

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VALIDAÇÃO DE MÉTODO NÃO-INVASIVO PARA ANÁLISE DE
HORMÔNIOS LIGADOS AO ESTRESSE EM PAPAGAIO
VERDADEIRO (*AMAZONA AESTIVA*)

CAROLINE JUNKO FUJIHARA

Botucatu – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VALIDAÇÃO DE MÉTODO NÃO-INVASIVO PARA ANÁLISE DE
HORMÔNIOS LIGADOS AO ESTRESSE EM PAPAGAIO-
VERDADEIRO (*AMAZONA AESTIVA*)

CAROLINE JUNKO FUJIHARA

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

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

Fujihara, Caroline Junko.

Validação de método não-invasivo para análise de hormônios ligados ao estresse em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) / Caroline Junko Fujihara. – Botucatu : [s.n.], 2008

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

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Assunto CAPES:

1. Ave - Metabolismo
2. Papagaio (Ave) - Fisiologia

CDD 636.6865

Palavras-chave: Aves; Corticosterona; Cortisol; Estresse; Fezes

Nome do Autor: Caroline Junko Fujihara

Título: VALIDAÇÃO DE MÉTODO NÃO-INVASIVO PARA ANÁLISE DE HORMÔNIOS LIGADOS AO ESTRESSE EM PAPAGAIO-VERDADEIRO (AMAZONA AESTIVA)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Ass. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a.Adj. Dr^a. Maria Denise Lopes
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

Data da Defesa: 25 de junho de 2008

***Dedico à minha mãe, que conseguiu nos guiar,
e aos meus irmão, por estarmos juntos
apesar das dificuldades...***

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira por ter aceitado este desafio, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Maria Denise Lopes, Fernanda da C. Landim e Alvarenga, Sony Dimas Bicudo, Marco Antonio Alvarenga, Cezinande de Meira, Frederico Ozanam Papa, Nereu Carlos Prestes e Stelio L. P. Lunna por me acolherem no curso de pós-graduação, em especial à Prof^a Eunice Oba por tornar possível a dosagem pela técnica de RIA.

Ao Centrofauna, em especial ao Prof. Nabor Veiga, Ciro Guilherme Gentil Groce, Carolina Massucci Marciano da Silva, Silvia Maria de Almeida, Antonio Carlos Fogatti por permitirem a colheita das amostras e às aves por fornecerem material de estudo.

Ao Departamento de Genética-IBB, em especial ao Prof. Guaracy Tadeu Rocha e à Valquíria Santiloni (Laboratório de Citogenética Animal), à Prof^a Adriane Pinto Wasko e à Magali Lira Gomes (Laboratório de Genética Molecular) e demais aos pós-graduandos e graduandos: Elaine, Fernanda e Teresa, por permitir a identificação do sexo das aves.

Ao Departamento de Patologia da FMB, em especial ao Claudinei por aceitar liofilizar as amostras e fazê-la tão prontamente.

Ao Departamento de Zootecnia-FCAV de Jaboticabal, em especial ao Prof. José Maurício Barbanti Duarte e ao Ricardo Garcia Pereira e demais pós-graduandos: Bruna, “Janota” e Evelin por me acolherem e ensinarem a entender um pouco sobre dosagem de hormônios através do EIA e às meninas da “Toca das Onças” por permitirem invadir a república por quase três meses.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Reprodução de Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, em especial ao Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães pelas sugestões e discussões dadas durante a análise dos resultados e processo de escrita.

Aos funcionários da FMVZ, em especial aos da Reprodução Animal: Edílson, Walter, Cristina e da sessão de pós-graduação: Denise, Maria e José pela vivência e compreensão

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP- Campus Botucatu, em especial à Marluci, Selma, Meire, Malu pelas sugestões, auxílio e correções das referências durante o mestrado

À FUNDUNESP pelo auxílio financeiro, sem o qual o projeto não teria saído.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos colegas de pós-graduação: Ana Livia, Jorge, Jeanne, Gabriel, Carmo, Myrna, entre outros, pelas trocas de idéias nos corredores

Aos amigos de Londrina e Botucatu pelo “desestresse” da vida

Aos amigos Wolff, Cynthia, Carlos, Rafael e Ian pela correção e dicas durante todo o projeto.

Aos meus tios, em especial ao Minoru, Michiko, Paes e Yuriko, por abrirem os caminhos.

Aos meus irmãos e cunhados, em especial Yuko, Lúcio, Yuji, Juliana, Yoko e Haruo por me possibilitarem estar aqui e, Daniel, Tiaki, Kazutoshi, por estarem ao meu lado sempre que puderam.

Ao Fernando por ser quem é e me aceitar como sou

À todos, meu muitíssimo obrigada!

“Quando eu era criança, História me parecia fascinante, mas ao mesmo tempo o menos aplicado ou menos útil de todos os assuntos. Minhas professoras sempre tinham o mesmo argumento sobre a importância do estudo da História: é preciso estudar História para aprender com os erros do passado. Só agora sou capaz de perceber o quanto elas estavam certas...”
(Fernando Fernandez)

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Materiais necessários para preparar as soluções utilizadas na técnica de EIA para dosagem de cortisol fecal em papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>).....	29
Tabela 02	Valores médios (desvios padrão) para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (n=8) e Tratamento (n=8).....	41
Tabela 03	Valores médios (desvios padrão) e picos de excreção de metabólitos de corticosterona fecal (ng/ml) obtidos em papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>) durante 10 horas após a injeção de solução salina e ACTH, respectivamente, em uma fêmea e um macho dos Grupos Controle e Tratamento, pela técnica de RIA	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Gel de agarose evidenciando os padrões de amplificação para os genes CHD. Amostras que evidenciam dois fragmentos de DNA correspondem a indivíduos do sexo feminino e amostras que evidenciam um único fragmento de DNA correspondem a indivíduos do sexo masculino. À esquerda, marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder)	24
Figura 02	Fotos do papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) contido na gaiola e das etapas de colheita de material fecal e armazenagem por curto prazo	26
Figura 03	Curvas de dose-resposta obtidas na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de cortisol em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>), diluídas na proporção 1:4 e adicionada de quantidades conhecidas de cortisol	35
Figura 04	Curvas de dose-resposta obtidas na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de cortisol em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>), diluídas na proporção 1:8 e adicionada de quantidades conhecidas de cortisol	36
Figura 05	Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de cortisol em fezes de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>), pela técnica de EIA	36
Figura 06	Curvas de dose-resposta obtidas na validação laboratorial da dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>), adicionada de quantidades conhecidas de corticosterona	37
Figura 07	Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de corticosterona em fezes de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>), pela técnica de RIA	38
Figura 08	Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=8) e Tratamento (■ n=8)	39

Figura 09	Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) machos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=4) e Tratamento (■ n=4)	40
Figura 10	Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) 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)	40
Figura 11	Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=2) e Tratamento (■ n=2)	42
Figura 12	Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) macho obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)	42
Figura 13	Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) fêmea obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)	43
Figura 14	Valores para a dosagem de metabólitos de cortisol e corticosterona (ng/g) em amostras fecais de dois papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)	44
Figura 15	Valores para a dosagem de metabólitos de cortisol e corticosterona (ng/g) em amostras fecais de um papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) macho obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)	44
Figura 16	Valores para a dosagem de metabólitos de cortisol e corticosterona (ng/g) em amostras fecais de um papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) fêmea obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)	45

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Informações sobre as reatividades cruzadas do anticorpo policlonal Cortisol R4866 (C. Munro, Universidade da Califórnia, Davis, CA) do ensaio imunoenzimático utilizados neste estudo para dosagem de metabólito de cortisol fecal em papagaios-verdadeiros	68
Anexo B	Níveis de garantia da ração extrusada para psitacíformes-Alcon®, utilizada para alimentar as aves durante a realização do experimento	69
Anexo C	Níveis de garantia do Alimento para papagaios com frutas – Nutripássaros®, utilizado para alimentar as aves durante a realização do experimento	70
Anexo D	Valores médios (desvio padrão) da concentração e pico de excreção de metabólitos de cortisol fecal (ng/g) obtidos em papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>), sendo quatro machos e quatro fêmeas, a cada uma hora após a administração intramuscular de solução salina 0,9% de NaCl no Grupo Controle e ACTH diluído em solução salina no Grupo Tratamento durante 10 horas de colheita	71
Anexo E	Valores médios (desvio padrão) da concentração de metabólitos de corticosterona fecal (ng/g) obtidos de dois papagaios-verdadeiros (<i>Amazona aestiva</i>), sendo um macho e uma fêmea em cada grupo, a cada uma hora após a administração intramuscular de solução salina 0,9% de NaCl no Grupo Controle e ACTH diluído em solução salina no Grupo Tratamento durante 10 horas de colheita	73

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico
cm = Centímetro
DNA = Ácido desoxirribonucléico
EIA = Enzimoimunoensaio
g = Grama
GC = Glucocorticóides
GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina
HPA = Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical
LH = Hormônio luteinizante
m = Metro
M = Molar
mbar = Milibar
mg = Miligrama
min = Minutos
ml = Mililitro
mm = Milímetro
NaCl = Cloreto de sódio
ng = Nanograma
PA = Puro absoluto
PCR = *Polymerase Chain Reaction*
pg = Picograma
RIA = Radioimunoensaio
rpm = Rotações por minuto
s = Segundos
TRIS = Trishidroximetilaminometano
UI = Unidade internacional
x g = Gravidade
µl = Microlitro

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	7
2. Sexagem	9
3. Estresse	11
4. Hormônios esteróides	12
4.1. Metabolização hormonal	12
4.2. Método e técnicas de dosagem hormonal	12
4.3. Dosagem hormonal presentes nas excreções	14
4.3.1. Fatores que interferem na dosagem	14
5. Testes de validação laboratorial	17
5.1. Curva de dose-resposta	18
5.2. Curva de paralelismo	18
5.3. Controle de qualidade	19
6. Teste de validação fisiológica	19
6.1. Desafio com administração de ACTH	20
MATERIAL E MÉTODOS	21

1. Animais	22
2. Sexagem das aves	22
3. Grupos experimentais e desafio com ACTH ou solução salina	25
4. Processamento das amostras	27
4.1. Liofilização	27
4.2. Extração de metabólitos hormonais	27
5. Dosagem hormonal dos metabólitos de glucocorticóides	27
5.1. Enzimoimunoensaio direto	28
5.2. Radioimunoensaio	30
6. Validação laboratorial	30
6.1. Dose-resposta	30
6.2. Curva de paralelismo	31
6.3. Controle de qualidade	32
7. Validação fisiológica	32
8. Análise estatística	32
RESULTADOS	34
1. Validação laboratorial	35
1.1. Dosagem de metabólitos de cortisol	35
1.1.1. Dose-resposta	35
1.1.2. Paralelismo	36
1.1.3. Controle de qualidade	37
1.2. Dosagem de metabólitos de corticosterona	37
1.2.1. Dose-resposta	37
1.2.2. Paralelismo	37
1.2.3. Controle de qualidade	38
2. Validação fisiológica	38

2.1. Dosagem de metabólitos de cortisol	38
2.2. Dosagem de metabólitos de corticosterona	41
2.3. Comparação entre dosagens de cortisol x corticosterona .	44
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	67
ARTIGO	74

RESUMO

FUJIHARA, C.J. **Validação de método não-invasivo para análise de hormônios ligados ao estresse em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. Botucatu, 2008, 112 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A validação da técnica de enzimoimunoensaio (EIA) para dosagem de metabólitos de cortisol fecal e de radioimunoensaio (RIA) para dosagem de metabólitos de corticosterona fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) foi considerada eficiente em predizer os valores hormonais, comprovada pelas curvas de paralelismo, dose resposta e coeficientes de variação intra e interensaio. A estimulação da adrenal com 25UI/animal de ACTH resultou na elevação das concentrações de metabólitos de cortisol e corticosterona fecal. Embora não tenha sido observada uma padronização nos picos de excreção fecal, nos animais analisados, houve duas concentrações de picos de excreção, uma entre duas e quatro horas e outra entre oito e dez horas. Não foram detectados efeitos de Grupos (Tratamento x Controle), momento (horas de coleta) ou sexo (macho x fêmea) nos resultados observados nos níveis de cortisol, exceto quando comparados fêmeas e machos de grupos distintos.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse; cortisol; corticosterona; aves; fezes.

ABSTRACT

FUJIHARA, C.J. Validation of non-invasive methods to measure stress hormones in Blue fronted parrot (*Amazona aestiva*). Botucatu, 2008, 112 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Validation of enzyme immunoassay (EIA) to measure metabolite of cortisol and radioimmunoassay (RIA) to measure metabolites of corticosteroid in Amazon parrots (*Amazona aestiva*) feces showed that this techniques can be used to measure feces hormones in this specie. These techniques were considered efficient to measure hormones values, proved by parallelism, standart curve and intra-assay and inter-assay coefficient of variation. Adrenal stimulation was showed by increase metabolic levels of cortisol and corticosterone in feces after ACTH administration (25UI/animal). In spite of didn't have standards in picks of excretion, this study show concentration of picks in 2-4 hour and 8-10h for hormones metabolites. For cortisol measure, there aren't significantly differences between Control Group and Treatment Group, moments and sex, but there are significantly differences between female and male in different groups.

Key-words: Stress; cortisol; corticosterone, birds; feces.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As aves representam o grupo 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, com cerca de 1.700 no Brasil, sendo 170 endêmicas.

A ordem Psittaciforme está entre as mais ameaçadas deste grupo; das 332 espécies da família Psittacidae, cujos representantes mais conhecidos são as araras (*Ara* e *Anodorhynchus*), papagaios (*Amazona*), maracanãs (*Propyrrhura*), periquitos (*Brotoogeris*), tuins (*Forpus*), maritacas (*Pionus*), além de espécies africanas (*Agapornis* e *Psittacus*), asiáticas e da Oceania (*Lorius*, *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 ser observado o nível de estresse nos animais (WASSER et al., 2000).

Em amostras fecais, para que as dosagens hormonais 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).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Realizar a validação laboratorial do método de Enzimoimunoensaio Direto (EIA) para mensurar metabólitos de Cortisol fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)
- 2) Realizar a validação laboratorial do método de Radioimunoensaio (RIA) para mensurar metabólitos de Corticosterona fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)
- 3) Realizar a validação fisiológica do método de Enzimoimunoensaio Direto (EIA) para mensurar metabólitos de Cortisol fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), por meio da administração de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH)
- 4) Realizar a validação fisiológica do método de Radioimunoensaio (RIA) para mensurar metabólitos de Corticosterona fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), por meio da administração de ACTH

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*)

Os psitacídeos são aves que ocupam diferentes regiões da Terra, mantendo populações viáveis mesmo nas áreas introduzidas, como Europa e América do Norte (GODOY, 2007). Existem aproximadamente 78 gêneros e 332 espécies, dos quais 184 ocorrem no Velho Mundo e 148 no Novo Mundo. Cerca de 100 espécies ocupam a América do Sul, sendo 80 presentes no Brasil (GALETTI et al., 2005).

O gênero *Amazona*, pertencente à ordem Psittaciformes, família Psittacidae, é característico da América do Sul e compreende 31 espécies popularmente conhecidas como papagaios. Representam aves de médio porte, robustas e de plumagem colorida, cujo padrão é variável de acordo com a espécie. A característica de plumas coloridas associada à grande inteligência e à comum habilidade em imitar a voz humana tornam estas aves extremamente cobiçadas para aquisição como animais de estimação. O comércio ilegal e a destruição de habitats representam os principais fatores que têm levado à redução do tamanho das populações destas aves (COLLAR, 1997), contribuindo assim para que diversas espécies figurem como vulneráveis, ameaçadas ou mesmo criticamente em perigo, como ocorre com *Amazona vittata* (IUCN, 2008). Similarmente, todas as espécies do gênero *Amazona* foram listadas pela “Convention on International Trade in Endangered Species (CITES, 2007). Apesar destes destaques, pouco se conhece sobre a história evolutiva deste grupo de aves e existem apenas dados limitados sobre o parentesco filogenético entre as diversas espécies do gênero *Amazona* (RUSSELO & AMATO, 2004).

No Brasil, ocorrem 12 espécies do gênero *Amazona* (CBRO, 2007), entre as quais *A. aestiva*, é comumente denominada de papagaio-verdadeiro ou acamatanga, acumatanga, ageru, ajuru-etê, ajurujurá, camatanga, curau, papagaio-comum, papagaio-curau, papagaio-de-frente-azul, papagaio-grego, papagaio-baiano e trombeteiro. Possui aproximadamente 35 cm de comprimento, cabeça amarela, fronte e loros azuis, o amarelo da cabeça

estende-se por cima e por detrás dos olhos contornando-os, e o encontro das asas e a base da cauda são vermelhos (SICK, 2001).

Como a maioria dos psitacídeos, o dimorfismo sexual em *A. aestiva* é pequeno ou ausente. A espécie começa a se reproduzir tarde, com 3 ou 4 anos de idade, e geralmente a postura anual é de quatro ovos. Os filhotes abandonam o ninho após dois meses (SICK, 2001).

Existem duas raças geográficas para a espécie *Amazona*: *Amazona aestiva aestiva*, com asa vermelha, encontrada no Brasil oriental, e *Amazona aestiva xanthopteryx*, que apresenta coberteiras pequenas superiores, cabeça amarela e testa azul, encontrada no Brasil ocidental. Existe uma região de transição no Pantanal do Mato Grosso, com espécimes que apresentam características das duas sub-espécies (SICK, 2001).

A espécie é encontrada em mata úmida ou seca, em beiras de rios e cerradões. De hábito alimentar frugívoro, procura seu alimento tanto nas copas das árvores mais altas, como em certos arbustos frutíferos, como mangueiras, jabuticabeiras, goiabeiras, laranjeiras e mamoeiros (SICK, 2001).

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades biológicas e estima-se que 12 milhões de animais silvestres sejam contrabandeados anualmente (RENECTAS, 2007). A *Amazona aestiva* figura entre as dez espécies brasileiras comumente recolhidas nos núcleos de Fauna e Centros de Triagem de Animais Silvestres nas cinco regiões do país (IBAMA/MMA, 2006), já que é bastante procurada no comércio ilegal por aprender facilmente a pronunciar palavras, imitar músicas e outros sons, e por sua plumagem de coloração vibrante. Apesar de não estar incluído na lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA/MMA, 2006), o papagaio-verdadeiro aparece classificado como espécie “ameaçada” em diversas listas de estados brasileiros (IBAMA/CEMAVE, 2005).

Segundo o Censo de Animais editado pela Sociedade de Zoológicos do Brasil, no período de 1996 a 2001, o papagaio-verdadeiro é a espécie de psitacídeo do gênero *Amazona* mais encontrada em zoológicos brasileiros. Trabalhos para o aumento do conhecimento sobre as características biológicas e reprodutivas desta espécie necessitam ser desenvolvidos em grande escala, pois, com o aumento da reprodução desta espécie, é possível reduzir a pressão que a mesma sofre na natureza, diminuindo assim o tráfico e

implementando o trabalho de conservação (PEIXOTO & TISCHER, 2004). Entretanto, os estudos com esta espécie ainda são extremamente escassos, especialmente na área genética.

Estudos genéticos em *Amazona aestiva* restringem-se a dados citogenéticos, que evidenciaram que a espécie possui um complemento cariotípico composto por $2n = 68 - 70$ cromossomos e sistema sexual ZZ/ZW (VAN DONGEN & DE BÔER, 1984; DUARTE & CAPARROZ, 1995; SANTOS & GUNSKI, 2006). A espécie apresenta uma predominância marcante de cromossomos com centrômero terminal e apenas o 8º par cromossômico, composto pelos cromossomos sexuais, é metacêntrico (ROCHA, 1993).

Diversos programas de manutenção e reprodução de Psitacídeos em cativeiro vêm sendo desenvolvidos no Brasil. Nestes programas faz-se necessária não somente a correta identificação de espécies e do sexo dos animais, visando sua reprodução, como também a determinação dos níveis de variabilidade genética. Embora a análise cariotípica represente uma importante ferramenta para a identificação de espécies e a sexagem de animais, esta nem sempre tem sido adequada para tais fins. Desta forma, nos últimos anos, houve um aumento na aplicação de metodologias de biologia molecular, visando ampliar os dados genéticos acerca de diversos animais em cativeiro, não somente para a identificação de espécies, sub-espécies e híbridos e para sexagem dos indivíduos, como também para avaliar o nível de diversidade genética destes animais, contribuindo para a caracterização geral da espécie e permitindo o desenvolvimento de programas sustentáveis de manejo e de preservação.

2. Sexagem

Embora o reconhecimento do sexo em algumas espécies de aves seja fácil, a maioria das espécies de psitacídeos é monomórfica, ou seja, sem diferença sexual externa entre machos e fêmeas, sendo necessários exames ou técnicas complementares para determinação do sexo (GODOY, 2007), entre as quais destacam-se a cariotipagem, laparoscopia, análises de esteróides fecais e análises moleculares. Todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens (CZEKALA & LASLEY, 1977; BERCOVITZ et al., 1978; MIYAKI et al., 1997; BERNARDES et al., 2000; CERIT & AVANUS, 2007)

A avaliação por cariotipagem é aplicada em diversas espécies, em que se observam dois tipos de cromossomos sexuais: ZW em fêmeas e ZZ em machos. Porém, em algumas espécies este método não é eficiente, pois é demorado, necessita de material em metáfase para identificar os pares de cromossomos sexuais, são necessárias duas ou mais contenções de cada animal para se obter o material desejado e é de difícil execução, principalmente em aves selvagens (MIYAKI et al., 1997).

Outra técnica aplicada em diversas espécies é a laparoscopia, porém é de difícil aplicação em animais de vida livre, pois necessita anestesiá-lo, requer pessoal qualificado e material adequado para realização do procedimento cirúrgico e é uma técnica traumática e invasiva que pode causar infecções (MIYAKI et al., 1997; BERNARDES et al., 2000).

A sexagem através da tomografia por ressonância magnética, em que se observam imagens do testículo com formato elipsoidal e os ovários com textura granular, apesar de ser uma técnica não-invasiva, requerer menos tempo para a obtenção dos resultados, é inviável em animais a campo, pois também necessita de contenção farmacológica e de um tomógrafo de alta resolução (BERNARDES et al., 2000).

A dosagem de metabólitos de esteróides nas excreções reflete a taxa de estrógeno:testosterona (CZEKALA & LASLEY, 1977). Porém sua validação não foi obtida para todas as espécies analisadas, pois depende da idade, fase e comportamento reprodutivo, fotoperíodo e padronização do manejo (alimentação e adaptação ao local) dos animais (BERCOVITZ et al., 1978; DIAS, 2003; WASSER & HUNT, 2005).

Um método que se mostrou bastante eficiente para identificação de machos e fêmeas refere-se à sexagem molecular através da técnica de PCR, baseada na amplificação de dois genes CHD (cromo-helicase-DNA-ligantes) que se localizam nos cromossomos sexuais de várias aves (GRIFFITHS et al., 1998). O gene CHD-W é localizado no cromossomo W e, portanto, único a fêmeas. O gene CHD-Z é encontrado no cromossomo Z e, portanto, ocorre em ambos os sexos. A metodologia utiliza um único conjunto de primers em PCR, que se anelam a regiões conservadas de éxons de ambos os genes, mas que amplificam uma região de íntron que difere em tamanho entre os genes CHD-W e CHD-Z, o que permite a amplificação de um único fragmento de DNA em machos

e de dois fragmentos de tamanhos distintos em fêmeas que podem, posteriormente, ser visualizados através de eletroforese em gel de agarose. Apesar da técnica empregada demandar tempo devido aos seus procedimentos, os dados são confiáveis e relativamente fáceis de serem obtidos (MIYAKI et al., 1998; CERIT & AVANUS, 2007).

3. Estresse

O estresse pode ser usado para referir mudanças internas induzidas por uma condição externa, ou seja, pode ser mensurado a partir de observação de qualquer estímulo (comportamental, ambiental ou demográfico) que provoque aumento na atividade do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical (HPA), elevando as concentrações de glucocorticóides (GC) adrenais circulantes (CREEL, 2001).

Os níveis de glucocorticóides são controlados pelo sistema de retroalimentação negativa no sistema hipotalâmico-hipofisário-adrenocortical (LUNDBERG, 2005), uma alteração neste sistema provoca uma elevação dos níveis de glucocorticóides circulantes, que promove uma inibição na síntese e estimulação da degradação de proteínas e RNA dos músculos, pele, tecido adiposo, tecido linfóide e tecido conjuntivo, além de exercer um efeito significativo sobre o metabolismo dos carboidratos pela inibição da captação da glicose e metabolismo dos tecidos periféricos, particularmente musculatura e adipócitos (DICKSON, 1996; MCKENZIE & DEANE, 2005).

Todos os vertebrados respondem ao estresse com uma série de alterações endócrinas que disponibilizam imediatamente a energia para a realização de respostas de luta ou fuga contra o agente estressor (SAPOLSKY et al., 2000; CREEL, 2001), havendo um desequilíbrio nos processos catabólicos (mobilização de energia) e anabólicos (reparação, cicatrização e crescimento) (ROMERO, 2004; BOOSTRA, 2004; LUNDBERG, 2005).

Os fatores estressantes em aves são diversos e vão desde o *status* social e dominância à degradação ambiental. Uma ferramenta útil para o estudo do estresse é o conhecimento da neuroendocrinologia comportamental, que é a interação entre o comportamento e a função endócrina presente em todos os vertebrados (COCKREM, 2005).

4. Hormônios esteróides

4.1. Metabolização hormonal

Os glucocorticóides são hormônios esteróides, derivados do colesterol. Os hormônios são transportados pela corrente sanguínea de forma livre, que podem entrar nas células alvos, ou ligados à proteína específica (globulina transportadora de corticóides), devendo haver um equilíbrio, controlado pelo sistema de retroalimentação, entre a forma conjugada e não conjugada. Os mecanismos de ação dos hormônios esteróides ocorrem através da passagem do hormônio pela parede da membrana, sendo a união dos hormônios à proteína um fator limitante para a difusão através dos tecidos (GONZÁLEZ, 2002).

Os hormônios esteróides são metabolizados pelo fígado e excretados via urinária e intestinal através da bile. A taxa de excreção dos hormônios esteróides na urina e fezes varia conforme a espécie e o hormônio a ser avaliado, sendo excretado em maior quantidade na urina (cerca de 80%) do que nas fezes (aproximadamente 20%) em primatas, porém em maior quantidade nas fezes quando em felinos. Assim, para a adequada interpretação dos resultados deve-se levar em consideração a presença de um ou outro material ou ambos (GRAHAN & BROWN, 1996; WASSER et al., 2002; MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004).

4.2. Método e técnicas de dosagem hormonal

Estudos sobre mensuração endócrina de respostas ao estresse, para avaliar a saúde de uma população, têm aumentado nas áreas de ecologia, biologia e medicina da conservação (WASSER et al., 2002). As principais técnicas de avaliação hormonal são Enzimoimunoensaio (EIA) e Radioimunoensaio (RIA) (HARPER & AUSTAD, 2000; DEHNHARD et al., 2003).

As técnicas imunológicas de dosagem hormonal (RIA e EIA) têm grande capacidade de mensurar pequenas doses de hormônios presentes nas amostras. Ambas são acuradas e precisas para avaliar os níveis hormonais de

diversas espécies, devendo levar em conta os equipamentos disponíveis e técnica dos operadores para a escolha da ferramenta (BROWN et al., 2004; MÖSTL et al., 2005).

As vantagens do EIA são a não utilização de materiais e equipamentos radioativos, os equipamentos necessários são menos caros e os reagentes são mais fáceis de preparar, porém muitos anticorpos necessitam ser importados e os tampões utilizados nos outros países são diferentes dos encontrados aqui, podendo apresentar resultados diferentes (BROWN et al., 2004; MÖSTL et al., 2005).

Em contrapartida, as dosagens por RIA, apesar de necessitar de um leitor gama ou beta, anticorpo radiomarcado e licença para utilizar tais materiais, muitas análises hormonais por esta técnica já estão padronizadas (BROWN et al., 2004; MÖSTL et al., 2005).

Para analisar os resultados obtidos em dosagens por técnicas imunológicas, sem incorrer em erros de avaliação, é extremamente importante a sua validação e esta precisa ser feita cuidadosamente, principalmente quando se tratar de animais em risco de extinção, para evitar erros de avaliação e tornar uma ferramenta de pesquisa e manejo (WASSER & HUNT, 2005; SCHWARZENBERGER, 2007).

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 avaliação do estresse através da concentração plasmática/sérica de glicocorticosteróides, através da dosagem de amostras obtidas por venopunção e centrifugação de amostra de sangue, é um indicador confiável, acurado e preciso, porém é pontual, não representa os níveis hormonais ao longo do tempo e necessita de contenção para a colheita das amostras (HARPER & AUSTAD, 2000; DEHNHARD et al., 2003). Assim sendo, em animais de vida livre ou altamente estressáveis esta técnica não é preconizada, pois fatores estressantes devido à captura e contenção para a colheita das mesmas, podem alterar as concentrações observadas, além de colheitas repetidas e com grandes volumes, principalmente em animais de pequeno porte, poder levá-los à morte (WASSER et al., 2002).

Assim, as técnicas não-invasivas, tais como dosagem através de fezes, urina ou mistura das duas excreções, são preconizadas para animais selvagens, demonstrando ser uma importante ferramenta para o monitoramento do bem-estar ou estresse nos animais (WASSER et al., 1994; WASSER et al., 2000; ROMERO & WINGFIELD, 2001; WASSER et al., 2002; LUNDBERG, 2005; MCKENZIE & DEANE, 2005). Além de não promover estresse de contenção, as amostras podem ser colhidas em intervalos regulares e seus valores representam níveis circulantes de glucocorticóides ao longo do tempo, sendo a técnica mais comumente utilizada em estudos associado à endocrinologia comportamental (BEERDA et al., 1996; HARPER & AUSTAD, 2000; MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004; COCKREM, 2005; PALME et al., 2005).

Schwazenberger (2007) listou o uso de dosagem hormonal por método não-invasivo em diversas espécies, realizado por vários autores tais como Lee et al., 1999; Wasser et al., 2000 e Pereira et al., 2006, demonstrando a viabilidade do uso desta ferramenta.

4.3. Dosagem hormonal presentes nas excreções

Nas excreções de todos os vertebrados há uma grande quantidade de metabólitos dos hormônios esteróides como os andrógenos, estrógenos e progestágenos, glucocorticóides (dehidroepiandrosterona, corticosterona - mais presente nas aves, anfíbios, répteis e muitos roedores - e cortisol - mais presente nos mamíferos e peixes) e mineralocorticóides (WASSER et al., 2002, MÖSTL et al., 2005).

4.3.1. Fatores que interferem na dosagem

A excreção dos hormônios esteróides pela urina e fezes varia conforme a espécie e o hormônio a ser avaliado (PALME et al., 1996), devendo levar em conta possíveis contaminações ao avaliar as amostras. Já a longevidade dos hormônios presentes nas excreções pode ser afetada pelo local de trabalho (temperatura/ umidade), armazenagem de curto prazo (material conservado em sílica ou etanol) e de longo prazo (material conservado através de

congelamento, secagem ou congelamento à seco), sendo a escolha do melhor método de armazenagem realizada conforme a espécie e o hormônio analisado (WASSER et al., 2002).

Nas aves, a velocidade de excreção dos metabólitos hormonais está diretamente relacionada com o tempo de permanência da ingesta no trato gastro-intestinal e com a taxa de metabolização, os quais estão relacionados ao tipo de alimentação e ao modo de vida do animal (KLASING, 2005).

Os predadores, que se alimentam de carne, têm digestão e metabolização mais lenta e conseqüentemente maior tempo de passagem da ingesta pelo trato gastro-intestinal. 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, devendo neste caso levar em conta, também, a presença ou ausência de estruturas de armazenamento de alimentos, tais como papo e ceco (KLASING, 2005).

Mudanças na dieta do animal também alteram a excreção biliar, podendo incorrer em erros na avaliação, pois os hormônios esteróides são excretados via intestinal através da bile, após *clearance* do sangue pelo fígado. Em um estudo com babuínos, esta alteração foi eliminada através do método de liofilização (*freeze-dried*) das amostras (WASSER et al., 1993). Apesar de haver relatos que em aves a diferença de alimentação não interfere na excreção fecal como nos mamíferos, devido à pequena quantidade de fezes que produzem, alguns autores preconizam a realização da liofilização das amostras antes da pesagem das mesmas, assim como um exame separado para cada *pool* de amostra fecal, de acordo com a dieta oferecida (HIEBERT et al., 2000). Hiebert et al. (2000) relataram que a liofilização eliminou eficientemente a variação da quantidade de água presente entre as amostras, uma fonte potencial de variação na concentração hormonal.

Em patos (*Anas platyrhynchos*) e galinhas (*Gallus domesticus*) os corticosteróides circulantes apresentaram meia-vida de 10 a 15 minutos, sendo excretados pelas fezes e urina (DEHNHARD et al., 2003). Em galinhas, os níveis de corticosterona fecal relacionados ao estresse foram detectados quatro horas após estimulação, demonstrando que a excreção fecal acompanha a dinâmica do plasma sangüíneo com um atraso de $3,5 \pm 1,1$ h.

Essa dinâmica de concentrações dos metabólitos fecais refletiu também o curso da atividade biológica do hormônio no plasma em corvo-marinho-de-faces-brancas (*Phalacrocorax carbo*) e açor (*Accipiter gentiles*) (DEHNHARD et al., 2003).

As colheitas fecais em beija-flor (Trochilidae) obtidas dentro de 15 minutos após a contenção representaram os níveis basais; após 30 minutos apresentaram traços de corticosterona e o pico de excreção de corticosterona fecal ocorre após 60 minutos e desaparece após 90 minutos, porém quando se suplementou com corticosterona (HBC-CORT), os níveis fecais elevaram-se após 30 minutos, provavelmente devido a não absorção pelo trato intestinal (HIEBERT et al., 2000).

Rodrigues et al. (1996) revisaram em pombos que os níveis de corticosterona e de prolactina são inversamente correlacionados. Na época da incubação, os níveis de prolactina encontravam-se elevados, enquanto que os de corticosterona encontravam-se diminuídos, assim como Chastel et al. (2005) em gaivotas (*Rissa tridactyla*) encontraram níveis plasmáticos de prolactina mais elevados em aves com filhotes do que nas sem filhotes e neste período apresentaram correlação negativa com a corticosterona na resposta ao estresse.

Em corujas foram observados dois picos de excreção fecal, sendo o primeiro após duas horas da administração de ACTH e o segundo, após doze horas da administração (WASSER et al., 2000). O pico de excreção de metabólitos de esteróides em duas espécies de psitacídeos (*Amazona amazonica* e *Melopsittacus undulatus*) foi de quatro horas após a injeção do esteróide radiomarcado (LEE et al., 1999).

Em pingüim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*) foi observado pico excreção de glucocorticóides $13 \pm 3h$ após desafio com ACTH. Também foi observado que o manejo de contenção, injeção e isolamento fizeram com que aumentassem os níveis de metabólitos de glucocorticóides em horários diferentes do pico oriundo da indução com ACTH. Foram discutidas também as variações nas respostas devido ao indivíduo e ao momento em que os animais se encontravam no momento da pesquisa (NAKAGAWA et al., 2003).

Queiroz (2006) observou que machos de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) apresentaram menor excreção de glucocorticóides no

outono, sendo a excreção semelhante na primavera, verão e inverno. Machos pareados apresentaram valores maiores que os machos não pareados, sendo estes maiores na fase de pré-postura e postura, declinando durante a incubação dos ovos.

Essa autora observou também níveis mais elevados nas fêmeas durante a primavera, porém quando contidas em gaiola durante o inverno, apresentaram níveis médios de glucocorticóides mais elevados que machos na mesma condição. Uma das explicações para essa elevação pode ser o procedimento de manejo durante a realização do estudo, pois elas não eram acostumadas ao manejo de contenção em gaiolas. Goymann et al. (2002) observaram também influência do manejo na excreção fecal de tordo-europeu (*Saxicola torquata rubicola*), havendo ausência de fezes em alguns horários durante a colheita.

Frigerio et al. (2004), relataram que a baixa temperatura ambiente influenciou a excreção de glucocorticóides, tendo maiores níveis no inverno, pois a excreção de GC pode estar relacionada com a termorregulação corporal. Astheimer et al. (1994) discutiram que alterações da temperatura ambiental e do clima nos dias do experimento influenciaram a resposta à administração de ACTH em passarinho-do-Ártico (*Zonotrichia leucophrys gambelii*).

As diferenças de metabólitos devem-se às particularidades na microbiota intestinal e no metabolismo dos glucocorticóides (VYLITOVÁ et al., 1998). Assim é de fundamental importância a escolha do anticorpo para a análise das amostras, para evitar falsos positivos ou negativos, além da validação da técnica de detecção dos níveis de glucocorticóides fecal, devido a grande variabilidade de excreção com relação às espécies (WASSER et al., 2002).

Wasser et al. (2002) relataram a importância de se ter um ambiente controlado durante a realização das dosagens hormonais, assim como Thiel et al. (2005) relataram que a ineficiente separação entre fezes e urina pode alterar os valores observados.

5. Testes de validação laboratorial

Os “kits” de dosagem hormonal foram desenvolvidos para a mensuração dos hormônios presentes na circulação sistêmica e, como nas fezes há

metabólitos hormonais e não o hormônio original, há a necessidade de validação das ferramentas de análise, para não haver avaliação errônea dos níveis encontrados (WASSER et al., 2002).

A obtenção adequada da especificidade, sensibilidade, precisão, acurácia e reprodutibilidade do ensaio, dependem do controle de precisão da pipetagem, controle da temperatura, tempo de incubação e análise dos dados (BROWN et al., 2004).

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

5.1. 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).

5.2. Curva de paralelismo

O teste de curva de paralelismo é realizado para demonstrar se as amostras têm comportamento semelhante à curva padrão, 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).

5.3. 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 (CV) de no máximo 20% (BROWN et al., 2004).

6. Teste de validação fisiológica

O teste de validação fisiológica é fundamental para avaliar se a acurácia na mensuração hormonal reflete os eventos fisiológicos de interesse (BROWN et al., 2004). Envolve comparação entre dois grupos com diferentes níveis de produção de glucocorticóides, podendo ser esta produção obtida por estimulação natural, como por exemplo, pela produção hormonal devido à fuga de um predador (CHINNADURAI, 2006); ou por estimulação da produção hormonal à partir da administração de drogas, sendo utilizada para demonstrar a causa-efeito relacionado entre a administração exógena e subsequente excreção do hormônio (PALME et al., 2005).

Para o teste de validação fisiológica dos hormônios ligados ao estresse, pode-se administrar dexametazona para suprimir a função da adrenal, excluindo os fatores antecedentes ao manejo empregado para promover o aumento dos níveis hormonais plasmáticos ou administrar ACTH, para estimular a produção hormonal pela adrenal (WASSER et al., 2000; MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004; PALME et al., 2005). Para avaliar o pico

de excreção hormonal devido à administração farmacológica, deve-se somar à média, 1,5 vezes o desvio padrão (pico de excreção = média + 1,5 x desvio padrão) (QUEIROZ, 2006).

6.1. Desafio com administração de ACTH

A administração de ACTH mostrou-se capaz de elevar os níveis plasmáticos de glucocorticóides e consequentemente os níveis fecais de metabólitos excretados em pingüim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*), assim como em passeriformes, sendo observado aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona após 30 minutos da injeção intraperitoneal de ACTH (WILSON & HOLBERTON, 2001; NAKAGAWA et al., 2003).

Porém, Astheimer et al. (1994) observaram que foram necessárias altas doses de ACTH para promover aumento dos níveis de glucocorticóides plasmáticos em passeriformes-do-Artico (*Zonotrichia leucophrys*) e que em machos houve maior resposta à injeção de ACTH. Já Wingfield (1994) demonstrou que a contenção para administração de ACTH foi capaz de promover o estresse por si só.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 15 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) hígidos, adultos, com idades variadas e sem comprovação do *status* reprodutivo, provenientes de apreensão pelas Polícias Militar Ambiental e Federal e IBAMA, mantidos em viveiros coletivos no Instituto Floravida - Centrofauna (Projeto de Reabilitação e Soltura de Animais Silvestres), localizado no município de Botucatu- São Paulo- Brasil.

Durante o período experimental, todos os animais receberam ração extrusada para psitacídeos (Alcon®), alimento para papagaio com frutas (Nutripássaros®), sementes e frutas frescas (girassol, banana, abacaxi, pêra, kiwi, goiaba, maçã, laranja, caqui, maracujá doce e mamão), conforme manejo alimentar, sendo a água disponível à vontade.

2. Sexagem das aves

Entre os meses de março à maio de 2007, foram realizadas colheitas de canhão de pena das aves, para realização da 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.

As amostras foram mantidas em álcool 100% em freezer a -20°C até seu processamento para isolamento de DNA. A metodologia empregada para extração de DNA total baseia-se no protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001) que emprega fenol-clorofórmio, como descrito abaixo.

Extração de DNA: Colocou-se o tecido em uma cubeta mantida em gelo e macerou-o em nitrogênio líquido, com auxílio de um bastão. Adicionou-se quatro ml de solução de digestão - tampão TNES (Tris-HCl 0.01M pH 8,0; NaCl 0,1M; EDTA 0,25M pH 8,0; SDS 0.5%) e RNase 100 µg/ml, sobre o tecido já macerado. Incubou-se o material, em um tubo de 15 ml, em banho-maria a 50° C por uma hora. Após este período, adicionou Proteinase K 100 µg/ml e manteve o material em banho-maria a 50° C, durante quatro horas, agitando

periodicamente. Adicionou fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) ao material, em um volume igual ao da solução homogeneizada, e inverteu o tubo cuidadosamente durante 15 minutos (min). Centrifugou o material a 9.000 x g por 15 min e passou o sobrenadante, com o auxílio de uma micropipeta, para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, acrescentou NaCl 1M e dois volumes de etanol absoluto gelado e inverteu o tubo diversas vezes. Centrifugou o material a 9.000 x g por dez min e descartou o sobrenadante. Adicionou cerca de um ml de etanol 70% ao tubo e centrifugou-o a 9.000 x g por mais cinco min. Descartou novamente o sobrenadante e secou o DNA à temperatura ambiente *overnight*. Depois de seco, dissolveu o DNA em um volume apropriado (geralmente 1ml) de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi mantido a -20°C em tubos de 1,5 ml após completamente dissolvido.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), posteriormente corado com brometo de etídio (10 mg/ml) (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) e visualizado em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta.

Para identificação do sexo dos animais, através das amostras de DNA obtidas, foi utilizada a metodologia descrita por Griffiths et al. (1998), baseada na amplificação de dois genes CHD (cromo-helicase-DNA-ligantes) que se localizam nos cromossomos sexuais de várias aves. A metodologia empregou um único conjunto de primers em PCR, que se anela a regiões conservadas de éxons de ambos os genes, mas que amplificaram uma região de íntron que difere em tamanho entre os genes CHC-W e CHD-Z, o que permitiu a amplificação de um único fragmento de DNA em machos e de dois fragmentos de tamanhos distintos em fêmeas. Cada reação de amplificação consistiu de tampão de reação 1x (KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, Tris-HCl 10mM), 200 µM de cada dNTP, 100 pmol de primer (primer P8: 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3' e primer P2: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'), MgCl₂ 1.5mM, 50ng de DNA total e 1.25 unidade de Taq DNA polimerase, em um volume total de 25 µl. As reações de amplificação, realizadas em termociclador PTC-100TM (MJ Research), seguiram o seguinte programa: desnaturação inicial a 94° C por um min e 30 segundos (s), seguida de 30 ciclos com hibridação a 48° C por 45 s, extensão a 72° C por 45 s

e desnaturação a 94°C por 30 s, além de um passo final de hibridação a 48° C por um min e de extensão a 72° C por cinco min. Um controle negativo, consistindo de todos os componentes, exceto DNA molde, foi também incluído para monitorar qualquer possível contaminação.

Os produtos de amplificação (12,5 µl) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), durante quatro horas a 110V/150A. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta, após coloração do gel de agarose com brometo de etídio (10 mg/ml) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Para fotografar o gel, foi utilizado o equipamento Eagle Eye® (Stratagene) e os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados através de comparação com um marcador de peso molecular conhecido (1Kb Plus DNA Ladder - Gibco.Br - Figura 01).

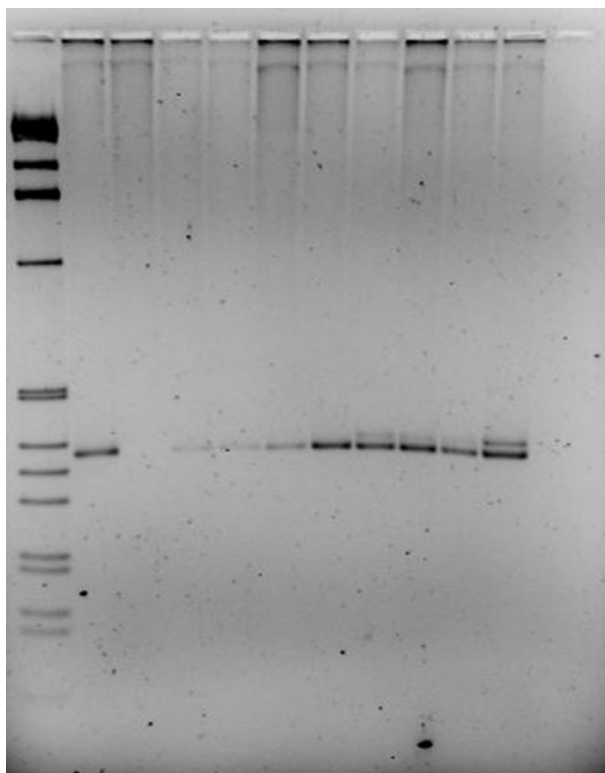


Figura 01 – Gel de agarose evidenciando os padrões de amplificação para os genes CHD. Amostras que evidenciam dois fragmentos de DNA correspondem a indivíduos do sexo feminino e amostras que evidenciam um único fragmento de DNA correspondem a indivíduos do sexo masculino. À esquerda, marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder).

3. Grupos experimentais e desafio com ACTH ou solução salina

A partir dos resultados da sexagem, foram selecionados, de forma aleatória, 8 indivíduos, sendo 04 machos e 04 fêmeas.

No dia da realização do experimento, os animais foram capturados com auxílio de puçá, removidos do viveiro coletivo, acondicionados em gaiolas individuais (com aproximadamente 50 cm de largura e profundidade, por 60 cm de altura – Figura 02) com fundo forrado com papel e transportados para uma sala onde foi realizado desafio experimental.

Os animais foram inicialmente divididos em 2 grupos: Grupo Controle (C) e Grupos Tratamento (T), compostos por 2 machos e 2 fêmeas cada.

Os animais do Grupo Controle receberam 0,2 ml de solução salina (0,9% NaCl) e os animais do Grupo Tratamento receberam 25 UI/animal de ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico de suíno, Sigma-Aldrich Brasil Ltda), ressuspendidos em 0,2 ml solução salina; todas as administrações foram realizadas por via intramuscular, no músculo peitoral.

O tempo máximo entre a captura das aves até a administração das soluções foi de 15 minutos.

Imediatamente após a administração das soluções (ACTH para o Grupo Tratamento e solução salina para o Grupo Controle), foram coletadas amostras individuais de fezes. A partir desse momento, as colheitas se repetiram a cada 30 minutos durante 10 horas e as amostras obtidas foram agrupadas a cada 01 hora.

O forro de papel era trocado após cada coleta para evitar possíveis contaminações das amostras seguintes, que após serem recolhidas foram acondicionadas em criotubos e permaneceram resfriadas por até 10 horas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável (5°C), sendo posteriormente armazenadas à -20°C até o momento da liofilização (Figura 02).

Sete dias após a realização do experimento, este foi repetido, invertendo-se os grupos experimentais, de modo que, os animais que inicialmente foram alocados no Grupo Controle passaram a fazer parte do Grupo Tratamento e vice-versa.

A temperatura média nos dias de colheita variou 05 à 18° C, sendo chuvoso apenas na 1ª coleta e os demais, ensolarados.

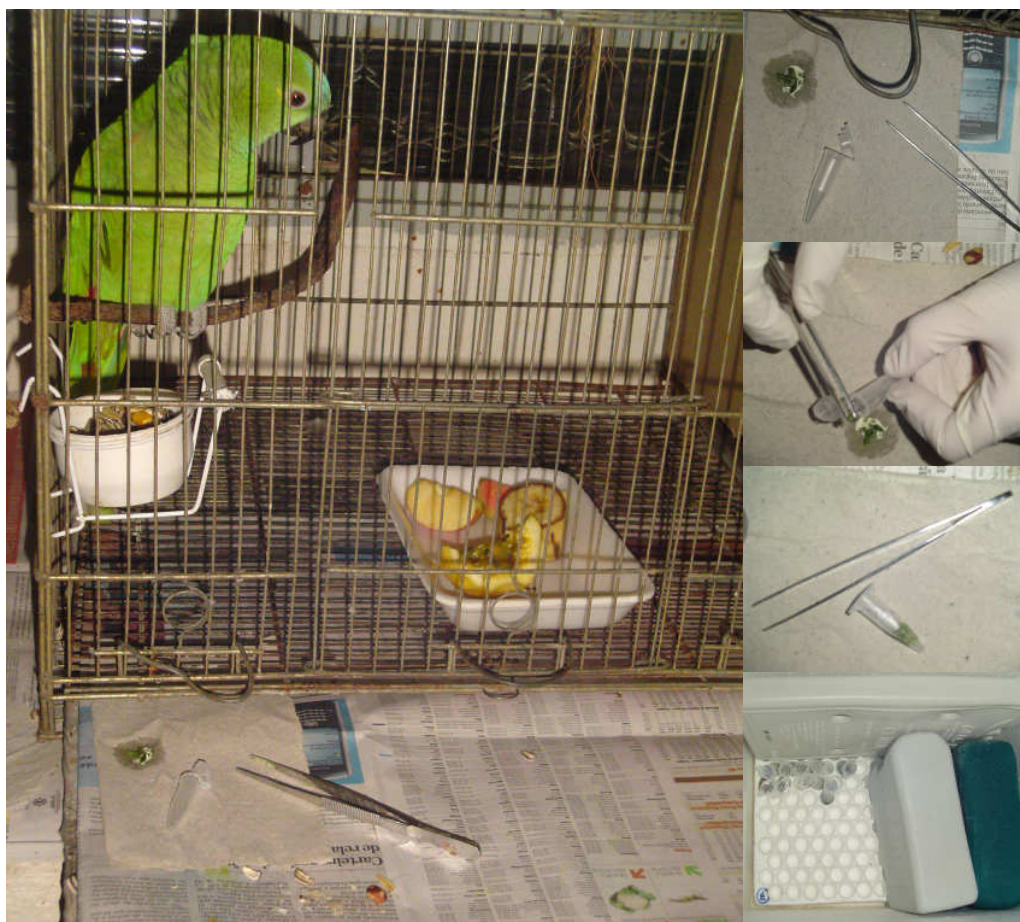


Figura 02 - Fotos do papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) contido na gaiola e das etapas de colheita de material fecal e armazenagem por curto prazo

A- papagaio-verdadeiro contido em gaiola individual com fundo forrado com papel e alimentado: com frutas frescas, sementes de girassol, ração extrusada - Alcon® e alimento com frutas- Nutripássaros®, e água *ab libitum*;

B- Materiais utilizados (pinça e microtubo) para colheita e armazenamento de amostra fecal;

C- Colheita de amostra fecal;

D- Amostra fecal contida em microtubo;

E- Armazenamento das amostras fecais em microtubos, mantidas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável até o término do período de colheita.

4. Processamento das amostras

4.1. Liofilização

A liofilização foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Campus Botucatu. Vinte e quatro 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 e dosagem hormonal.

4.2. Extração de metabólitos hormonais

A extração hormonal das amostras fecais foi realizada no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Zootecnia da UNESP-Jaboticabal, seguindo-se a metodologia descrita por Graham et al. (2001) modificada. Inicialmente, amostras de 0,05 g ($\pm 0,002$) de fezes liofilizadas foram diluídas em um ml de metanol 80%, levadas ao agitador (vórtex) em velocidade máxima para a primeira homogeneização, tomando-se o cuidado de manter o mínimo de amostra aderido à parede e mantidos em agitador Kline® por 12 horas (*overnight*). O extrato foi centrifugado a 500 x g por 20 minutos, o sobrenadante recuperado em tubos de vidro com tampa e mantido em freezer à -20°C até o momento da dosagem.

5. Dosagem hormonal dos metabólitos de glucocorticóides

Os níveis de metabólitos de cortisol fecal foram mensurados através da Técnica de Enzimoimunoensaio Direto no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Zootecnia da UNESP-Jaboticabal e os de corticosterona fecal, através da Técnica de Radioimunoensaio, no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-Botucatu.

Os procedimentos realizados para a validação laboratorial do método de dosagem hormonal foram: Curva de paralelismo, Curva de dose-resposta, Controle de qualidade,

A validação fisiológica foi realizada por administração de ACTH e solução salina.

5.1. Enzimoimunoensaio direto

Foram utilizadas placas de poliestireno contendo 96 poços, que foram incubadas com 50 µl de anticorpo policlonal (cortisol R4866 – Anexo A), acrescido de 5 ml de solução *coating buffer* (Tabela 01) e mantidas em geladeira (4°C) por 12 horas. Após esse período, as placas foram lavadas com *solução de lavagem* (Tabela 01), receberam 50 µl da curva padrão (A= 0,039; B= 0,078; C=0,156; D= 0,312; E= 0,625; F=1,25; G= 2,5; H= 5; I= 10; J= 20 ng/ml), 50 µl das amostras, 50 µl dos controles nos seus poços, sempre em duplicata, acrescido de 30 µl de *solução HRPO* (cortisol-horseradish peroxidase) diluído em 6 ml de *solução EIA* em todos os poços e foram mantidas em incubação sem agitação por 1 hora. Em seguida, as placas foram novamente lavadas, receberam 10 µl de solução de ABTS* (40 µl 0,5M H₂O₂ + 125 µl 40mM ABST + 12,5 µl solução tampão) (Tabela 01) em seus poços e foram incubadas com agitação por até 60 minutos ou até que a amostra contendo o padrão A atingisse os valores de leitura de densidade óptica entre 0,9 a 1,0, realizada pelo aparelho de contagem Dynex Revelation 4.01®.

Para a construção da curva padrão, foi utilizado a solução padrão Cortisol Working STOCK (20 ng/ml) diluída em *tampão EIA BP* (pH 7,0) (Tabela 01), que era sempre preparado a cada realização da dosagem.

Para a elaboração dos controles foi realizada a extração de cinco gramas de um mistura de amostras hormonal que foi empregada para determinação do coeficiente de variação intra e interensaio.

* Solução de ABTS: há mudança de cor da solução presente nos poços quando há ligação do anticorpo presente na parede dos poços com o antígeno (hormônio) marcado com HRPO.

Tabela 01- Materiais necessários para preparar as soluções utilizadas na técnica de EIA para dosagem de cortisol fecal em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)

<i>Coating buffer</i>		
Na ₂ CO ₃ (seco)	0,795 g	Sigma, S2127
NaHCO ₃	1,465 g	Sigma, S8875
H ₂ O	500 ml	

Manter a 4°C (pH 9.6)

<i>Solução diluição (Tampão EIA - BSA)</i>		
Estoque A 0,2M NaH ₂ PO ₄	13,9 g	Sigma, S9638
Estoque B 0,2 M NaH ₂ PO ₄	14,2 g	Sigma, S0876
H ₂ O	500 ml	

Estoque A	97,5 ml	
Estoque B	152,5 ml	
NaCl	4,35 g	Sigma, S9625
BSA	0,5 g	Sigma, A7906
H ₂ O	250 ml	

Manter a 4°C (pH 7.0)

<i>Concentrado para solução lavagem</i>		
NaCl	43,83 g	Sigma, S9625
Tween 20	2,5 ml	Sigma, S1379
H ₂ O	500 ml	

Estocar a 4°C. Diluir em 10 partes de água para utilizar.

<i>Tampão substrato</i>		
Ácido cítrico (seco)	4,805 g	Sigma, C0759
H ₂ O	500 ml	

Manter a 4°C (pH 4.0)

<i>Solução ABTS</i>		
ABTS	0,55 g	Sigma, A1888

Manter a 4°C (pH 6.0). Produto sensível à luz

<i>Peróxido hidrogenase (0.5 M)</i>		
H ₂ O ₂	500 µl	Sigma, H1009
H ₂ O	8 ml	

Manter a 4°C

<i>HRPO Cortisol</i>		
HPRP estoque	25 µl	
Tampão EIA	2,475 ml	

Manter o HRPO estoque a -80°C

5.2. Radioimunoensaio

Para dosagem de corticosterona foi utilizado Kit comercial de fase sólida Coat-A-Count® Rat- Corticosterone da DPC-MedLab (Ref. TKRC1-100 tubos; Los Angeles-Califórnia – Anexo A) conforme as instruções do fabricante, a leitura foi realizada pelo aparelho de contagem Gama Counter® – Cobra II (Packard BioScience Company), no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP - Botucatu.

Devido à baixa concentração de metabólitos de corticosterona em algumas amostras, além da curva padrão (Curva I: A=0; B=20; C=50; D=100; E=200; F=500; G=1000 e H=2000 ng/ml) fornecidas pelo fabricante, foi gerada uma segunda curva (Curva II: I=0; J=0,6; K=1,2; L=2,5; M=5; N=10; O=20 e P=50 ng/ml), que mantinha a mesma proporção da original (Curva I). Para a realização do teste de paralelismo foi empregada a Curva II e para a mensuração nas amostras fecais após administração de ACTH, foram utilizadas as Curvas I e II, respectivamente, para as amostras com elevadas e baixas concentrações.

6. Validação laboratorial

6.1. Dose-resposta

Para a confecção da curva dose-resposta do cortisol, retirou-se 400 µl de uma amostra em que se presumia ter a menor concentração hormonal. Com esta amostra fez duas diluições, 1:4 e 1:8, com tampão diluição. As soluções obtidas foram empregadas, por meio de diluições sucessivas, para a elaboração de 10 novas amostras contendo 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156; 0,078 e 0,039 ng/mL de cortisol proveniente de uma solução de Cortisol Working STOCK (20 ng/ml). A dosagem das amostras foi feita pela técnica de EIA conforme descrito anteriormente e a curva de dose-resposta foi obtida pela correlação entre a dosagem de quantidades (ng/g) de cortisol pré-estabelecida adicionadas em extratos fecais de papagaio-verdadeiro e a quantidade de cortisol estoque diluída em solução tampão, na mesma proporção que da extração fecal.

Para a curva dose resposta da corticosterona, foi retirado 50 µl de 10 amostras com menor concentração de metabólitos de corticosterona, e a partir do volume obtido (500 µl), foram preparadas oito diluições $\frac{1}{2}$ empregando-se as soluções padrões fornecidas pelo fabricante do Kit. A dosagem foi realizada pela técnica de RIA conforme descrito anteriormente e a curva de dose-resposta de corticosterona foi obtida a partir da correlação entre da dosagem de quantidades (ng/ml) de corticosterona pré-estabelecidas adicionada em extratos fecais de papagaio-verdadeiro e a curva padrão presente no kit de corticosterona.

6.2. Curva de paralelismo

Para saber se as dosagens das amostras seguiam a curva padrão na mesma proporção, sem subestimar ou superestimar os valores, realizou-se a curva de paralelismo. Para a dosagem de cortisol, foi retirado 150 µl de oito amostra em que se presumia ter as maiores concentrações hormonais, obtendo um *pool* de 1200 µl, que foi evaporado em bomba de vácuo invertida e re-suspendido em um ml de *solução diluição*. Empregando-se a solução *tampão EIA BP* (pH 7,0) foram realizadas nove diluições $\frac{1}{2}$ sucessivas de modo a se obter amostras até a diluição 1/512. As 10 amostras obtidas foram dosadas para a concentração de cortisol. Os resultados obtidos nas amostras diluídas e na curva padrão foram transformados logaritmicamente na base 10 e, também, empregados para o cálculo da porcentagem de ligação. Com os dois resultados foi construída a curva a partir da regressão simples entre os valores de metabólitos de cortisol mensurados (ng/g) em extrato fecal de papagaio-verdadeiro em diluições seriadas e em solução estoque diluída na mesma proporção que o extrato fecal, para se verificar o paralelismo entre elas.

Já para a dosagem de metabólitos de corticosterona, foi retirado 100 µl de quatro amostras em que se presumia ter as maiores concentrações hormonais, obtendo um *pool* de 400 µl. Empregando-se metanol 100% PA foram realizadas nove diluições $\frac{1}{2}$ sucessivas de modo a se obter amostras até a diluição 1/512. Os resultados obtidos nas amostras diluídas e na curva padrão foram transformados logaritmicamente na base 10 e, também, empregados para o cálculo da porcentagem de ligação. Com os dois resultados

foi construída a curva para se verificar o paralelismo entre elas, do mesmo modo que descrito para a construção da curva de paralelismo após a dosagem de cortisol pela EIA.

6.3. Controle de qualidade

Para saber a precisão do teste, ou seja, a capacidade de repetibilidade da técnica empregada, foi calculado o coeficiente de variação intra-específico (em um mesmo ensaio, onde verificou se houve variação de pipetagem) e interespecífico (entre os ensaios subseqüentes, para verificar a variação de reação entre antígeno e anticorpo). Para tanto foram empregados os resultados obtidos na dosagem hormonal dos controles realizados em duplicata.

Os coeficientes de variação intra e interensaio foram obtidos, entre as duplicatas, pelo seguinte cálculo: desvio padrão/média X100.

7. Validação fisiológica

Os resultados das dosagens hormonais (cortisol e corticosterona) das amostras obtidas após a administração de 25 UI/animal de ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico de suíno, Sigma-Aldrich Brasil Ltda) e 0,2 ml de solução salina (0,9% NaCl) foram empregadas para a realização da validação fisiológica dos ensaios, assim como para definir os picos de excreção hormonal, conforme descrito por Queiroz (2006).

8. Análise estatística

Para a expressão dos picos de excreção dos níveis fecais de metabólitos de glucocorticóides após a administração de ACTH/solução salina, 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.

Para a avaliação dos resultados obtidos nos ensaios dose-resposta empregou-se a correlação de Pearson.

Para a análise estatística de diferença entre os dados de cortisol foi empregado o 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. Para todas as avaliações utilizou-se o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Validação laboratorial

1.1. Dosagem de metabólitos de cortisol

1.1.1. Dose-resposta

A curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de cortisol em amostras fecais diluídas nas proporções de 1:4 e 1:8, adicionadas de quantidades conhecidas de cortisol é representada, respectivamente, pelas equações $y=0,8458x$ com $r^2= 0,9288$ (Figura 03) e $y=1,1208x$ com $r^2= 0,9816$ (Figura 04).

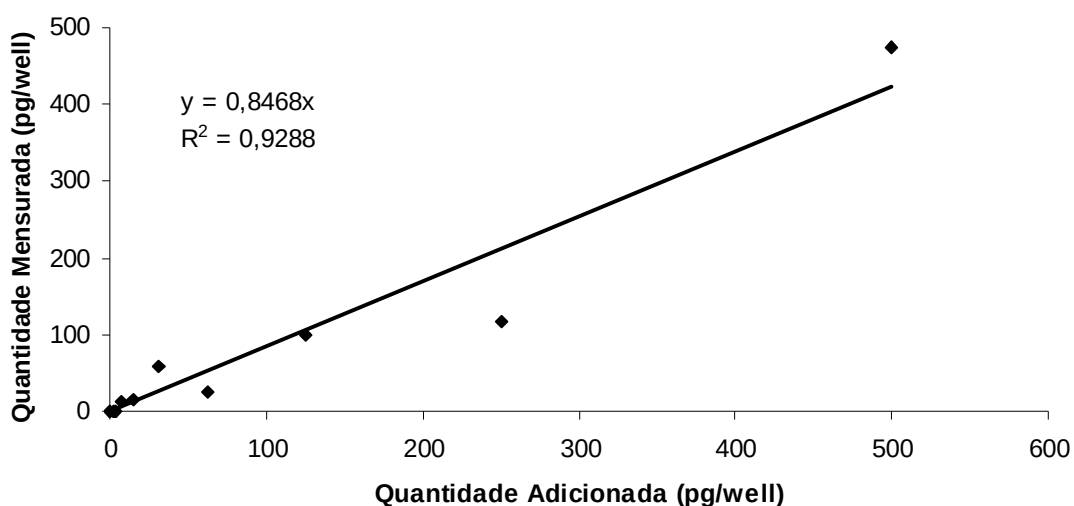


Figura 03 – Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de cortisol em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) diluídas na proporção 1:4 e adicionadas de quantidades conhecidas de cortisol

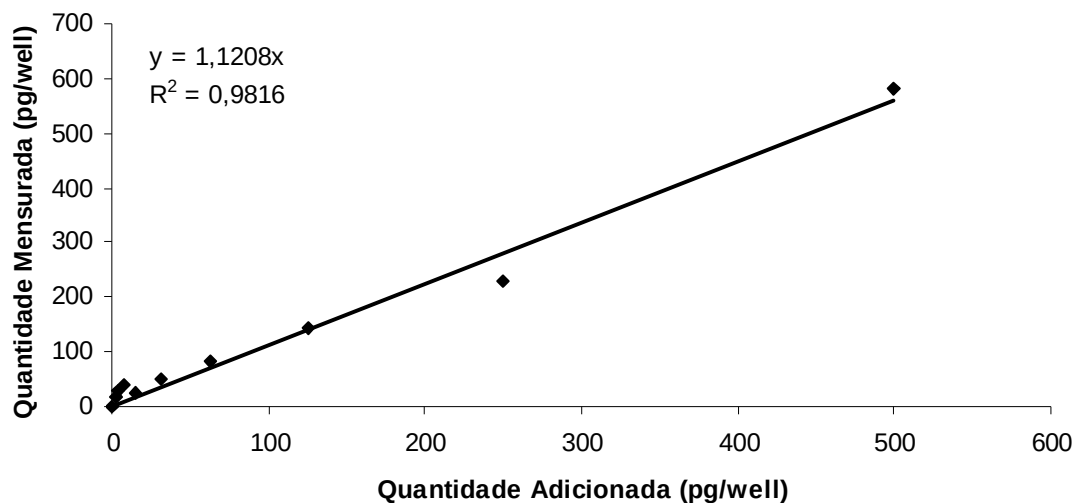


Figura 04 – Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de cortisol em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) diluídas na proporção 1:8 e adicionadas de quantidades conhecidas de cortisol

1.1.2. Paralelismo

As curvas padrão e diluição obtidas no teste de paralelismo realizado para a validação laboratorial da dosagem fecal de metabólitos de cortisol estão expressas na Figura 05.

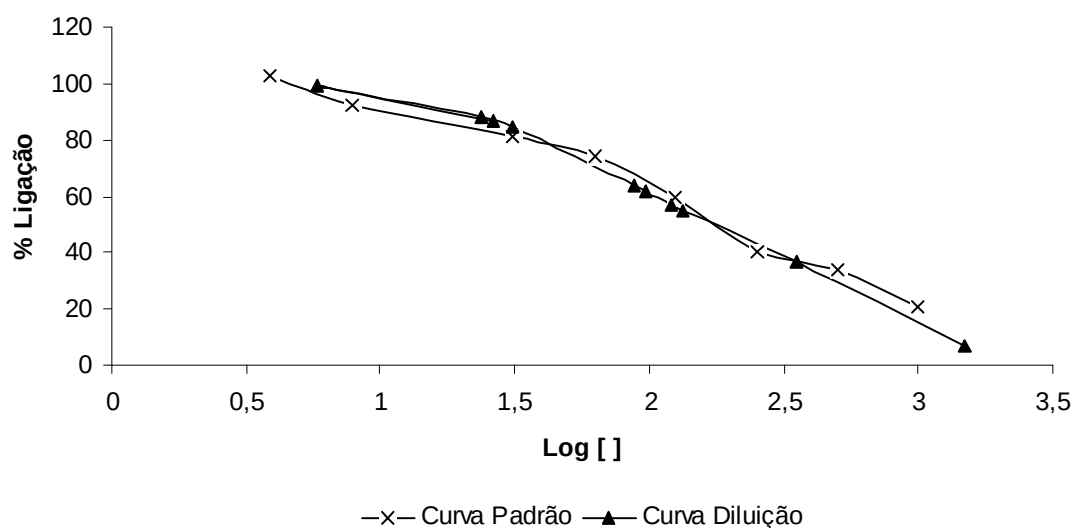


Figura 05 – Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de cortisol em fezes de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), pela técnica de EIA

1.1.3. Controle de qualidade

O coeficiente de variação interensaio obtidos a partir do controle interno, na dosagem de metabólitos de cortisol, foi de 7,26% (n=6; 30% de ligação) e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6,8%.

1.2. Dosagem de metabólitos de corticosterona

1.2.1. Dose-resposta

A curva de dose-resposta dose resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona em amostras fecais adicionadas de quantidades conhecidas de corticosterona é representada pela equação $y = 0,7837x$ com $r^2 = 0,9988$ (Figura 06).

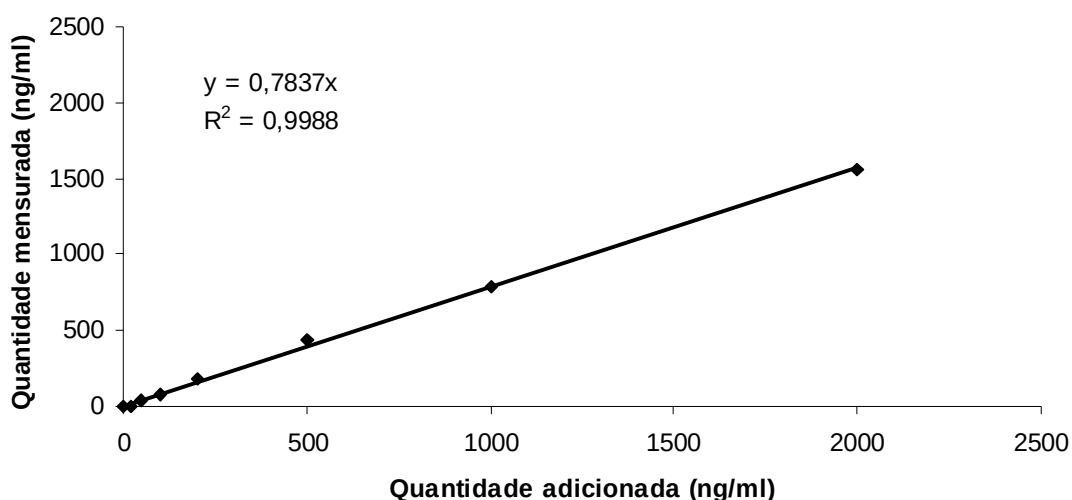


Figura 06 – Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) adicionada de quantidade conhecida de corticosterona

1.2.2. Paralelismo

As curvas padrão e diluição obtidas no teste de paralelismo realizado para a validação laboratorial da dosagem fecal de metabólitos de corticosterona estão expressas na Figura 07.

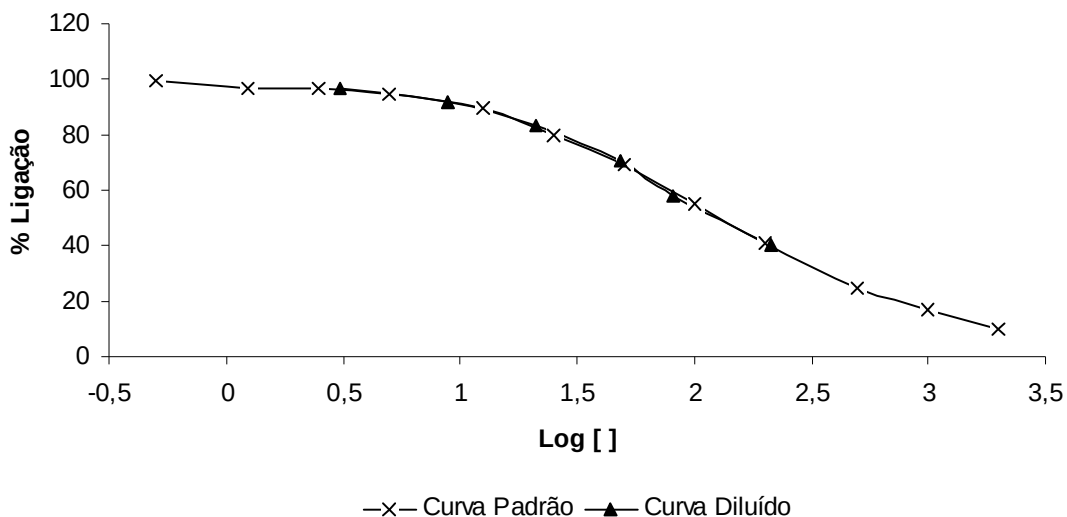


Figura 07 – Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de corticosterona em fezes de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), pela técnica de RIA

1.2.3. Controle de qualidade

Na dosagem de metabólitos de corticosterona, o coeficiente de variação inter-ensaio foi de 16,33% (n=4), enquanto que o intra-ensaio foi de 13,97%.

2. Validação fisiológica

2.1. Dosagem de metabólitos de cortisol

Os valores médios e os desvios padrão para a dosagem de metabólitos de cortisol em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle e Tratamento, estão representados nas Figuras 08 (todos os animais), 09 (machos), 10 (fêmeas) e na Tabela 02 (todos os animais).

Empregando-se o conceito de que o pico de excreção de metabólitos fecais caracteriza-se quando o valor médio obtido em um dado momento for maior que a média adicionada de 1,5 vezes o desvio padrão observados quando são considerados todos os valores encontrados, foram identificados os seguintes picos: três horas após a administração da solução salina nas fêmeas

e nos machos do Grupo Controle e três e dez horas após a administração de ACTH, respectivamente, nos machos e nas fêmeas do Grupo Tratamento (Tabela 02).

Considerando-se todos os animais, foram determinados os seguintes picos: três horas após a administração da solução salina e dez horas após a administração de ACTH.

Pelo teste de Student-Newman-Keuls, não foram detectados efeitos de grupo, momento ou sexo nos resultados observado, exceto entre as fêmeas do Grupo Controle e os machos do Grupo Tratamento na hora cinco e entre os machos do Grupo Controle e as fêmeas do Grupo Tratamento na hora dez.

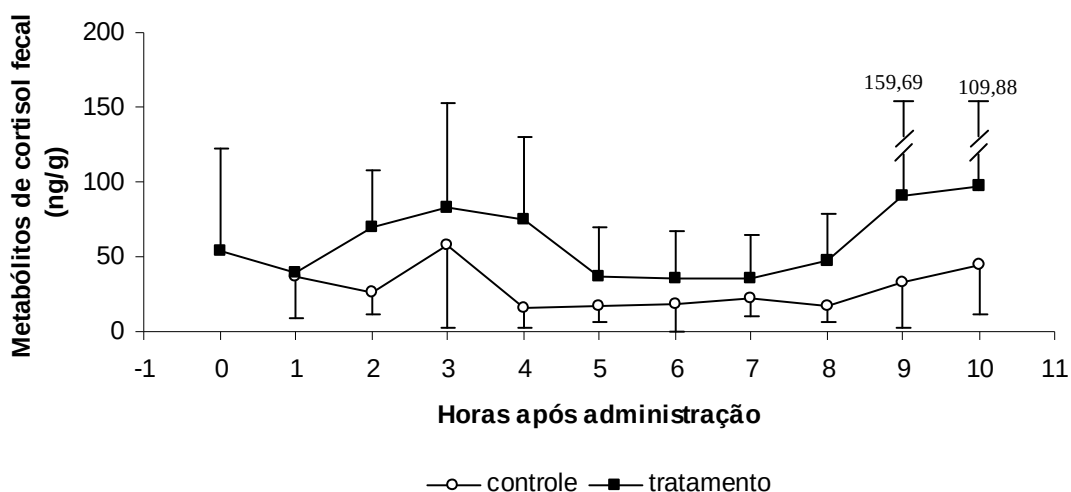


Figura 08- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle ($\circ$ n=8) e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

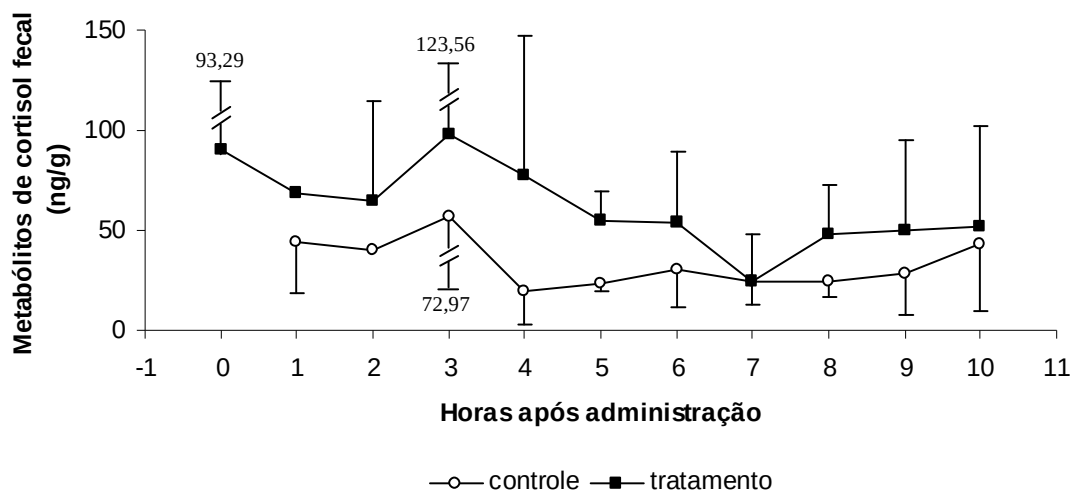


Figura 09- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=4) e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

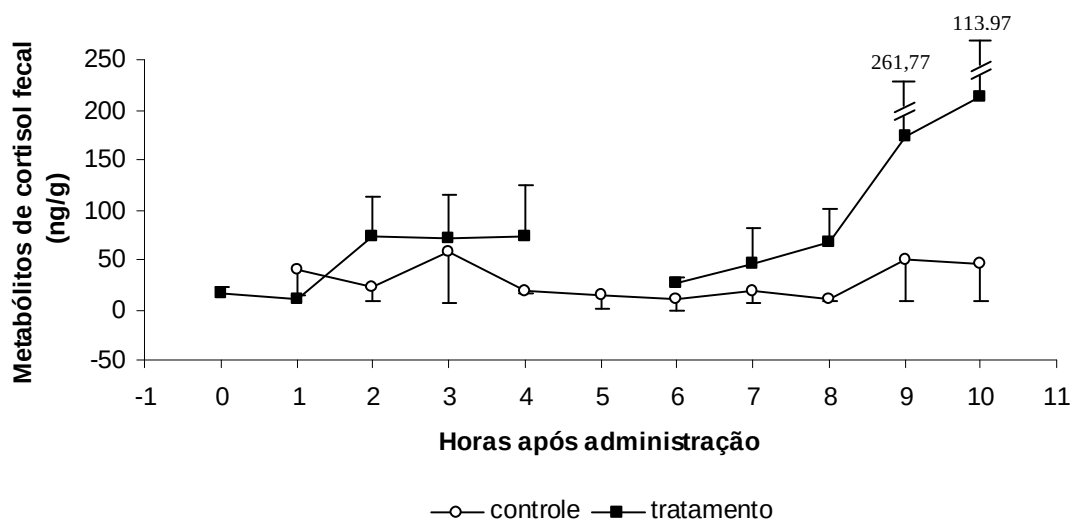


Figura 10 – Valores médio e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) fêmeas obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=4) e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

Tabela 02 - Valores médio (desvios padrão) para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (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)

Horas	<u>Fêmea</u>		<u>Macho</u>		<u>Geral</u>	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	-	17,34 (6,16)	-	89,73 (93,29)	-	53,53 (68,27)
1	41,08 (27,17)	10,55 (40,93)	44,57 (26,35)	68,86 (49,74)	36,70 (27,25)	39,71 (38,37)
2	23,35 (14,28)	72,58 (40,93)	40,64 (49,74)	65,19 (49,74)	26,73 (14,68)	69,62 (38,37)
3	58,43* (51,28)	71,96 (43,04)	56,67* (72,97)	97,85* (123,56)	57,67* (55,59)	82,31 (70,31)
4	18,67 (1,09)	73,81 (50,16)	19,61 (16,80)	77,43 (69,19)	16,03 (13,23)	75,62 (54,09)
5	13,87 (13,33)	-	23,55 (4,33)	54,65 (14,79)	17,73 (11,03)	36,43 (33,24)
6	10,29 (12,15)	26,89 (5,81)	29,92 (18,04)	53,46 (35,60)	18,38 (18,26)	35,69 (31,45)
7	19,21 (12,40)	46,50 (34,36)	24,53 (12,08)	24,47 (23,11)	22,25 (11,50)	35,48 (28,83)
8	11,65 (2,54)	67,56 (33,64)	24,60 (8,26)	48,38 (24,23)	17,41 (11,48)	46,95 (31,51)
9	50,32 (41,87)	173,72 (261,77)	28,81 (20,70)	50,41 (44,97)	33,27 (31,28)	90,35 (159,69)
10	45,54 (37,60)	213,28* (113,97)	42,76 (33,15)	52,23 (49,57)	44,15 (32,85)	97,20* (109,88)
média	29,24	77,42	33,57	62,06	29,03	60,26
desvio padrão	17,81	66,24	11,94	20,74	13,83	23,47
pico de excreção	55,95	176,77	51,47	93,17	49,78	95,47

(*) pico de excreção (-) ausência de produção fecal (.) ausência de valores de desvio padrão

2.2. Dosagem de metabólitos de corticosterona

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 Grupos Controle e Tratamento, estão representados nas Figuras 11 (macho e fêmea), 12 (macho), 13 (fêmea) e Tabela 03 (todos os animais).

Para a excreção fecal de metabólitos de corticosterona foram identificados os seguintes pico: 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 (Tabela 03). Considerando-se todos os dois animais, foram determinados os seguintes picos: oito horas após a administração da solução salina e quatro horas após a administração de ACTH.

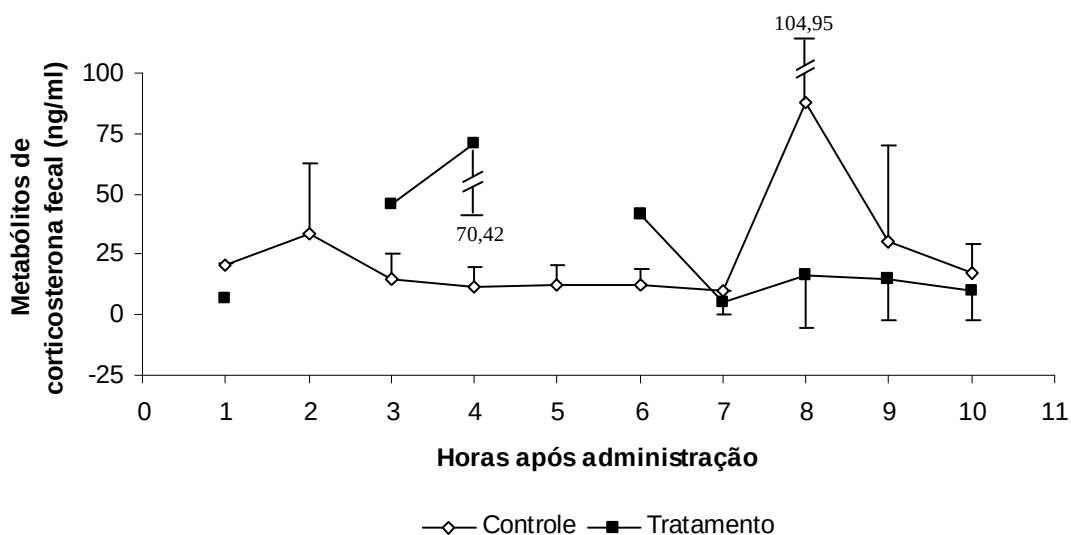


Figura 11 – Valores médio e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=2) e Tratamento (■ n=2)

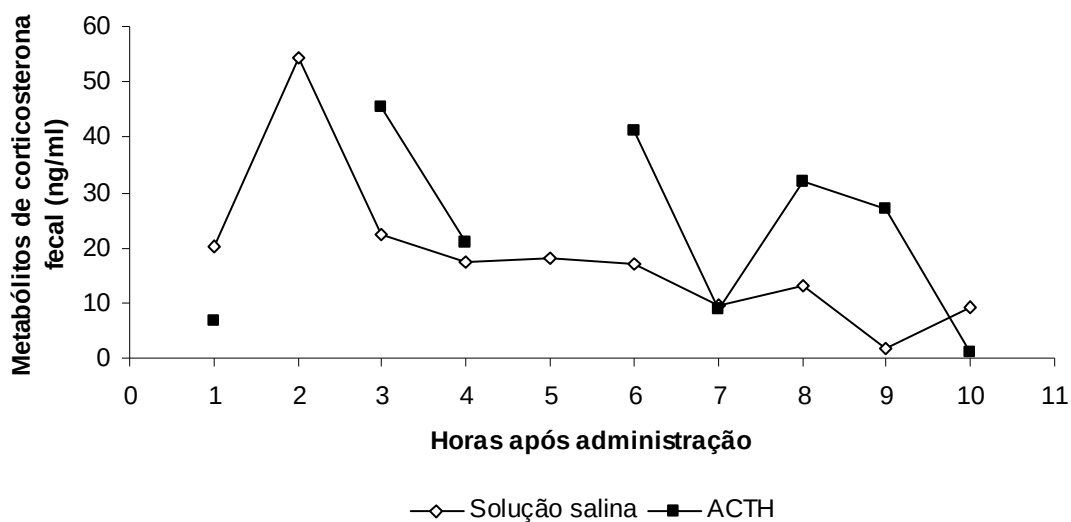


Figura 12 – Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) macho obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

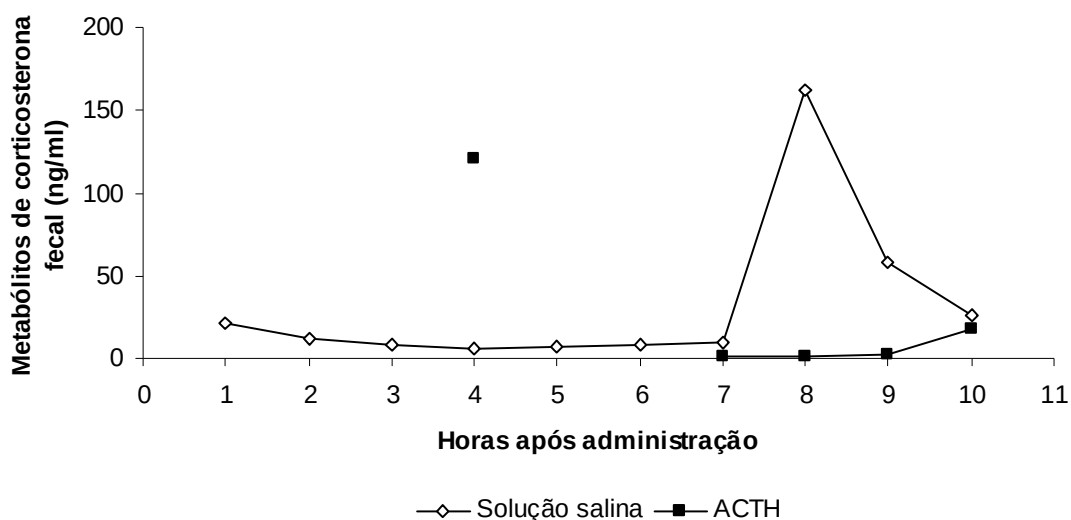


Figura 13 – Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) fêmea obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

Tabela 03 - Valores médios (desvios padrão) e picos de excreção de metabólitos de corticosterona fecal (ng/ml) obtidos em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) durante 10 horas após a injeção de solução salina e ACTH, respectivamente, em uma fêmea e um macho dos Grupos Controle e Tratamento, pela técnica de RIA

Horas	<u>Fêmea</u>		<u>Macho</u>		<u>Geral</u>	
	Salina	ACTH	Salina	ACTH	Controle	Tratamento
0	-	-	-	-	-	-
1	21,03	-	20,20	6,75	20,62 (0,59)	6,75
2	11,92	-	54,28*	-	33,10 (29,95)	-
3	7,82	-	22,38	45,49	15,10 (10,30)	45,49
4	5,68	120,66*	17,31	21,07	11,49 (8,22)	70,87* (70,42)
5	6,74	-	17,97	-	12,36 (7,94)	-
6	8,23	-	16,94	41,19	12,58 (6,16)	41,19
7	9,75	1,43	9,62	8,77	9,68 (0,09)	5,10 (5,19)
8	161,64*	0,92	13,22	31,95	87,43* (104,95)	16,44 (21,94)
9	58,40	2,56	1,67	26,82	30,03 (40,11)	14,69 (17,16)
10	25,75	18,23	9,36	1,12	17,56 (11,59)	9,67 (12,10)
média	31,70	35,25	18,30	30,07	25,00	26,27
desvio padrão	48,35	46,72	14,05	25,20	23,32	23,65
pico excreção	104,22	105,33	39,36	67,87	59,97	61,75

(*) pico de excreção (-) ausência de produção fecal (.) ausência de valores de desvio padrão

2.3. Comparação entre dosagens de cortisol x corticosterona

A comparação dos resultados obtidos para a dosagem de metabólitos fecais de cortisol e corticosterona nos dois animais que foram submetidos às dosagens dos dois metabólitos está representada nas Figuras 14 (macho e fêmea) 15 (macho) e 16 (fêmea).

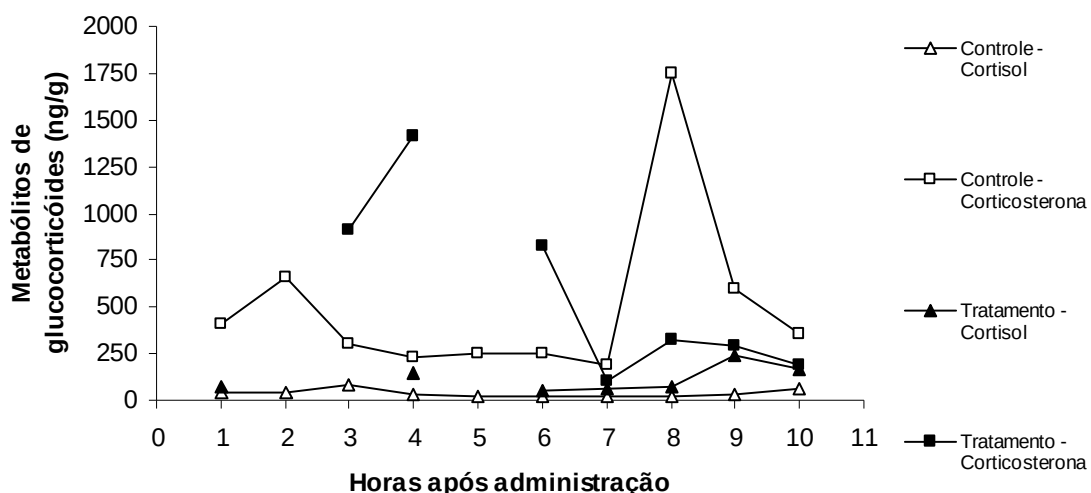


Figura 14 – Valores para a dosagem de metabólitos de cortisol e corticosterona (ng/g) em amostras fecais de dois papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

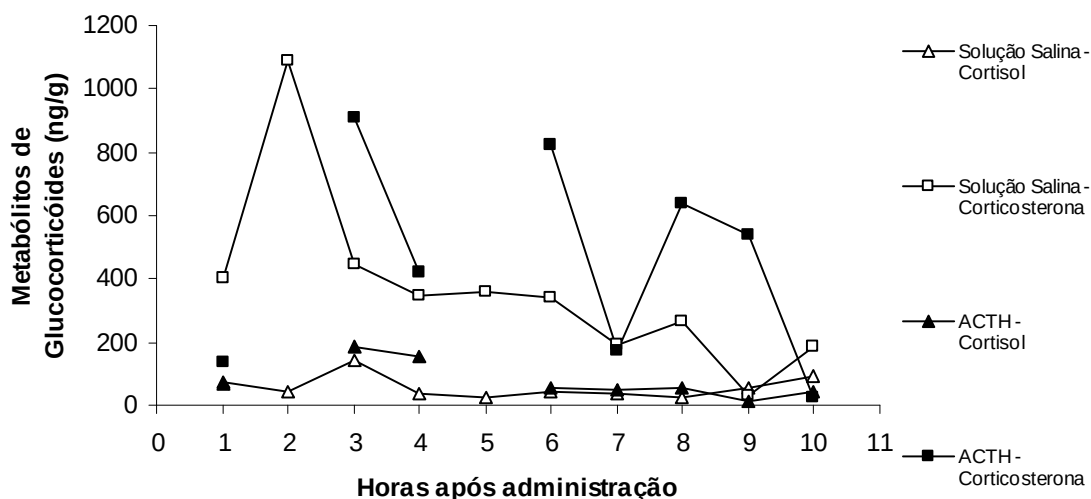


Figura 15 – Valores para a dosagem de metabólitos de cortisol e corticosterona (ng/g) em amostras fecais de dois papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

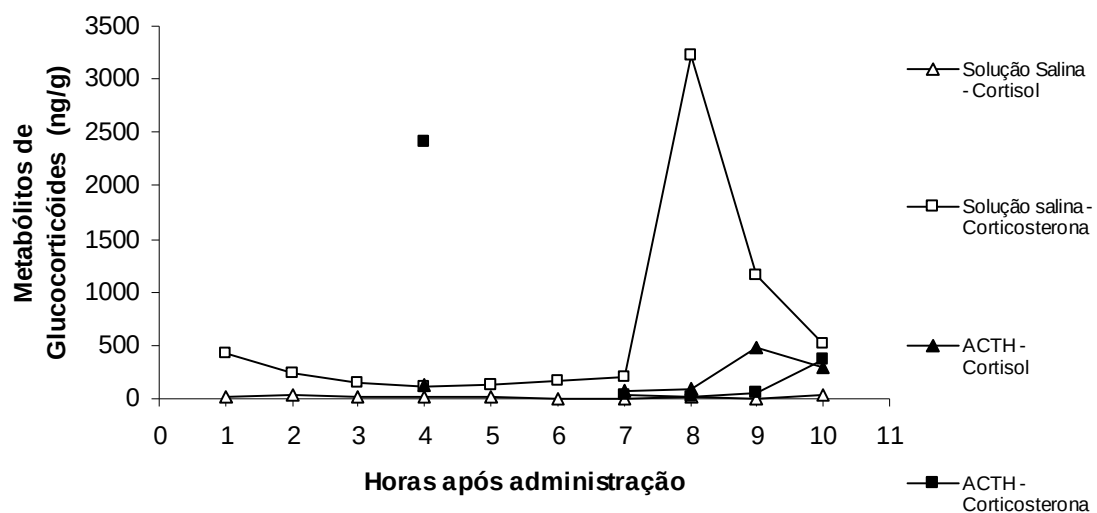


Figura 16 – Valores para a dosagem de metabólitos de cortisol e corticosterona (ng/g) em amostras fecais de dois papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) fêmeas obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

DISCUSSÃO

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.

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 colheiteiro. 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.

Os resultados obtidos a partir da validação dose-resposta tanto para dosagem de cortisol pela técnica de EIA (Figuras 05 e 06), quanto de corticosterona pela de RIA (Figura 08), resultaram em curvas passíveis de serem representadas por equações de correlação de primeiro grau ($y=a.x$) que apresentavam valores de r^2 próximos à um. Segundo Brown et al. (2004) e Möstl et al. (2005) esses resultados demonstram que não houve fatores interferentes nos resultados das análises e, portanto, as duas técnicas foram consideradas validadas por este teste.

As curvas padrão e diluição construídas para a realização do teste de paralelismo, também aplicado como procedimento de validação das dosagens fecais de cortisol e corticosterona realizadas, respectivamente, pelos métodos de EIA e RIA, apresentaram comportamento semelhantes entre si, apresentando um evidente paralelismo entre elas, e encontravam-se dentro da região de confiabilidade do ensaio (Figuras 07 e 09). Segundo Brown et al.

(2004), essas características são necessárias para assegurar que o método de dosagem é adequado para a investigação do metabólito esperado, pois não foram observados os fenômenos de sub ou super estimação dos resultados. Da mesma forma que no procedimento dose-resposta, o teste de paralelismo demonstrou a validade laboratorial das técnicas empregadas.

Os coeficientes inter e intra-ensaio observados nas dosagens realizadas pelas técnicas de EIA e RIA foram menores que 20% e, portanto, demonstraram que não houve grandes alterações nas concentrações de um mesmo controle de amostras dentro e entre os ensaios, evidenciando que os procedimentos de homogeneização das amostras e reagentes, bem com das pipetagens foram realizadas de maneira adequada. Segundo Möstl et al. (2005), esses valores também indicam que não houve interferência quantitativa nas ligações antígeno-anticorpo em relação ao tempo de realização do ensaio e nem diferenças entre as baterias de dosagens, sugerindo que não ocorreu decréscimo da capacidade de ligação antígeno-anticorpo e que os reagentes ou anticorpos radiomarcados encontravam-se dentro da validade. Contudo, Brown et al. (2004) são mais rigorosos na avaliação dos ensaios e recomendam que os valores dos coeficientes de variação não ultrapassem 10%. Sob esta recomendação, apenas os procedimentos realizados para a dosagem de cortisol mostravam-se adequados.

Outro achado interessante foi a validação laboratorial do ensaio para a detecção fecal de corticosterona com anticorpo específico, diferente do verificado por Lothrop et al. (1985) que não conseguiram observar aumento significativo nos níveis de corticosterona quando utilizaram anticorpo específico, obtendo sucesso apenas quando utilizaram anticorpos não específicos.

De maneira geral, o conjunto de procedimentos empregados no processo de validação das dosagens de metabólitos fecais de cortisol e corticosterona realizados, respectivamente, pelas técnicas de EIA e RIA demonstraram que as metodologias empregadas foram adequadas para os objetivos propostos (BROWN et al., 2004).

No presente experimento, os valores médios da concentração fecal de metabólitos de GC 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 apenas com a contenção e administração de ACTH, não se pode excluir a influência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos resultados, pois na maioria dos animais do Grupo Tratamento foi observado níveis mais elevados de GC.

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

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

Zenoble et al. (1985a e 1985b), estudando águias (*Haliaeetus leucephalus*), condores (*Vultur gryphus*) e psitacídeos (*Amazona autumnalis*, *A. aestiva* e *Psittacus erithacus*), também não observaram elevação do cortisol plasmático após a administração injetável de ACTH. Entretanto, esses autores monitorizaram os animais por apenas 90 minutos após a injeção. No nosso estudo os picos de excreção de metabólitos de cortisol fecal nos animais desafiados com ACTH ocorreram sempre após o de excreção de corticosterona, o que sugere que o cortisol, pode se elevar mais tardiamente após o desafio com ACTH.

Outra possibilidade para detecção fecal de cortisol, pode estar relacionada com o fato de ter sido empregado, no presente estudo, anticorpo policlonal (anticorpo contra cortisol R4866) para a dosagem pela técnica de EIA. Portanto, em vez de cortisol, é possível que o que foi detectado nas fezes tenham sido metabólitos de corticosterona ou de outro glicocorticóide.

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

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

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

Esses valores podem ser comparados com os dados encontrados por Lee et al. (1999), que observaram pico de excreção de hormônios esteróides após quatro horas da administração de esteróides radiomarcados em dois gêneros de psitacíformes (*Melopsittacus undulates* e *Amazona amazonica*), e Wasser et al. (2000), Denhard et al. (2003) e Thiel et al. (2005), que após administração de ACTH, observaram, respectivamente, picos de excreção as duas e as 12 horas em duas espécies de corujas (*Strix vari* e *Bubo virginianus*), aumento de excreção de metabólitos de glucocorticóides após quatro horas em galinhas (*Gallus domesticus*), corvo (*Phalacrocorax carbo*) e açor (*Accipiter gentilis*) e variação individual nos picos de excreção em tetraz-grande (*Tetrao urogallus*).

No presente estudo, a grande variação individual dos resultados de excreção fecal de metabólitos de cortisol e corticosterona dosados após desafio com ACTH ou solução salina não permitiu a validação fisiológica dos ensaios, diferente do observado por Lothrop et al. (1985), que desafiaram

psitacíformes com ACTH e dosaram cortisol e corticosterona plasmáticos, Lee et al. (1995), que estudaram a excreção fecal de esteróides sexuais radiomarcados em pardal (*Zootrichia leucophrys oriantha*), e Goymann et al. (2002) e Nakagawa et al. (2003), que realizaram dosagens fecais de corticosterona, respectivamente, em tordo-europeu (*Saxicola torquata rubicola*) e pingüim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*), após desafio com ACTH. Todos esses autores que observaram aumento sincrônico nas concentrações dos hormônios estudados enquanto que nos papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) do presente experimento houve uma grande variação do momento de ocorrência do pico de excreção

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

Outro fator que pode ter interferido na excreção fecal tanto de cortisol quanto de corticosterona, são as alterações ambientais durante os dias da colheita, ou seja, alteração da temperatura ambiental e do clima nos dias do experimento, como o discutido por Astheimer et al. (1994) quando relataram as diferenças de respostas para a contenção e administração de antagonista de glucocorticóides em diferentes épocas do ano. Apesar de serem próximos, nos dias de colheita das amostras fecais a temperatura variou de cinco à 18°C, em dois dias a temperatura ambiental aumentou gradativamente durante o período de colheita e nos demais permaneceu constante. Quanto a luminosidade, em um dia o tempo permaneceu chuvoso e nos demais, ensolarado.

Frigerio et al. (2004) verificaram relação negativa entre a temperatura na noite anterior e os níveis de metabólitos de corticóides fecais, sugerindo que os corticóides estão envolvidos no processo de termorregulação das aves. A

interferência devido a fatores estressantes no dia anterior a colheita, como por exemplo a baixa temperatura ambiente pode ser observadas pelo pico de excreção de metabólitos cortisol fecal na hora zero após administração de ACTH em um dos machos. Outra possível explicação para o pico de excreção inicial é devido à ineficiente separação entre fezes e urina, como sugere Thiel et al. (2005), que observaram elevados níveis de metabólitos de corticosterona na primeira hora em uma das fêmeas de galo-silvestre (*Tetrao urogallus*).

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

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

Os procedimentos de manejo durante a realização do estudo podem ter interferido nos resultados, assim como relatado por Queiroz (2006), pois, no dia do experimento, os papagaios foram capturados um a um, retirados de seu ambiente de permanência usual (viveiro coletivo), colocados em gaiolas individuais; depois foram novamente contidos para a realização das injeções intramusculares e mantidos isolados em gaiolas pequenas, dentro de um quarto e com a presença humana estranha constante. Este conjunto de procedimentos, que não estavam incorporados à rotina dos animais, pode ter desencadeado a liberação de ACTH endógeno e, conseqüentemente,

estimulado a secreção de hormônios pela adrenal e a subsequente elevação das concentrações fecais destes nos dois Grupos experimentais e promovido a liberação de picos de GC fecais de forma assíncrona. Deve-se ressaltar também que durante o experimento, um grupo de pessoas ligadas à empresa (local do experimento) foi visitar o local do experimento, tornando-se mais um fator interferente.

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

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

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

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

A técnica de Enzimoimunoensaio Direto para dosagem de metabólitos de cortisol presente nas fezes é acurada, precisa e confiável, sendo capaz de detectar aumento de concentrações dos metabólitos fecais de cortisol tanto em machos quanto de fêmeas de papagaios-verdadeiros.

A técnica de Radioimunoensaio para dosagem de metabólitos de corticosterona presente nas fezes é acurada, precisa e confiável, sendo capaz de detectar aumento de concentrações dos metabólitos fecais de corticosterona tanto em machos quanto de fêmeas de papagaios-verdadeiros.

Não foi possível caracterizar um padrão de excreção de metabólitos fecais de glucocorticóides a partir do protocolo de validação fisiológica empregado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

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.

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.

BERNARDES FILHO, R.; FRANCO, R.W.de A.; NOVAES, A.P.de; MAGNANI, F.S.; FELIPPE, P.A.N.; SANTOS, E.F. Sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual via tomografia por ressonância magnética nuclear. **Circ. Téc. - EMBRAPA**, n.11, p.1-12, set. 2000.

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.

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.

CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Listas das aves do Brasil**. Versão 16/8/2007. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 15 maio 2008.

*ASSOCIAÇÃO 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.

CERIT, H. E.; AVANUS, K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. **World's Poult. Sci. J.**, v. 63, p.91-100, 2007.

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.

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.

CITES. **Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.** Disponível em <<http://www.cites.org>>. Acesso em: 20 ago 2007.

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

COLLAR, N.J. Family Psittacidae (parrots). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. (Eds.). **Handbook of the birds of the world: sandgrouse to cuckoos.** Barcelona : Lynx Edicions, 1997. p.280-477.

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.153-168.

DIAS, E. A. **Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais**. 2003. 109f. Dissertação Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DICKSON, W.M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. (Eds.) **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. p.571-602.

DUARTE, J.M.B.; CAPARROZ, R. Cytotaxonomic analysis of Brazilian species of the genus *Amazona* (Psittacidae, Aves) and conformation of the genus *Salvatoria* (Ribeiro, 1920). **Braz. J. Genet.**, v.18, p.623-628, 1995.

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.

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.

GODOY, S.N. Psittaciformes (arara, papagaio e periquito). In: CUBAS, Z.; SILVA, J.C.R.; CATÃO- DIAS, J.L. (Eds.) **Tratado de animais selvagens - Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p.222-251.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2002. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolvet.pdf>. Acesso em: 15 out. 2007.

GOYMANN, W.; MÖLTL, E.; GWINNER, E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **Auk**, v.119, n.4, p.1167-1173, 2002.

GRAHAN, L.H.; BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biol.**, v.15, p.71-82, 1996.

GRAHAN, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biol.**, v.20, p.227-236, 2001.

GRIFFITHS, R.; DOUBLÉ, M.C.; ORR, K.; DAWSON, R.J.G. A DNA test to sex most birds. **Mol. Ecol.**, v.7, p.1071-1075, 1998.

HARPER, J.M.; AUSTAD, S.N. Fecal Glucocorticoids: A noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. **Physiol. Biochem. Zool.**, v.73, p.12-22, 2000.

HIEBERT, S.M.; RAMENOFKY, 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.

IBAMA/CEMAVE. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação das

Aves Silvestres. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/cemave>>. Acesso em: 19 dez. 2005.

IBAMA/MMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/Ministério do Meio Ambiente. **Lista animais ameaçados de extinção**. Brasília, 2006. Disponível em <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 25 nov. 2006.

IUCN – International Union for Conservation of Nature. **Executive Summary - Parrots**: status survey and conservation action plan. Switzerland, 2004. Disponível em <<http://www.iucn.org/themes/ssc/publications/parrots.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

IUCN – International Union for Conservation of Nature. **Red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 20 maio 2008.

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.

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.

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.

MCKENZIE, S.; DEANE, E.M. Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v.140, p.81-87, 2005.

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.

MIYAKI, C.Y.; DUARTE, J.M.B.; CAPARROZ, R.; NUNES, A.L.V.; WAJNTA, A. Sex Identification of South American Parrots (Psittacidae, Aves) Using the Human Minisatellite Probe 33.15. **Auk**, v.114, n.3, p.516-520, 1997.

MIYAKI, C.Y.; GRIFFITHS, R.; ORR, K.; NAHUM, L.A.; PEREIRA, S.L.; WAJNTAL, A. Sex Identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR: Perspectives for Wild and Captive Population Studies. **Zoo Biol.**, v.17, p.415–423, 1998.

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.; WASS, J.R. Validation of an enzyme immunoassay to measure fecal 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.; 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.

PEIXOTO, J.E.; TISCHER, M.C. Avaliação da reprodução de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) em Zoológicos brasileiros durante o período 1996/2001. In: CONGRESSO SOCIEDADE PAULISTA DE ZOOLOGICOS, 13., 2004, Leme. **Anais...** Leme: Sociedade Paulista de Zoológicos, 2004. Disponível em <<http://www.spzoo.org.br/0104.htm>>. Acesso em: 6 fev. 2007.

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.

QUEIROZ, L.G.P.B. **Sazonalidade da excreção de corticóides urofecais 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.

RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. Disponível em: <<http://www.rentas.org.br/pt/home/>>. Acesso em: 4 set. 2007.

ROCHA, G.T. **Aplicações da citogenética na preservação de animais silvestres**. 1993. 205f. Tese Doutorado. Faculdade Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1993.

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.; WINGFIELD, J.C. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in free-living pigeons. **J. Compar. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol.**, v.171, n.3, p.231-235, 2001.

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

RUSSELLO, M.A.; AMATO, G. A molecular phylogeny of *Amazona*: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.2, p.421-437, 2004.

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

SANTOS, L.P.; GUNSKI, R.J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. **Ararajuba: Ver. Bras. Ornitol.**, v.14, p.35-45, 2006.

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.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, London: Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland, 2007. v.41, p.52-74.

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

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.

VAN DONGEN, M.W.M.; DE BOËR, L.E.M. Chromosome studies of 8 species of parrots of the families Cacatuidae and Psittacidae (Aves: Psittaciformes). **Genetica**, v.65, p.109-117, 1984.

VYLITOVÁ, M.; MIKSÍK, I.; PÁCHA, J. Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.109, p.315-324, 1998.

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 babbons (*Papio cynocephalus*). **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.569-574, 1993

WASSER, S.K.; MONFORT, S.L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D.E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. **J. Reprod. Fertil.**, v.101, p.213-220, 1994.

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.

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

WILSON, C.M.; HOLBERTON, R.L. An alternative method for delivering adrenocorticotropin hormones in birds. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.122, p.349-353, 2001.

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.

WINGFIELD, J.C.; KITAYSKY, A. Endocrine responses to unpredictable environmental events: Stress or anti-stress hormones? **Integr. Comp. Biol.**, v.42, p.600-609, 2002.

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, 1985a.

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

ANEXOS

Anexo A-

Informações sobre as reatividades cruzadas do anticorpo policlonal Cortisol R4866 (C. Munro, Universidade da Califórnia, Davis, CA) do ensaio imunoenzimático e do Kit de dosagem hormonal DPC Medlab – Rat Corticosterona utilizados no presente estudo para dosagem de metabólito de cortisol e corticosterona fecal em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*).

Anticorpo anti-cortisol (Universidade da Califórnia)
100% com cortisol
9,9% com prednisolona
6,3% com prednisona
5,0% com cortisona
0,7% com corticosterona
< 0,5% com todos os outros metabólitos testados
Anticorpo anti-corticosterona (Coat-A-Count® Rat Corticosterone)
100% com corticosterona
1,58% com 11-deoxicorticosterona
0,42% com progesterona
0,18% com cortisol
0,15% com aldosterona
0,036% com testosterona
0,007% com 18-hidroxideoxi-corticosterona
0,031% com 17 α -hidroxi-progesterona
0,012% com DHEA

Anexo B-

Descrição da composição básica, eventuais substitutos, enriquecimento e níveis de garantia da ração extrusada para psitacíformes- Alcon®, utilizada para alimentar as aves durante a realização do experimento

Composição Básica do Produto: Fubá de milho (64,93 %), farelo de soja, óleo de soja refinado, ovo desidratado, leveduras, suplemento vitamínico mineral, prebiótico, corante alimentício, aromatizante natural, antioxidante BHT.

Eventuais Substitutivos: Farinha de trigo, creme de milho.

Enriquecimento por kg de Produto:

Vitamina A	9.500 UI
Vitamina D3	1.590 UI
Vitamina E	26,0 mg
Vitamina K3	2,6 mg
Vitamina B1	2,1 mg
Vitamina B2	7,9 mg
Vitamina B12	10,6 mcg
Vitamina B6	2,1 mg
Pantotenato de cálcio	15,9 mg
Niacina	37,0 mg
Colina	164,7 mg
Ácido fólico	0,7 mg
Biotina	105,6 mcg
Selênio	79,2 mcg
Manganês	21,1 mg
Ferro	26,0 mg
Cobre	2,8 mg
Iodo	0,5 mg
Zinco	26,0 mg
Vitamina C	79,2 mg
Mananoligossacarídeos	2,0 g

Níveis de Garantia:

Umidade (máx.)	8 %
Proteína bruta (mín.)	20 %
Extrato etéreo (mín.)	6 %
Matéria fibrosa (máx.)	3 %
Matéria mineral (máx.)	4 %
Cálcio (máx.)	0,8 %
Fósforo (mín.)	0,3 %

Anexo C-

Descrição da composição básica, eventuais substitutos, enriquecimento e níveis de garantia do Alimento para papagaios com frutas – Nutripássaros®, utilizado para alimentar as aves durante a realização do experimento

Composição Básica do Produto: Casca de aveia moída, farelo de algodão, farelo de arroz desengordurado, farelo de gérmen de milho, farelo de glúten de milho-60, farelo de mandioca, farinha de carne e osso, farinha de ossos calcinados, levedura seca de cana de açúcar, milho integral moído, óleo vegetal, grão de amendoim, grão de aveia, grão de milho, semente de girassol, aditivo aromatizante, caulim, cloreto de potássio (sal comum), farinha de rosca, premix vitamínico e mineral, maçã desidratada, uva passas.

Eventuais Substitutivos: Farelo de girassol com casca, farelo de milho, trigoilho, farelo de centeio.

Enriquecimento por kg de Produto:

Vitamina A	4000,0 UI/kg
Vitamina D3	800,0 UI/kg
Vitamina E	10,0 ml
Vitamina K3	1,0 ml
Vitamina B1	2,0 ml
Vitamina B2	3,0 ml
Vitamina B12	3,0 mcg
Niacina	20,0 ml
Colina	300,0 ml
Selênio	0,03 ml
Manganês	20,0 ml
Ferro	20,0 ml
Cobre	3,0 ml
Iodo	0,3 ml
Zinco	20,0 ml

Níveis de Garantia:

Umidade (máx.)	12 %
Proteína bruta (mín.)	13 %
Extrato etéreo (mín.)	6 %
Matéria fibrosa (máx.)	13 %
Matéria mineral (máx.)	7 %
Cálcio (máx.)	1,6 %
Fósforo (mín.)	0,2 %

Anexo D-

Valores médios (desvio padrão) da concentração e pico de excreção de metabólitos de cortisol fecal (ng/g) obtidos em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), sendo quatro machos e quatro fêmeas, a cada uma hora após a administração intramuscular de solução salina 0,9% de NaCl no Grupo Controle e ACTH diluído em solução salina no Grupo Tratamento durante 10 horas de coleta

Horário	Fêmea 2		Fêmea 4		Fêmea 6		Fêmea 8		Fêmea geral	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	-	12,98	-	21,69	-	-	-	-	-	17,34
1	67,42	-	-	-	42,65	10,55	13,15	-	41,07	10,55
2	12,49	58,71	11,15	118,63	27,73	40,38	41,64*	-	23,25	72,57
3	131,8	22,28	31,64	95,57	53,9	98,02*	16,37	-	58,43	71,96
4	-	-	17,9	45,93	-	43,77	19,44	131,71	18,67	73,80
5	2,15	-	28,37	-	-	-	11,06	-	13,86	-
6	-	-	18,87	30,99	-	22,77	1,69	-	10,28	26,88
7	-	8,97	31,64	54,1	19,12	-	6,85	76,41	19,20	46,49
8	-	-	-	-	13,44	43,77	9,84	91,35	11,64	67,56
9	-	-	83,59*	18,85	64,04	26,35	3,3	475,95	50,31	173,72
10	6,94	-	47,96	132,68	95,96	-	31,29	293,86	45,54	213,27*
x	44,16	25,74	33,89	64,81	45,26	40,80	15,46	213,86	29,23	77,41
DP	55,62	22,68	23,01	44,78	28,89	28,11	12,56	170,10	17,81	66,24
pico de excreção	155,40	71,09	79,92	154,36	103,04	97,02	40,59	554,06	64,85	209,89

(*) pico de excreção (-) ausência de produção fecal

Continua

Continuação Anexo D

Horário	Macho 1		Macho 3		Macho 5		Macho 7		Macho geral	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	-	23,76	-	-	-	-	-	155,69	-	89,73
1	32,64	-	-	-	74,77	68,86	26,28	-	44,57	68,86
2	-	-	-	30,02	40,64	-	-	100,36	40,64	65,19
3	12,23	10,48	16,89	-	140,88*	185,22	-	-	56,67	97,85
4	4,06	42,47*	-	-	37,44	157,13	17,33	32,7	19,61	77,43
5	20,48	-	-	65,1	26,61	-	-	44,19	23,55	54,65
6	33,23	17,26	-	-	46,07	54,70	10,44	88,43	29,92	53,46
7	28,43	4,77	13,88	18,73	39,87	49,90	15,94	-	24,53	24,47
8	14,63	15,21	25,91	73,45	23,32	53,16	34,72	51,68	24,60	48,38
9	30,42	24,8	12,91	46,86	57,49	15,11	14,41	114,85	28,81	50,41
10	40,83	9,51	26,46	-	89,70	40,59	14,03	106,58	42,76	52,23
X	24,11	18,53	19,21	46,83	57,68	78,08	19,02	86,81	33,57	62,06
DP	11,94	11,88	6,54	22,99	35,80	59,93	8,48	41,55	11,94	20,74
pico de excreção	47,98	42,29	32,28	92,82	129,29	197,95	35,98	169,91	57,44	103,54

(*) pico de excreção (-) ausência de produção fecal

Anexo E-

Valores médios (desvio padrão) da concentração e pico de excreção de metabólitos de cortisol fecal (ng/g) obtidos de dois papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), sendo um macho e uma fêmea em cada grupo, a cada uma hora após a administração intramuscular de solução salina 0,9% de NaCl no Grupo Controle e ACTH diluído em solução salina no Grupo Tratamento durante 10 horas de colheita

Hora	<u>Fêmea</u>		<u>Macho</u>		<u>Geral</u>	
	Controle	tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	-	-	-	-	-	-
1	13,16	-	74,77	68,86	43,97 (43,57)	39,71 (41,23)
2	41,64	-	40,64	-	41,14 (0,71)	-
3	16,38	-	140,88	185,22	78,63 (88,04)	-
4	19,44	131,72	37,44	157,13	28,44 (12,72)	144,42 (17,97)
5	11,07	-	26,61	-	18,84 (10,99)	-
6	1,70	-	46,07	54,70	23,89 (31,38)	27,35
7	6,85	76,42	39,87	49,90	23,36 (23,35)	63,16 (18,75)
8	9,85	91,35	23,32	53,16	16,58 (9,53)	72,25 (27,01)
9	3,31	475,95	57,49	15,11	30,40 (38,31)	245,53 (325,87)
10	31,29	293,86	89,70	40,59	60,50 (41,30)	167,22 (179,09)
x	15,47	213,86	57,68	78,08	36,57	108,52
DP	12,56	170,10	35,80	59,93	19,92	79,80
pico de excreção	34,31	469,01	111,39	167,98	66,45	228,22

(*) pico de excreção (-) ausência de amostra fecal

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*)

*Measurement metabolites of glucocorticoids and progesterone in Blue fronted parrot (*Amazona aestiva*) feces*

Caroline Junko Fujihara^{1*}; Wolff Camargo Marques Filho¹; Ana Livia Rocha Monteiro¹; Ian Martin¹; Rodrigo Bitencour¹; Eunice Oba²; Ricardo Garcia Pereira³; José Maurício Barbante Duarte⁴; João Carlos Pinheiro Ferreira²

1-Pós-graduandos - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP-Botucatu. Departamento de Reprodução Animal - FMVZ – UNESP. Distrito e Rubião Junior, s/n Botucatu-SP-Brasil/ CEP:18618-000. fone (14)38116326

2- Docente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP-Botucatu

3- Pós-graduando- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária UNESP-Jaboticabal

4- Docente - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária UNESP-Jaboticabal

RESUMO

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*). Embora não tenha sido observada uma padronização nos picos de excreção fecal, nos animais analisados, houve duas concentrações de picos de excreção, uma entre duas e quatro horas e outra entre oito e dez horas. Não foram detectados efeitos de Grupos (Tratamento x Controle), momento (horas de coleta) ou sexo (macho x fêmea) nos resultados observados nos níveis de cortisol, exceto quando comparados fêmeas e machos de grupos distintos, porém deve-se considerar o estresse de manejo empregado nesses animais.

Palavras-chave: Cortisol; corticosterona, progesterona; aves; não-invasivo.

SUMARY

Adrenal stimulation was showed by increase metabolic levels of cortisol, corticosterone and progesterone in feces after ACTH administration (25UI/animal). In spite of didn't have standards in picks of excretion, this study show concentration of picks in 2-4 hour and 8-10h for hormones metabolites. For cortisol measure, there aren't significantly differences between Control Group and Treatment Group, moments and sex, but there are significantly differences between female and male in different groups, so we need to take count interferences during collect samples and hormonal assay.

Keywords: Cortisol; corticosterone, progesterone, birds; noninvasive.

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, sendo que no Brasil há cerca de 1.700 espécies descritas, sendo 170 endêmicas.

A ordem Psittaciforme está entre as mais ameaçadas deste grupo; das 332 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 (*Lorius*, *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

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

76

77 MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

99 O procedimento foi repetido após intervalo de 7 dias, de modo que, os animais
100 que inicialmente foram alocados no Grupo Controle passaram a fazer parte do Grupo
101 Tratamento e, os inicialmente alocados no Grupo Tratamentos, passaram a fazer parte
102 do Grupo Controle.

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

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

111 Todos os animais receberam ração extrusada para psitacídeos (Alcon®),
112 alimento para papagaio com frutas (Nutripássaros®), sementes e frutas frescas (girassol,
113 banana, abacaxi, pêra, kiwi, goiaba, maçã, laranja, caqui, maracujá doce e mamão),
114 sendo a água disponível à vontade. A temperatura média nos dias de colheita foi entre
115 05 a 18°C, sendo chuvoso apenas na 1ª coleta e os demais foram ensolarados.

116 Foram coletadas amostras individuais de fezes logo após a administração da
117 solução correspondente (ACTH para o grupo tratamento e solução salina para o grupo
118 controle), e a cada 30 minutos, sendo as amostras agrupadas a cada 01 hora, perfazendo
119 10 horas de coletas. O forro de papel era trocado após cada coleta para evitar possíveis
120 contaminações das amostras. Todas as amostras permaneceram resfriadas por até 10
121 horas, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável (5°C).

122 Todas as amostras foram acondicionadas em criotubos, submetidas à
123 liofilização, realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de
124 Botucatu, UNESP-Campus Botucatu, segundo protocolo do departamento. Os tubos
125 contendo as amostras foram protegidas com folha de papel alumínio perfurado para
126 evitar possível sucção da amostra pelo liofilizador, os mesmos foram dispostos em *rack*
127 de papelão, mantidas em freezer a -70°C e levados à liofilizadora (Edward do Brasil) à -
128 45°C e pressão de 60 mbar por 12 horas. As amostras foram retiradas do aparelho,
129 tampadas e mantidas em freezer à -20°C até a extração e dosagem hormonal.

130 A extração foi realizada no Laboratório de Dosagem Hormonal do
131 Departamento de Zootecnia da UNESP-Jaboticabal. Para a extração hormonal das
132 amostras fecais foi empregada a metodologia descrita por Grahnan et al. (2001)
133 modificada. Amostras de 0,05 g ($\pm 0,002$) de fezes liofilizadas foram diluídas em 1 ml
134 de metanol 80%, levadas ao agitador (vórtex) em velocidade máxima para a primeira
135 homogeneização, lembrando de manter o mínimo de amostra aderido à parede e
136 mantidos em agitador Kline® por 12 horas (*overnight*). O extrato foi centrifugado a 500

137 xg por 20 minutos, o sobrenadante recuperado em tubos de vidro com tampa e mantido
138 em freezer à -20°C até a dosagem.

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

146 Na Técnica de Enzimoimunoensaio foram utilizadas placas de poliestireno
147 contendo 96 poços, as placas foram incubadas com 50 µl de anticorpo policlonal
148 (cortisol R4866- C. Munro, Universidade da Califórnia, Davis, CA) acrescido de 5 ml
149 de solução coating *buffer* e mantidas em geladeira por 12 horas. Após esse período, as
150 placas foram lavadas com solução de lavagem e 50 µl das amostras foram adicionadas
151 em cada célula, assim como o padrão e os controles, sempre em duplicata, mantidas em
152 incubação sem agitação por 01 hora. As placas foram novamente lavadas e adicionadas
153 10 µl de solução ABTS (40 µl 0,5 M H₂O₂ + 125 µl 40 mM ABST + 12,5 µl solução
154 tampão), mantidas em incubação com agitação por até 60 minutos ou até que a amostra
155 contendo o padrão “zero” atingisse valores de leitura de densidade óptica entre 0,9 a
156 1,0. A leitura foi realizada pelo aparelho de contagem Revelation Dynex®.

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

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

167 A análise estatística dos dados de cortisol foi realizada pelo pacote estatístico
168 Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Os animais foram considerados
169 repetições e os protocolos experimentais tratamentos. Para a comparação das variáveis
170 estudadas entre os tratamentos e o controle foi utilizado o *Procedimento General Linear*

171 *Model* (PROC GLM), com o teste de Student-Newman-Keuls (SNK), avaliando
172 também o efeito do sexo e dos diferentes horários sobre as concentrações hormonais. As
173 possíveis correlações existentes entre as variáveis estudadas foram verificadas através
174 do *Proc Corr.* Para todas as avaliações utilizou-se o nível de significância de 95%
175 ($p < 0,05$)

176

177 **RESULTADOS**

178 Os valores médios e os desvios padrão para a dosagem de metabolitos de cortisol
179 em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas
180 após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos
181 Grupos Controle e Tratamento, estão representados nas Figuras 03 (todos os animais),
182 04 (machos) e 05 (fêmeas).

183 Empregando-se o conceito de que o pico de excreção de metabólitos fecais
184 caracteriza-se quando o valor médio obtido em um dado momento for maior que a
185 média adicionada de 1,5 vezes o desvio padrão observados quando são considerados
186 todos os valores encontrados, foram identificados os seguintes picos: três horas após a
187 administração da solução salina nas fêmeas e nos machos do Grupo Controle e dez e
188 três horas após a administração de ACTH, respectivamente, nas fêmeas e machos do
189 Grupo Tratamento. Considerando-se todos os animais, foram determinados os seguintes
190 picos: três horas após a administração da solução salina e dez horas após a
191 administração de ACTH.

192 Através do teste de Student-Newman-Keuls, não foram detectados efeitos de
193 grupo, momento ou sexo nos resultados observado, exceto entre as fêmeas do Grupo
194 Controle e os machos do Grupo Tratamento na hora cinco e entre os machos do Grupo
195 Controle e as fêmeas do Grupo Tratamento na hora dez.

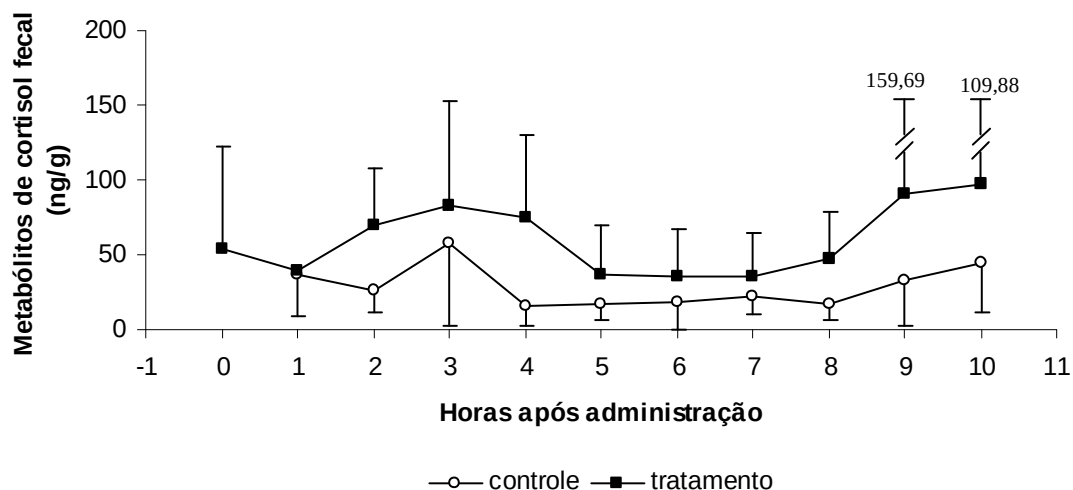


Figura 03- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=8) e Tratamento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

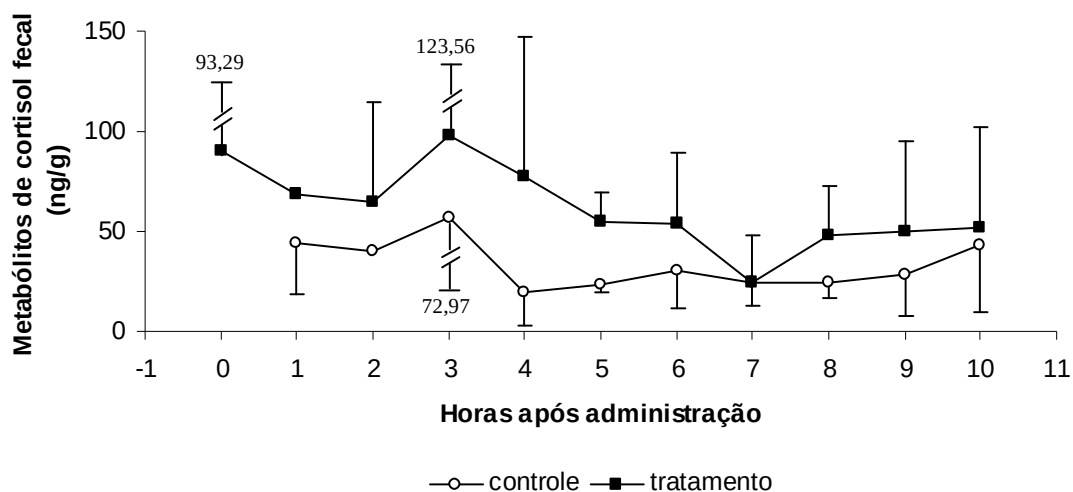


Figura 04- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=4) e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

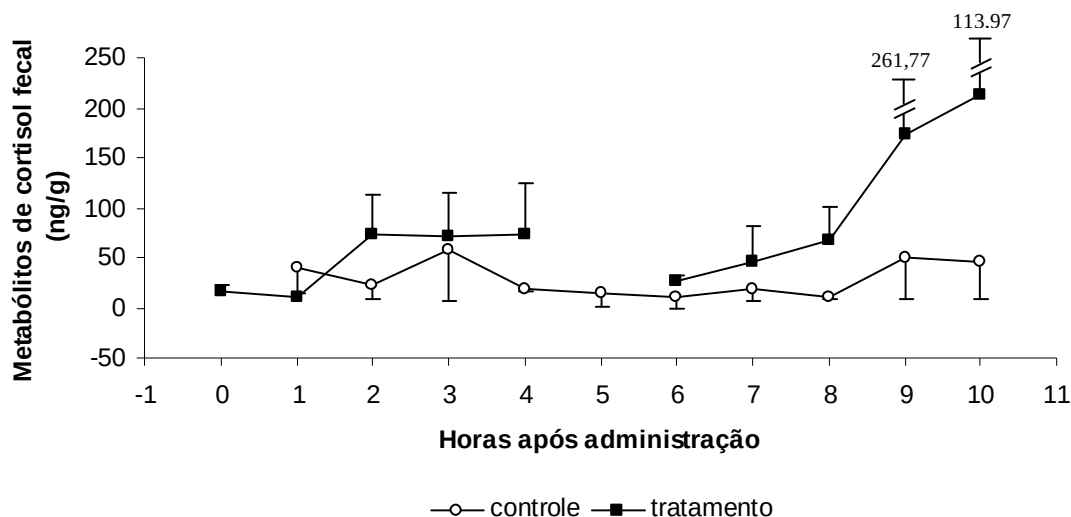
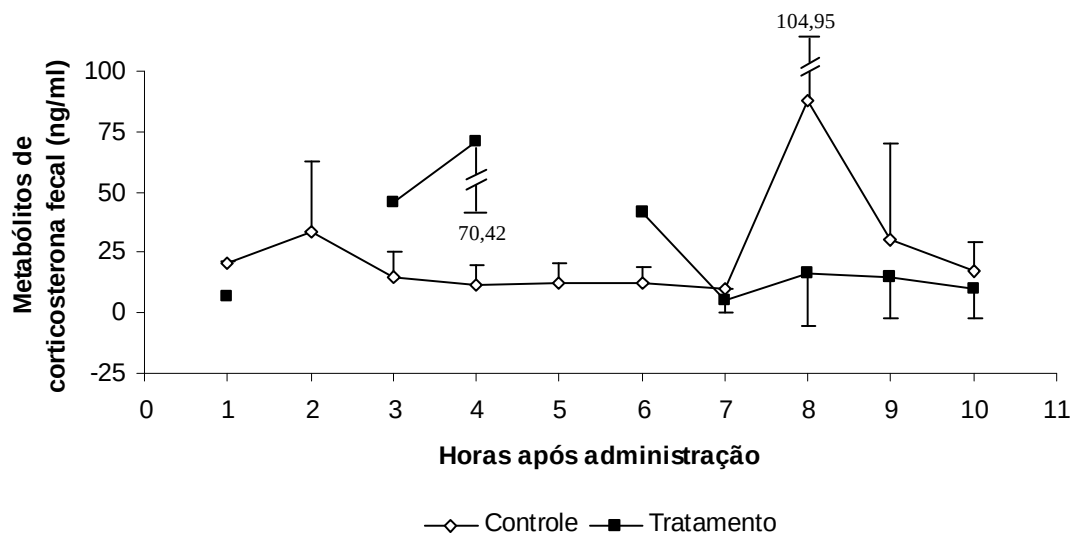


Figura 05 – Valores médio e desvios padrão para a dosagem por EIA de metabólitos de cortisol (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) fêmeas obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle ($\circ$ n=4) e Tratamento ($\blacksquare$ 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 Grupos Controle e Tratamento, estão representados nas Figuras 06 (macho e fêmea), 07 (macho) e 08 (fêmea).

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 todos os dois animais, foram determinados os seguintes picos: oito horas após a administração da solução salina e quatro horas após a administração de ACTH.



227

228

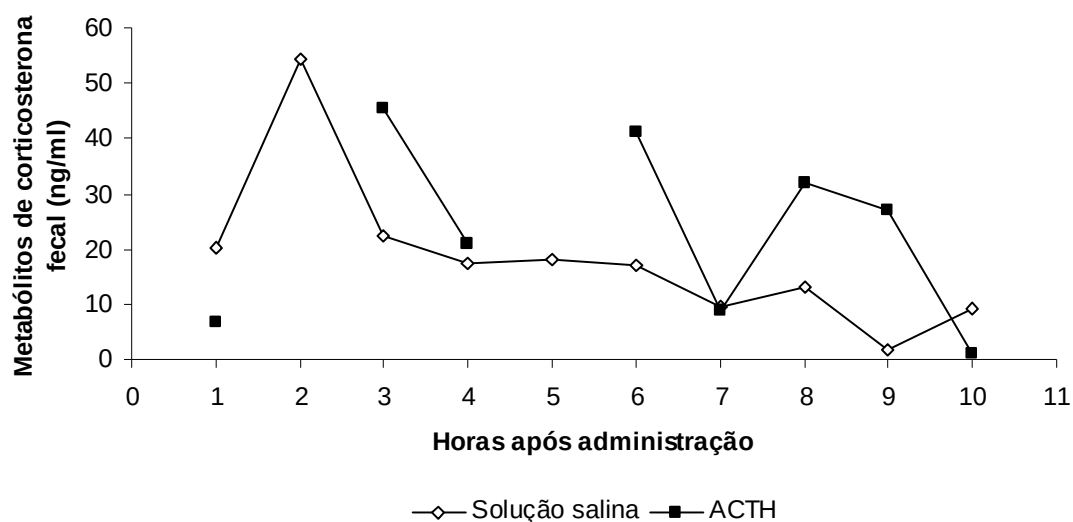
229

230

231

232

Figura 06 – Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) 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=2) e Tratamento (■ n=2)



233

234

235

236

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

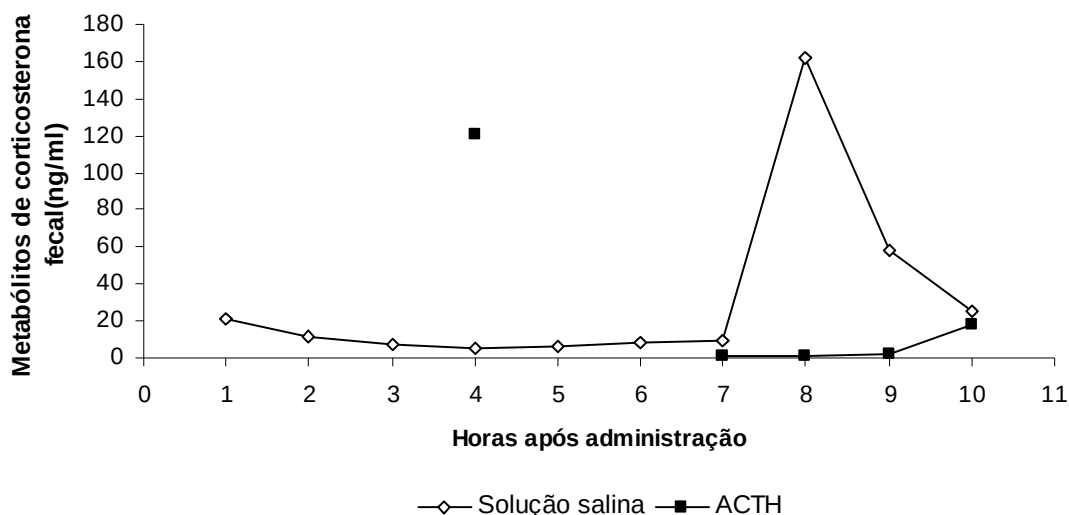


Figura 08 – Valores para a dosagem por RIA de metabólitos de corticosterona (ng/ml) em amostras fecais de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) fêmea obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina (○) ou ACTH (■)

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 Grupos Controle e Tratamento, estão representados nas Figuras 09 (macho e fêmea), 10 (macho) e 11 (fêmea).

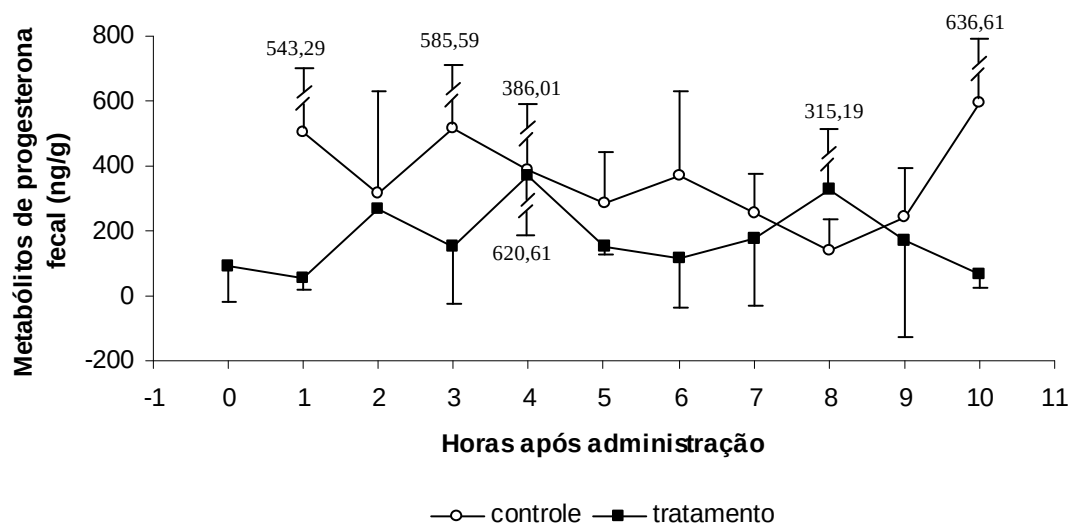


Figura 09- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de progesterona (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=8) e Tratamento (■ n=8)

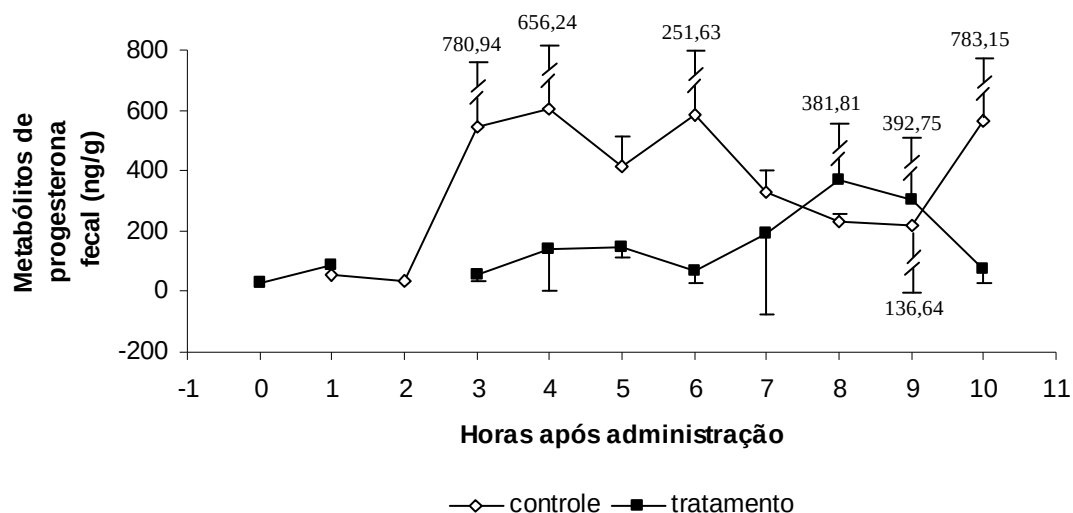


Figura 10- Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de progesterona (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) machos obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=4)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

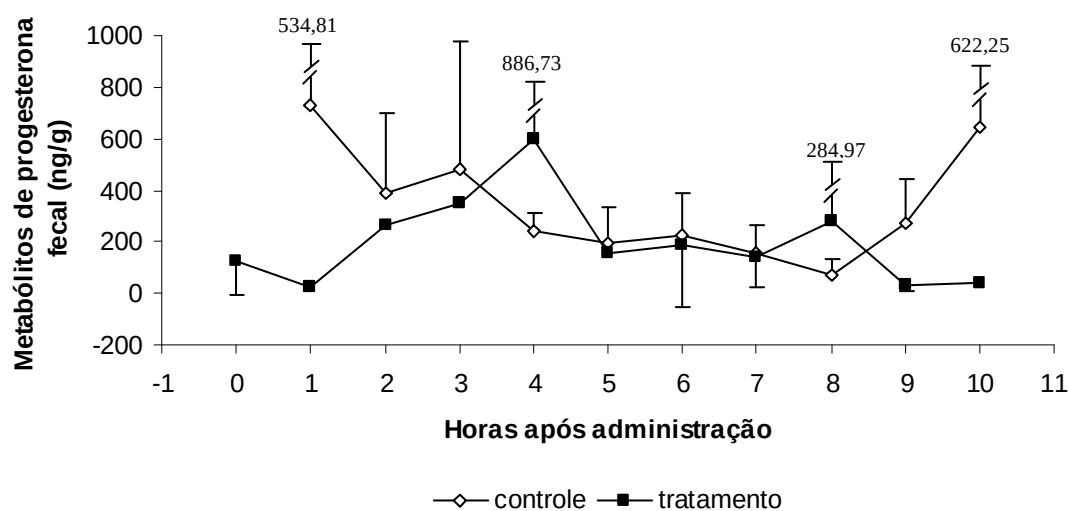


Figura 11 – Valores médios e desvios padrão para a dosagem por RIA de metabólitos de progesterona (ng/g) em amostras fecais de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) fêmeas obtidas durante 10 horas após a administração de solução salina e ACTH, respectivamente, nos animais dos Grupos Controle (○ n=4) 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

272 probabilidade de ocorrência de traumas no momento da contenção, no caso de animais
273 de porte muito pequeno, o volume de sangue possível de ser colhido pode insuficiente e
274 as vias de acesso para a sua colheita restrita.

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

282 No presente experimento, os valores médios da concentração fecal de
283 metabólitos de GCs e Progesterona elevaram-se tanto em machos quanto em fêmeas
284 após contenção e desafio com ACTH/solução salina, sendo os valores nos machos tão
285 elevados quanto nas fêmeas. Apesar de não ser possível relacionar esse comportamento
286 apenas com a contenção e administração de ACTH, não se pode excluir a influência do
287 eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos resultados, pois foram observados níveis elevados
288 em ambos os grupos.

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

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

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

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

316 Zenoble et al. (1985a e 1985b), estudando águias (*Haliaeetus leucephalus*),
317 condores (*Vultur gryphus*) e psitacídeos (*Amazona autumnalis*, *A. eestiva* e *Psittacus*
318 *erithacus*), também não observaram elevação do cortisol plasmático após a
319 administração injetável de ACTH. Entretanto, esses autores monitorizaram os animais
320 por apenas 90 minutos após a injeção. No nosso estudo os picos de excreção de
321 metabólitos de cortisol fecal nos animais desafiados com ACTH ocorreram sempre após
322 o de excreção de corticosterona, o que sugere que o cortisol, pode se elevar mais
323 tardiamente após o desafio com ACTH.

324 Outra possibilidade para detecção fecal de cortisol pode estar relacionada com o
325 fato de ter sido empregado, no presente estudo, anticorpo policlonal (anticorpo contra
326 cortisol R4866) para a dosagem pela técnica de EIA. Portanto, em vez de cortisol, é
327 possível que o que foi detectado nas fezes tenham sido metabólitos de corticosterona ou
328 de outro glicocorticóide.

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 Grupo Controle e os machos do Grupo Tratamento na hora
334 cinco e entre os machos do Grupo Controle e as fêmeas do Grupo Tratamento na hora
335 dez, evidencia que não houve um padrão regular na resposta de excreção fecal de
336 cortisol, e os animais, individualmente, apresentaram perfis particulares em relação ao
337 momento de excreção máxima ou mínima a partir do momento da contenção e
338 administração da solução salina ou ACTH.

339 Apesar da ausência de efeitos significativos, a observação de picos de excreção
340 fecal de metabólitos de cortisol às três horas entre os machos e fêmeas do Grupo
341 Controle, e às três e dez horas, respectivamente, para os machos e fêmeas no Grupo
342 Tratamento, demonstra que aconteceram importantes variações nos valores excretados,
343 sugerindo que um aumento do número de animais em estudos dessa natureza pode levar
344 a descoberta de padrões mais regulares de elevação fecal desses 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 psitacíformes
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 glucocorticóides
352 após quatro horas em galinhas (*Gallus domesticus*), corvo (*Phalacrocorax carbo*) e açor
353 (*Accipiter gentilis*) e variação individual nos picos de excreção em tetraz-grande (*Tetrao*
354 *uogallus*).

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 (*Zootrichia leucophrys*
361 *orianta*), e Goymann et al. (2002) e Nakagawa et al. (2003), que realizaram dosagens
362 fecais de corticosterona, respectivamente, em tordo-europeu (*Saxicola torquata*
363 *rubicola*) e pingüim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*), após desafio com ACTH. Todos
364 esses autores que observaram aumento sincrônico nas concentrações dos hormônios
365 estudados enquanto que nos papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) do presente
366 experimento houve uma grande variação do momento de ocorrência do pico de excreção

367 A primeira possibilidade para explicar a não validação fisiológica é a ausência
368 de amostras fecais em todos os momentos programados de colheita, que pode ter sido
369 uma consequência da não ingestão contínua de alimentos devido à falta de adaptação
370 das aves ao manejo contínuo e à presença do ser humano junto à elas o dia todo. Essa
371 ocorrência é relatada por Goymann et al. (2002), que também não obtiveram amostras
372 fecais em animais que interromperam a alimentação durante o período experimental e

373 atribuíram o fenômeno ao estresse relacionado ao manejo constante dos animais.
374 Contudo, a probabilidade de que as amostras perdidas apresentassem valores capazes de
375 uniformizar os resultados é muito pequena e, portanto, diminuem a possibilidade desta
376 explicação ser plausível.

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

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

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

403 Outra possibilidade para a ocorrência desses picos não sincrônicos foi devido às
404 diferenças individuais de morfologia, taxa de passagem do alimento no trato
405 gastrointestinal e taxa de metabolismo hormonal (WASSER et al., 2002), ou também
406 devido às diferentes histórias de vida das aves, refletindo as condições fisiológicas que

os animais se encontravam antes do experimento (WINGFIELD & KITAYSKY, 2002). Está possibilidade no nosso estudo é bastante plausível, visto que as aves eram provenientes de apreensão pelo IBAMA e constituíam lote heterogêneo quanto à idade, escore corporal, *status* reprodutivo, histórico de cativeiro e tempo de chegada ao Centro de Reabilitação.

Os procedimentos de manejo durante a realização do estudo podem ter interferido nos resultados, assim como relatado por Queiroz (2006), pois, no dia do experimento, os papagaios foram capturados um a um, retirados de seu ambiente de permanência usual (viveiro coletivo), colocados em gaiolas individuais; depois foram novamente contidos para a realização das injeções intramusculares e mantidos isolados em gaiolas pequenas, dentro de um quarto e com a presença humana estranha constante. Este conjunto de procedimentos, que não estavam incorporados à rotina dos animais, pode ter desencadeado a liberação de ACTH endógeno e, conseqüentemente, estimulado a secreção de hormônios pela adrenal e a subsequente elevação das concentrações fecais destes nos dois Grupos experimentais e promovido a liberação de picos de GC e progesterona fecais de forma assincrônica. Deve-se ressaltar também que durante o experimento, um grupo de pessoas ligadas à empresa (local do experimento) foi visitar o local do experimento, tornando-se mais um fator interferente.

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

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

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos sob as condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que as técnicas de enzimoimunoensaio direto para dosagem de metabólitos de cortisol e radioimunoensaio para dosagem de metabólitos de corticosterona e progesterona presente nas fezes são capazes de detectar aumento de

441 concentrações dos metabólitos fecais tanto em machos quanto de fêmeas de papagaios-
 442 verdadeiros, apesar de não ter sido possível caracterizar um padrão de excreção de
 443 metabólitos fecais de glucocorticóides e progesterona a partir do protocolo de validação
 444 fisiológica empregado.

445

446 **REFERÊNCIAS**

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

450 BLUHM, C.K.; PHILLIPS, R.E.; BURKE, W.H. Serum levels of luteinizing hormone,
 451 prolactin, estradiol and progesterone in laying and nonlaying mallards (*Anas*
 452 *platyrhynchos*). **Biol. Reprod.**, v. 28, n.2, p.295-305, 1983.

453 BOONSTRA, R. Coping with changing northern environments: the role of the stress
 454 axis in birds and mammals. **Integr. Comp. Biol.**, v.44, p.95–108, 2004.

455 CHINNADURAI, S.K. **Evaluation of fecal glucocorticóides metabolite assays for**
 456 **short-term stressors and validation for stress monitoring in African herbivores.**
 457 2006. 59f. Dissertação Mestrado. Universidade de Missouri, Columbia, 2006.

458 COCKREM, J.F. Conservation and behavioral neuroendocrinology. **Horm. Behav.**,
 459 v.48, p.492-501, 2005.

460 DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; JEWGENOW, K.; KRAUSE, M.;
 461 GROSSMANN, R. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid
 462 metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax*
 463 *carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.131(3),
 464 p.345-52, maio 2003.

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

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

471 FUJIHARA, C.J. **Validação de método não-invasivo para análise de hormônios**
 472 **ligados as estresse em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).** 2008. 112 f.
 473 Dissertação Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
 474 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, cap.1, p.17-26. Disponível em: <<http://ns.rc.unesp.br/ib/ecologia/fenologia/Papers/psitacideos.pdf>> Acesso em: 05 dez. 2005.
- GOYMANN, W.; MÖLTL, E.; GWINNER, E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **Auk**, v. 119, n. 4, p. 1167-1173, 2002.
- GRAHAN, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biol.**, v.20, p.227-236, 2001.
- IUCN – International Union for Conservation of Nature. **Executive Summary - Parrots**: status survey and conservation action plan. Switzerland, 2004. Disponível em <<http://www.iucn.org/themes/ssc/publications/parrots.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2008.
- 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.V.; TELL, L.; LASLEY, B. A comparison of sex steroid hormones excretion and metabolism by psittacine species. **Zoo Biol.**, v.18, p. 247-260, 1999.
- 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.
- NAKAGAWA, S.; MÖSTL, E.; WASS, J.R. Validation of an enzyme immunoassay to measure fecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): a non-invasive tool for estimating stress? **Polar Biol.**, v.26, p.491-493, 2003.
- QUEIROZ, L.G.P.B. **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.

- 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.
- SICK, H. **Ornitologia brasileira**: uma introdução. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 2001. 912p.
- 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.
- WAGNER, W.C.; STROHBEHN, R.E.; HARRIS, P.A. ACTH, corticoids and luteal function in heifers. **J. Anim. Sci.**, v.35, n. 4, p.281-288, 1972.
- 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.
- 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.
- WINGFIELD, J.C.; KITAYSKY, A. Endocrine responses to unpredictable environmental events: Stress or anti-stress hormones? **Integr. Comp. Biol.**, v.42, p.600-609, 2002.
- YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. **J. Reprod. Dev.**, v.51, n.1, p.99-107, 2005.
- 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, 1985a.
- ZENOBLE, R.S.; KEMPPAINEN, R.J.; YOUNG, D.W.; CARPENTER, J.W. Effect of ACTH on plasma corticosterone and cortisol in eagle and condors. . **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 187, n. 1, p.1119-1120, 1985b.

542 **AGRADECIMENTOS**

543 Departamento de Genética-IBB-UNESP-Botucatu, em especial, aos Profs.
544 Guaracy Tadeu Rocha e Adriane Pinto Wasko, pela sexagem das aves; ao Projeto
545 Centrofauna por fornecer as aves e o local para estudo; ao Departamento de Patologia
546 da FMB, em especial ao Claudinei pela liofilização das amostras; ao Departamento de
547 Reprodução Animal e Reprodução de Animais Selvagens da Faculdade de Medicina
548 Veterinária e Zootecnia – USP, em especial ao Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz
549 Guimarães pelas sugestões. À FUNDUNESP pelo auxílio financeiro e à CAPES pela
550 bolsa de estudo.