473 **ligados as estresse em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).** 2008. 114 f.
474 Dissertação Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
475 Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.
- 476 GALETTI, M.; GUIMARÃES Jr., P.R.; MARSDEN, S.J. Padrões de riqueza, risco de
477 extinção e conservação dos psitacídeos neotropicais. In: GALETTI, M.; PIZO, M.
478 (Eds). **Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil.** Belo Horizonte:
479 Melopsittacus Publicações Científicas, cap.1, p.17-26. Disponível em:
480 <<http://ns.rc.unesp.br/ib/ecologia/fenologia/Papers/psitacideos.pdf>> Acesso em: 05
481 dez. 2005.
- 482 GOYMANN, W.; MÖLTL, E.; GWINNER, E. Corticosterone metabolites can be
483 measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata*
484 *rubicola*). **Auk**, v. 119, n. 4, p. 1167-1173, 2002.

- 485 GRAHAN, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE,
486 A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and
487 serum. **Zoo Biol.**, v.20, p.227-236, 2001.
- 488 IUCN – International Union for Conservation of Nature. **Executive Summary -**
489 **Parrots:** status survey and conservation action plan. Switzerland, 2004. Disponível em
490 <<http://www.iucn.org/themes/ssc/publications/parrots.htm>> . Acesso em: 10 jan. 2008.
- 491 LEE, J.V.; WHALING, C.S.; LASLEY, B.L.; MARPER, P. Validation of an enzyme
492 immunoassay for measurement of excreted estrogen and testosterone metabolites in the
493 white-crowned sparrow (*Zootrichia leucophrys oriantha*). **Zoo Biol.**, V.14, p.97-106,
494 1995.
- 495 LEE, J.V.; TELL, L.; LASLEY, B. A comparison of sex steroid hormones excretion
496 and metabolism by psittacine species. **Zoo Biol.**, v.18, p. 247-260, 1999.
- 497 LOTHROPS, C.D.; OLSEN, J.H.; LOOMIS, M.; JENSEN, J.M.; LENHARD, A.
498 Evaluation of adrenal function in psittacine birds, using the ACTH stimulation test. **J.**
499 **Am. Vet. Med. Assoc.**, v.187, n.11, p.1113-1115, 1985.
- 500 LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender.
501 **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1017–21, 2005.
- 502 NAKAGAWA, S.; MÖSTL, E.; WASS, J.R. Validation of an enzyme immunoassay to
503 measure fecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): a
504 non-invasive tool for estimating stress? **Polar Biol.**, v.26, p.491-493, 2003.
- 505 QUEIROZ, L.G.P.B. **Sazonalidade da excreção de corticóides urofecaís e sua**
506 **relação com o aspecto reprodutivo e de manejo em papagaio-de-cara-roxa**
507 **(Amazona brasiliensis) em cativeiro.** 36f. 2006. Dissertação Mestrado, Faculdade de
508 Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- 509 ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research.
510 **Trends Ecol. Evol.**, v.19, n.5, p.249-255, 2004.
- 511 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. New
512 York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- 513 SICK, H. **Ornitologia brasileira:** uma introdução. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Editora Nova
514 Fronteira, 2001. 912p.
- 515 THIEL, D.; JENNI-EIERMANN, S.; PALME, R. Measuring corticosterone metabolite
516 in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1046, p.96-
517 108, 2005.

- 518 WAGNER, W.C.; STROHBEHN, R.E.; HARRIS, P.A. ACTH, corticoids and luteal
519 function in heifers. **J. Anim. Sci.**, v.35, n. 4, p.281-288, 1972.
- 520 WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; BROWN, J.L; COOPER, K.; CROCKETT, C.M.;
521 BERCHERT, U.; MILLSPAUGH, J.; LARSON, S.; MONFORT, S. A generalized fecal
522 glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian
523 species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.120, p.260–275, 2000.
- 524 WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; CLARKE, C.M. Assessing Stress and Population
525 Genetics Through Noninvasive Means. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOS,
526 G.M.; HOUSE, C.; PEARL, M.C. (Eds.) **Conservation Medicine** - Ecological Health
527 in Practice. New York: Oxford University Press, 2002. p.131-144.
- 528 WINGFIELD, C. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In:
529 DAVEY, K.G.; PETER, R.E.; TOBE, S.S. (Eds.). **Perspectives in Comparative**
530 **Endocrinology**. Ottawa: National Research Council Canada, 1994. p.520-528.
- 531 WINGFIELD, J.C.; KITAYSKY, A. Endocrine responses to unpredictable
532 environmental events: Stress or anti-stress hormones? **Integr. Comp. Biol.**, v.42, p.600-
533 609, 2002.
- 534 YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH
535 challenge in ovariectomized lactating dairy cows. **J. Reprod. Dev.**, v.51, n.1, p.99-107,
536 2005.
- 537 ZENOBLE, R.D.; KEMPPAINEN, R.J.; YOUNG, D.W.; CARPENTER, J.W. Effect of
538 ACTH on plasma corticosterone and cortisol in eagles and condors. **J. Am. Vet. Med.**
539 **Assoc.**, v.187, n.1, p.1119-1120, 1985a.
- 540 ZENOBLE, R.S.; KEMPPAINEN, R.J.; YOUNG, D.W.; CARPENTER, J.W. Effect of
541 ACTH on plasma corticosterone and cortisol in eagle and condors. . **J. Am. Vet. Med.**
542 **Assoc.**, v. 187, n. 1, p.1119-1120, 1985b.

543

544 **AGRADECIMENTOS**

545 Departamento de Ciencias Biomédicas/Bioquímica da Universidade de Medicina
546 Veterinária de Viena, Áustria, em especial ao Rupert Palme ao CEMPAS - UNESP-
547 Campus Botucatu e ao Projeto Centrofauna por manterem os animais e permitirem a
548 utilização deles na pesquisa; ao Departamento de Patologia da FMB, em especial ao
549 Claudinei pela liofilização das amostras;. À FUNDUNESP pelo auxílio financeiro e à
550 CAPES pela bolsa de estudo e à FAPESP pelo auxílio pesquisa.