

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DETERMINAÇÃO DO CICLO REPRODUTIVO DE PAPAGAIO-DE-PEITO-
ROXO *AMAZONA VINACEA* (KUHLMANN, 1820) (AVES: PSITTACIDAE) POR MEIO
DE MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS HORMONAIS FECAIS**

PORTO ALEGRE

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETERMINAÇÃO DO CICLO REPRODUTIVO DE PAPAGAIO-DE-PEITO-
ROXO *AMAZONA VINACEA* (KUHL, 1820) (AVES: PSITTACIDAE) POR MEIO
DE MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS HORMONAIS UTILIZANDO UM
MÉTODO NÃO INVASIVO**

Autor: Gisele Guiomara Stein

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Animal.**

**Orientador: Prof. Dr. Félix Hilário Díaz González
Co-orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti
Duarte (UNESP, Jaboticabal)**

PORTO ALEGRE

2014

Gisele Guiomara Stein

Determinação do ciclo reprodutivo de papagaio-de-peito-roxo *Amazona vinacea* (KUHL, 1820) (aves: psittacidae) por meio de mensuração de metabólitos hormonais utilizando um método não invasivo.

Aprovada em 21 março 2014.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix Hilário Díaz González
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Mariangela da Costa Allgayer
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estêvão Farias Cruz
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Antunes Dias
Membro da Comissão

CIP - Catalogação na Publicação

Stein, Gisele Guiomara

DETERMINAÇÃO DO CICLO REPRODUTIVO DE PAPAGAIO-DE-
PEITO-ROXO AMAZONA VINACEA (KUHL, 1820) (AVES:
PSITTACIDAE) POR MEIO DE MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS
HORMONAIS FECAIS / Gisele Guiomara Stein. -- 2014.
67 f.

Orientador: Félix Hilário Díaz González.

Coorientador: José Maurício Barbanti Duarte.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2014.

1. endocrinologia. 2. monitoramento não-invasivo.
3. amazona vinacea. 4. psitacideo. 5. papagaio. I.
González, Félix Hilário Díaz, orient. II. Duarte,
José Maurício Barbanti, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Resumo

Durante as últimas duas décadas, as técnicas de análise de esteroides fecais têm sido utilizadas para pesquisa em endocrinologia reprodutiva em diversas espécies animais silvestres de vida livre, ou cativo. O presente estudo propõe a validação da técnica do ensaio imunoenzimático antiprogestinas CL425 e antiandrógenos R156/7 fecais em papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*). Objetiva-se descrever os perfis endócrinos anuais dos esteroides sexuais urofecais em *Amazona vinacea* com potencial aplicação para o aprimoramento do manejo reprodutivo da espécie. Foram utilizados 10 casais adultos da espécie *Amazona vinacea* mantidos em viveiros suspensos, em Lomba Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. As excretas foram coletadas duas vezes por semana, entre maio de 2012 e maio de 2013. O monitoramento da atividade gonadal foi feito por mensuração de metabólitos de andrógenos nas excretas dos machos e progestágenos, nas de fêmeas. Foram coletadas amostras frescas de excretas, consistentemente, entre 12h00min e 16h00min e mantidas congeladas até o processamento. O perfil anual de andrógenos nas excretas de machos de *A. vinacea* apresentou médias mensais variáveis de 25,9 ng/g, em janeiro até 125,7 ng/g, em setembro. O perfil anual de progestinas nas excretas de fêmeas *A. vinacea*, as médias mensais variaram de 2,76 ng/g, em dezembro até 45,7 ng/g, em setembro. Os perfis reprodutivos apresentaram variação na atividade hormonal, durante a fase reprodutiva. Porém, comparando-se casais reprodutores com não-reprodutores, observa-se que os níveis de progestágenos não diferiram significativamente entre fêmeas que fizeram postura e aquelas que não fizeram. Entretanto, os níveis de andrógenos diferiram significativamente entre reprodutores e não-reprodutores. Diferenças hormonais foram observadas nas diferentes estações anuais, tanto nos machos, quanto nas fêmeas. Dados meteorológicos de temperatura e insolação demonstraram correlação negativa com os perfis anuais de progestágenos. A utilização da metodologia aqui mencionada demonstrou aplicabilidade, praticidade e segurança como ferramenta para o estudo da fisiologia e do manejo reprodutivos de *Amazona vinacea*.

Palavras-chave: endocrinologia, monitoramento não-invasivo, psitacídeos.

Abstract

During the last two decades, the techniques of analysis of fecal steroids have been applied for studying reproductive profiles in many species of captive wild and free living wild animals. The advantages of this methodology are widely understood. This study aimed to validate the anti- CL425 progestin and anti-R156/7 androgen enzyme immunoassay in fecal samples from parrot-breasted-purple (*Amazon vinacea*). This communication describes the annual endocrine profiles of urofecal sex steroids in *Amazona vinacea* with potential application for improving the species reproductive management. In total, 10 adult *A. vinacea* pairs kept in suspended aviaries in southern Brazil were studied. Excreta samples were collected twice weekly between May 2012 and May 2013. Gonadal activity was monitored by measurement of androgen and progestin metabolites in excreta of birds. Fresh excreta samples were collected always between 12:00 and 16:00 hs, and kept frozen until processing. The samples were dried at 57°C, hormones crushed and extracted using 80% methanol. The hormone dosage was performed at the Laboratory of Endocrinology, NUPECCE (Center for Research and Conservation of Deer, Jaboticabal, SP) using enzyme immunoassay with antibody to androgen and progestin. Feces from 5 *A. vinacea* pairs were used in two distinct periods for assay validation, within and outside the breeding season. Tests included Parallelism, Dose-Response, and Physiological Validation. It was concluded that the enzyme immunoassay for determining progestin and androgen profiles in urofecal samples from *A. vinacea* is accurate, precise and reliable. The annual profile of androgen in excreta of *A. vinacea* resulted the following monthly averages: January 25.9 ± 3.7 ng/g (n = 90); February 28.7 ± 3.2 ng/g (n = 60); March 31.7 ± 17.7 ng/g (n = 80); April 27.9 ± 5.5 ng/g (n = 90); May 43.3 ± 7.9 ng/g (n = 90); June 49.1 ± 15.9 ng/g (n = 80); July 36.5 ± 7.5 ng/g (n = 90); August 86.9 ± 46.2 ng/g (n = 90); September 42.1 ± 125.7 ng/g (n = 80); October 110.3 ± 63.2 ng/g (n = 90); November 74.2 ± 57.7 ng/g (n = 90) and December 43.3 ± 13.4 ng/g (n = 80). The monthly averages in the annual profile of progestin in excreta of *A. vinacea* were as follows: January 7.2 ± 0.9 ng/g (n = 90); February 9.26 ± 1.3 ng/g (n = 60); March 15.8 ± 2.9 ng/g (n = 80); April 14.15 ± 1.85 ng/g (n = 90); May 16.05 ± 3.16 ng/g (n = 90); June 11.85 ± 2.54 ng/g (n = 80); July 11.89 ± 2.17 ng/g (n = 90); August 13.52 ± 3.48 ng/g (n = 90); September 55 ± 45.7 ng/g (n = 80); October 15.44 ± 24.91 ng/g (n = 90); November 4.27 ± 6.42 ng/g (n = 90) and December 2.76 ± 0.42 ng/g (n = 90).

= 80). Reproductive profiles showed variation in hormonal activity during the reproductive phase. When comparing breeding to non-breeding pairs, it was observed that the progestin levels did not differ significantly between laying and not-laying birds. However, the androgen levels differed significantly between breeding and non-breeding birds. In addition, hormonal differences were observed in both male and female birds in accordance with different annual seasons. Meteorological temperature and insolation data showed a negative correlation with the annual progestin profiles. Measurement of androgen and progestin metabolites in *A. vinacea* feces proved to be a practical and safe tool for studying reproductive physiology and management of the species.

Key-words: endocrinology, noninvasive monitoring, psittacines

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	9
1	9
Introdução.....	
....	
1.1 Papagaio-do-peito-roxo.....	9
1.2 Reprodução nas aves.....	1 2
1.2.1 Sistema neuroendócrino reprodutivo em aves.....	1 4
1.2.2 Ciclo reprodutivo das aves.....	1 6
1.3	1
Objetivos.....	8
.	
1.3.1 Materiais e métodos.....	1 8
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1 – VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENSIMÁTICO PARA HORMONIOS ESTEROIDES FECAIS EM PAPAGAIO-DE-PEITO-ROXO - AMAZONA VINACEA (KUHL, 1820) (AVES: PSITTACIDAE).....	2 0
Introdução.....	2
.....	1
Material e métodos.....	2 2
Resultados.....	2
	8

.....	4
Discussão.....	2
.....	9
Referências	3
Bibliográficas.....	1
CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2 - PERFIL ANUAL DE PROGESTÁGENOS E	
ANDRÓGENOS UROFECALIS DE PAPAGAIO-DO-PEITO-ROXO (AMAZONA	
VINACEA) POR MEIO DE MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS HORMONAIS	
UTILIZANDO UM MÉTODO NÃO	
INVASIVO.....	3
	5
Introdução.....	3
.....	7
Material e	3
métodos.....	8
Resultados.....	4
.....	9
Conclusão.....	5
.....	1
Referências	5
bibliográficas.....	2
CAPÍTULO 4 –	
CONCLUSÃO.....	4
REFERÊNCIAS.....	5
.....	5

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Introdução

A cada ano que se passa, a conservação das espécies ameaçadas de extinção acaba sendo tema inevitável e de grande relevância para a medicina veterinária.

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a exploração desordenada tem levado a fauna brasileira a um processo intenso de extinção de espécies, seja pelo avanço da fronteira agrícola, seja pela caça esportiva, de subsistência ou com fins econômicos - como a venda de peles e animais vivos. Este processo vem crescendo nas últimas duas décadas, à medida que a população cresce e os índices de pobreza aumentam.

A fragmentação, exploração e poluição dos habitat naturais têm resultado em perdas catastróficas de variabilidade genética, causadas pela diminuição significativa de determinadas populações de animais silvestres (WILDT et al., 1992).

1.1 Papagaio-do-peito-roxo, *Amazona vinacea* (KUHL, 1820)

A família Psittacidae é constituída por 339 espécies de aves em todo o mundo (AUSTIN, 1971). Somente na América do Sul existem mais de 100 espécies, sendo que 72 são encontradas no Brasil (SICK, 1997). O gênero *Amazona* inclui onze espécies de papagaios que ocorrem no Brasil, sendo que quatro estão em estado vulnerável ou ameaçados de extinção, entre eles o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) (MMA, 2003; IUCN, 2010). O Papagaio-de-peito-roxo vive em florestas subtropicais e se alimenta de pinhão, frutos e folhas (KANAN & RECHE, 2011).

Amazona vinacea é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, ocorrendo desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, além do leste do Paraguai e norte da Argentina (SICK, 1997; COCKLE et al., 2007). No entanto, sua ocorrência tornou-se fragmentada, limitando-se a esparsos e escassos fragmentos dentro da sua área de distribuição original (COLLAR et al., 1992), justificando sua inclusão em praticamente todas as listas de espécies ameaçadas de extinção, independente da escala de abrangência. *Amazona vinacea* está sob risco de extinção no mundo (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014) e no Brasil (IBAMA, 2003), onde existem dados de vários estados: em Minas Gerais (MACHADO et al., 1998), em São Paulo (SÃO PAULO, 1998), no Rio de Janeiro (BERGALLO et al., 2000), no Espírito Santo (ESPÍRITO SANTO, 2005) e no Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002). No Rio Grande do Sul, há menção a um movimento de dispersão pós-

reprodução, desaparecendo completamente em março e reaparecendo em abril para permanecer o resto do ano (COLLAR, 1997). É mais comumente visto no sul do Brasil, no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (com algumas populações de mais de 100 aves), e poucas populações em menor número de animais persistem em Minas Gerais e São Paulo, dentro de um total nacional estimado de 1.500 a 2.000 indivíduos. Possivelmente, as populações estão perto da extinção no estado da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Sua área de distribuição apresenta-se na Figura 1 (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014).



Figura 1. Mapa de distribuição e ocorrência de *Amazona vinacea* com status populacional da espécie. (Adaptado de BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014).

Alguns trabalhos de reintrodução com esta espécie já iniciaram no Brasil, no Parque Nacional das Araucárias no estado de Santa Catarina. Historicamente, essa espécie ocorria neste local, porém foi extinta devido às ações humanas diretas e indiretas, como a caça e coleta de ovos e filhotes. Em 2010, um projeto de pesquisa do Instituto Carijós, autorizado

pelo IBAMA e com o auxílio da Fundação O Boticário, visando a soltura de alguns indivíduos nesta área se iniciou por pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os espécimes candidatos a soltura foram vítimas do tráfico ilegal de animais silvestres e estavam alojados no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Florianópolis. Estes animais passaram por uma série de exames clínicos e laboratoriais para avaliar seu estado de saúde física e uma preparação comportamental, aonde reaprenderam a voar, buscar alimentos naturais, reconhecer e evitar predadores, interagir com outros indivíduos da mesma espécie e se manter longe do solo. Em janeiro de 2011, os 13 papagaios aprovados nos testes clínicos e comportamentais foram soltos na região. Todos foram marcados e estão sendo monitorados continuamente pela equipe de pesquisa. Em julho de 2011, ocorreu a soltura de mais 30 indivíduos na natureza, aumentando assim as chances de criação de uma população viável no local (KANAAAN & RECHE, 2011).

Muitos jardins zoológicos, parques e outras instituições que possuem programas de reprodução *ex situ* e de pesquisa, compartilham a grande responsabilidade de ajudar a prevenir a rápida extinção de espécies silvestres no mundo. Ao menos quatorze espécies que haviam sido extintas na natureza, foram salvas através da reprodução em cativeiro. Algumas dessas espécies já têm sido restabelecidas com sucesso em seu ambiente natural. Para que se possa manter a coleção viva de espécies silvestres, frequentemente insubstituíveis em parques zoológicos e aquários, estas devem ser manejadas para as gerações futuras. Essas populações *ex situ*, propriamente manejadas, servem tanto como um importante recurso público pela afeição e conhecimento sobre a vida selvagem, como um tipo de "seguro de conservação" contra a extinção dessas espécies na natureza (ISIS, 2001).

Dessa maneira, estudos que possam de alguma forma melhorar o desempenho reprodutivo destes animais tem sido realizados, ajudando tanto na criação e manutenção de um banco de reserva genético em cativeiro como aumentando a eficiência reprodutiva e diminuindo a taxa de mortalidade neonatal.

Geralmente, estas espécies ameaçadas apresentam uma enorme dificuldade de manejo devido ao fato de serem facilmente estressáveis. Em vista disso, estudos endocrinológicos, com uma abordagem não invasiva, menos estressante e menos traumática, concentraram-se em mensurações de esteroides reprodutivos através de excretas cloacais (BERCOVITZ *et al.*, 1978; 1982; BISHOP & HALL, 1991).

1.2 Reprodução nas aves

A história natural da reprodução em aves é única e merece atenção especial. São animais obrigatoriamente ovíparos (fazem postura de ovos), sendo a única classe de vertebrados aonde não existe nenhuma espécie que se reproduz por viviparidade (cujo embrião se desenvolve dentro do corpo da mãe, numa placenta que lhe fornece nutrientes necessários ao seu desenvolvimento) (BLACKBURN & EVANS, 1986).

Possuem adaptações fisiológicas, sendo que em muitas espécies a fêmea possui apenas um único ovário (geralmente o direito é atrofiado, a exceção das aves Apterygiformes (Kiwi – *Apteryx sp.*) (FEDUCCIA, 1996)), reduzindo desta forma a massa corporal e facilitando o voo. Os machos, na maioria das espécies, não possuem um órgão intromitente (pênis) de qualquer tipo, o que poderia ser considerado também como uma adaptação para redução de peso ao voo. Por causa desta ausência de genitália externa, a cópula em muitas aves envolve um breve contato cloacal, aonde os espermatozoides são transferidos do macho para a fêmea (BALL & BALTHAZART, 2002).

Outra adaptação designada à redução de peso nessa classe de animais é um flutuante padrão na atividade de reprodução e regressão gonadal, que é sincronizada de modo que a reprodução seja estritamente limitada a uma pequena janela de tempo durante o ciclo anual (MURTON & WESTWOOD, 1977). Desta forma, existe uma variação bem marcante no tamanho dos testículos dentro e fora da estação reprodutiva, podendo ter um aumento expressivo de 1.000 vezes em machos reprodutores comparando com machos não reprodutores (FOLLETT, 1984).

O ambiente é um fator muito importante no controle do ciclo reprodutivo das aves. Este pode influenciar no tempo em que a ave irá se reproduzir, incluindo variações como o fotoperíodo, temperatura ambiental, acesso a locais para nidificação, disponibilidade de alimentos e uma variedades de interações sociais entre os espécimes (BALL & BALTHAZART, 2002).

Mudanças na quantidade de luz do dia, chamado também de fotoperíodo, fornecem um sinal que permite diferente resposta reprodutiva. Esta resposta é mediada nas aves por um complexo sistema que inclui tanto componentes neurais como componentes endócrinos

(FOLLETT, 1984). Uma característica incomum comparada aos mamíferos, é que a resposta ao fotoperíodo nas aves não é mediada pela retina, mas sim por alguma região localizada no hipotálamo. Estudos demonstram que nem os olhos e nem a glândula pineal são necessárias para o crescimento das gônadas com o estímulo luminoso, sendo a exata localização desse receptor encefálico ainda desconhecida (WILSON, 1991). Variações no fotoperíodo são referidas como sendo um sinal de início, com capacidade para iniciar e terminar a reprodução nas aves, independente das variações que ocorrem anualmente, como o tempo, disponibilidade de comida, interações sociais ou variações geográficas que estes animais podem encontrar (WINGFIELD, 1983). Muitos autores acreditam que o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal responde ao aumento da quantidade de luz do dia depois do solstício de inverno. Isso gera uma elevação na secreção de gonadotropinas, desencadeando um aumento nas gônadas e uma vasta gama de processos dependentes de hormônios esteroides, incluindo as mudanças no comportamento reprodutivo. Aves que se tornam reprodutivamente ativas durante o estímulo do aumento da quantidade de luz diária, são chamadas de fotoestimuláveis, enquanto aquelas aves que não respondem a um aumento na quantidade luz diária, são chamadas de fotorefratárias (BALL & BALTHAZART, 2002). Nem todas as aves se reproduzem em épocas com maior luminosidade nos dias. Existem espécies que a reprodução é estimulada pelo decréscimo do fotoperíodo. Isto tem sido demonstrado em *Padda oryzivora* (SAITO *et al.*, 1992) e em *Dromaius novaehollandiae* (BLACHE *et al.*, 2001). Adicionalmente, espécies de pássaros que se reproduzem naturalmente nos trópicos, aonde não vivenciam variações significativas na quantidade de luz diária, as variações reprodutivas são menos influenciadas pelo fotoperíodo (VLECK, 1993). Interessantemente, em alguns psitacídeos como as calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) (MYERS *et al.*, 1989; SHIELDS *et al.*, 1989), a fotoestimulação trabalha em associação com a facilidade de acesso ao ninho e presença do macho para promover uma maior liberação na secreção de LH e atividades reprodutivas.

Outros fatores como condição corporal e plumagem também são influenciados pelo fotoperíodo nas aves (BALL & BALTHAZART, 2002).

As variações de temperatura ambiental também podem modular as respostas no eixo-hipotalamo-pituitária-gonadal, embora são fatores bastante sutis quando estudados experimentalmente. Em muitos casos, as variações de temperatura são claramente vistas

como um fator que influencia o momento da postura de ovos em condições naturais em fêmeas de várias espécies (MEIJER *et al.*, 1999).

A disponibilidade de alimento, em muitas espécies não pode ser considerada como um fator estimulante para o desenvolvimento do sistema reprodutor. Isto não significa que a alimentação não é fundamental, mas sim que está mais correlacionada a condição nutricional da fêmea, a qual pode influenciar na postura dos ovos (MEIJER *et al.*, 1999). Porém, em algumas aves neotropicais insetívoras (família *Thamnophilidae*), o aumento da disponibilidade de insetos nas estações chuvosas e somente a presença destes são capazes de estimular o crescimento das gônadas e o canto destas aves (HAU *et al.*, 2000).

As interações sociais também são muito importantes para o estímulo da reprodução. Acredita-se que um dos aspectos mais importantes na reprodução é a fêmea poder ter um local seguro para fazer a postura (ninho) e em conjunto a presença do macho. O ritual de cortejo dos machos para com as fêmeas exerce um forte efeito sobre a fisiologia endócrina das fêmeas. Estudos em pequenos psitacídeos (*Melopsittacus undulatus*), demonstram que o canto dos machos é capaz de estimular o crescimento ovariano nas fêmeas (BROCKWAY, 1969). Do mesmo modo, a fêmea também tem papel fundamental na fisiologia reprodutiva dos machos. Um estudo com aves da espécie *Sturnus vulgaris* demonstrou que o crescimento das gônadas em machos é bastante aumentado se estes são alocados juntos das fêmeas (BURGER, 1953). Em pombos semi-castrados (retirado parte dos testículos), a presença da fêmea no recinto pode influenciar, sendo capaz de causar uma hipertrofia compensatória nestes testículos (CHENG, 1974; 1976).

1.2.1 Sistema neuroendócrino reprodutivo nas aves

A ativação da reprodução e o comportamento reprodutivo nas aves são regulados por um sistema neuroendócrino hipotálamo-glândula pituitária. Informações ambientais, como luminosidade, oferta de alimento, ameaças por predadores e interações sociais são perceptíveis pelo cérebro das aves. Os neuropeptídios hipotalâmicos como o GnRH, conseguem perceber estas mudanças, e as correlaciona com a reprodução, estimulando as gonadotropinas (hormônio luteinizante –LH-, e hormônio folículoestimulante –FSH-), que

irão agir sobre as gônadas e estimular a gametogênese (espermatogênese e oogênese) e a produção de hormônios esteroides (andrógenos, estrógenos e progestágenos) nas gônadas (UBUKA & BENTLEY, 2011).

O neuropeptídeo GnRH (“Gonadotropin-Releasing-Hormone”) regulador da secreção de gonadotropinas foi primariamente isolado e caracterizado em mamíferos nos anos 1970 (AMOSS *et al.*, 1971; SCHALLY *et al.*, 1971). Na década de 1980, muitos estudos com aves foram sendo realizados, e a molécula de GnRH foi purificada em frangos (*Gallus domesticus*), onde pode-se descobrir que essa molécula difere dos mamíferos por se apresentar de duas formas. Estas duas moléculas foram chamadas de Chicken GnRH I e Chicken GnRH II (MYLLAR & KING, 1984; MIYAMOTO *et al.*, 1984). Mais recentemente, um novo isômero foi isolado, o Lamprey-GnRH-III (BENTLEY *et al.*, 2004), sendo sua função ainda desconhecida.

O cGnRH-I é responsável por estimular a liberação de LH (DUNN & MILLAM, 1998), mas não pela liberação de FSH (DUNN *et al.*, 2003). A liberação de FSH é predominantemente independente da entrada de GnRH na glândula pituitária (KIRBY *et al.*, 2005). O efeito estimulante do GnRH-I para causar a secreção de LH em aves depende dos níveis de esteroides sexuais, estágio de maturação somática da ave e estágio do ciclo reprodutivo da mesma.

O Hormônio Inibidor de Gonadotropina (GnIH) é estimulado tanto pela ação da melatonina quando do estresse, podendo suprimir a reprodução através inibição dos hormônios LH e FSH, ou até mesmo agindo sobre as moléculas de GnRH. Outro neuro-hormônio hipotalâmico, arginina-vasotocina (AVT), é liberado diretamente da neuro-hipófise e é responsável por induzir a ovulação nas aves. Após a postura, o comportamento parenteral é feito pelo hormônio Prolactina (PRL), o qual é produzido na glândula pituitária. A secreção de PRL é regulada por outro hormônio chamado de Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP). Os hormônios tireoidianos (T3) fazem parte desse processo estimulando a ação do GnRH-I na secreção das gonadotrofinas (UBUKA & BENTLEY, 2011). Um resumo das atividades neuroendócrinas reprodutivas está representado na Figura 2.

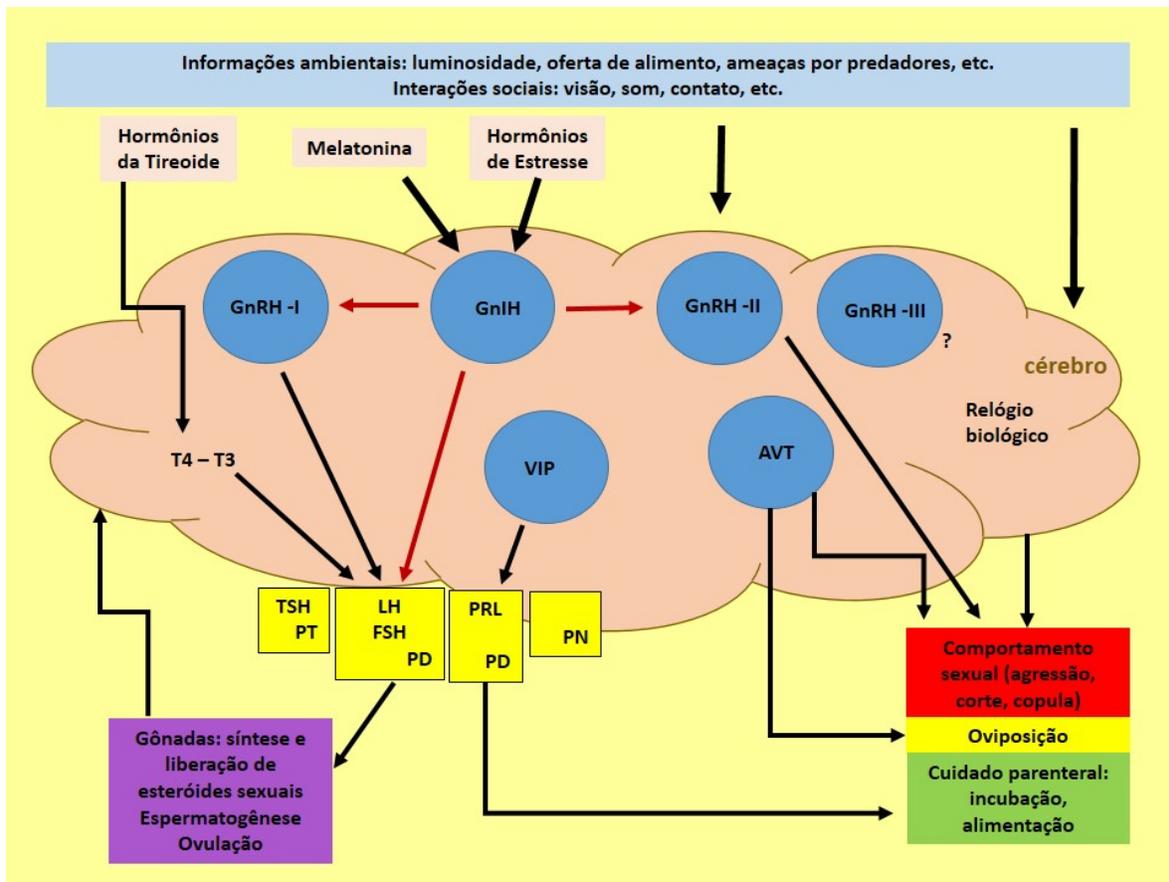


Figura 2. Sistema neuroendócrino reprodutivo das aves. (adaptado de UBUKA & BENTLEY, 2011).

1.2.2 Ciclo reprodutivo das aves

As aves não tem a necessidade do corpo lúteo como os mamíferos, porém, o ciclo de crescimento folicular e as flutuações endócrinas que levam a ovulação são chamados de ciclo ovulatório (PROUDMAN, 2004). Pode-se dizer que estas possuem uma hierarquia folicular ovariana, sendo que o maior folículo irá ovular em intervalos de tempo regulares. Normalmente, a fêmea desses animais faz a postura de um ovo por dia durante a estação reprodutiva (UBUKA & BENTLEY, 2011). A fase pré-ovulatória nas aves é a mais curta das fases e sua duração está associada ao tamanho da espécie, do peso do ovo e da precocidade do filhote que irá nascer, geralmente tendo a duração entre 6 e 16 dias (JOHNSON & WOODS, 2007). Nesta fase, a produção de esteroides pelas células da granulosa e da teca é predominantemente regulada pela atividade de LH. A camada da

granulosa produz progesterona que atua como precursor na síntese da testosterona e androstenediona pela camada da teca e em menor grau pelas células da granulosa. Já a camada da teca produz principalmente a androstenediona pela camada interna, enquanto a externa sintetiza estrógeno (JOHNSON, 2000).

Os níveis de progesterona aumentam progressivamente antes da ovulação e, como o LH, tem seu pico próximo ao momento da ovulação, sendo este aumento da progesterona requerido para o pico de LH ocorrer. Esta interação entre LH e progesterona é alimentada através de um *feedback* positivo (POLLOCK & OROSZ, 2002). Em galinhas, a ovulação ocorre entre seis a oito horas depois de uma onda de LH, e os ovos ficam armazenados no oviduto em média 24 horas antes de ocorrer a oviposição (UBUKA & BENTLEY, 2011). A progesterona tem um papel fundamental na ovulação nas aves, pois a injeção sistêmica e intraventricular de progesterona pode induzir tanto o pico de LH como a ovulação prematura, enquanto que a administração de soro anti-progesterona antes do surgimento do pico de progesterona pode bloquear a ovulação. Além disso, em estudos que bloquearam este aumento da progesterona na fase pré-ovulatória, não houve o aumento dos níveis de LH. Em outros estudos onde foi bloqueado o aumento dos níveis de testosterona e estrógeno, a injeção de progesterona induziu um pico pré-ovulatório normal de LH (JOHNSON, 2000).

A maior parte do estrógeno durante o ciclo ovulatório é produzida pelos folículos pré-hierárquicos, porém assim como a testosterona, os estrógenos não são fundamentais para indução da secreção de LH ou da ovulação. Os estrógenos são os responsáveis pela regulação do metabolismo do cálcio, características sexuais secundárias como cor e forma da plumagem e pelo controle dos comportamentos sexuais (JOHNSON, 2000; CROSTA *et al.*, 2003).

O período de incubação dos ovos (choco) é controlado pelo hormônio prolactina. Em fêmeas que falham durante a incubação dos seus ovos, os valores encontrados de prolactina nunca ultrapassam os valores basais. Da mesma maneira, em espécies altriciais (filhotes imaturos e extremamente dependentes de cuidados parentais), os valores de prolactina se encontram elevados durante a incubação e após o nascimento dos filhotes, durante o período de alimentação dos mesmos (GOLDSMITH, 1982). O pico de prolactina

coincide com o declínio da concentração de LH e regressão gonadal em muitas espécies de aves (SHARP & SREEKUMAR, 2001).

Nos machos, a ação das gonadotropinas (LH e FSH) se assemelha muito aos mecanismos observados em mamíferos. O LH estimula as células de Leydig a produzir testosterona e androstenediona, enquanto que o FSH atua sobre as células de Sertoli, com mecanismo de ação pouco conhecido ainda, mas sabe-se que sua ação é potencializada com a testosterona (CROSTA et al., 2003). Esta produção de testosterona estimula a espermatogênese, o crescimento do epidídimo, e desenvolvimento dos túbulos, especialmente dos ductos deferentes. Outra atuação da testosterona é atribuída ao controle dos comportamentos sexuais envolvendo a instalação e defesa de territórios ou de ninhos durante a época reprodutiva, além dos comportamentos de canto e agressão (POLLOCK & OROSZ, 2002).

1.3 Objetivos

O objetivo do presente trabalho é fornecer dados sobre a fisiologia reprodutiva de *Amazona vinacea* criados em cativeiro e validar o ensaio imunoenzimático para dosagem hormonal de progestágenos e andrógenos, através de mensuração hormonal em amostras urofecais. Além disso, espera-se definir o padrão de secreção de progestágenos e andrógenos, através da análise de excretas de papagaio-de-peito-roxo, durante as quatro estações do ano, incluindo a estação reprodutiva normal da espécie em cativeiro.

1.3.1 Materiais e métodos

O presente trabalho será apresentado em forma de dois artigos científicos que serão submetidos a revistas científicas após aprovação pela banca examinadora.

Artigo 1 - Validação de ensaio imunoenzimático para hormônios esteroides fecais em papagaio-de-peito-roxo - *Amazona vinacea* (KUHL, 1820) (aves: Psittacidae).

Artigo 2 - Perfil anual de progestágenos e andrógenos urofecais de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) por meio de mensuração de metabólitos hormonais utilizando um método não invasivo.

CAPITULO 2

ARTIGO 1 – REVISTA PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ZOOLOGY

**VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA HORMÔNIOS
ESTEROIDES FECAIS EM *AMAZONA VINACEA***

RESUMO

Durante as últimas duas décadas, as técnicas de análise de esteroides fecais têm sido utilizadas para pesquisa de perfis reprodutivos em animais silvestres de cativeiro e de vida livre. Devido às diferenças específicas no metabolismo esteroidal entre as espécies é necessária a correta validação de métodos de ensaio para a obtenção de resultados precisos. O presente estudo propõe a validação da técnica do ensaio imunoenzimático utilizando os anticorpos para progestinas CL425 e andrógenos R156/7 fecais em papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) (California State University, Davis, USA). Foram utilizadas fezes de 10 casais de papagaios, em dois períodos distintos, dentro e fora da estação reprodutiva. Para a validação dos ensaios, foram feitos os testes de paralelismo, dose-resposta e teste de validação fisiológica. Concluiu-se que a técnica do ensaio imunoenzimático com anticorpos para dosagem de metabólitos de progestágenos e andrógenos, em amostras urofecais da espécie *Amazona vinacea* é acurada, precisa e confiável.

Palavras-chave: progesterona, testosterona, enzimoimunoensaio, *Amazona vinacea*

ABSTRACT

During the last two decades, the techniques of analysis of fecal steroids have been applied for studying reproductive profiles in many species of captive wild and free living wild animals. Since there are specific steroid metabolism differences among species, correct validation of the technique is required in order to generate accurate results. This study aims to validate the technique of enzyme immunoassay using antibodies to CL425 progestins and R156/7 androgens in droppings from purple breasted parrot (*Amazona vinacea*) (California State University, Davis, USA). Fecal samples from 5 bird pairs were used in two distinct periods, within and outside of the breeding season. Validation assays included parallelism, dose-response and physiological validation test. It was concluded that the enzyme immunoassay technique for studying metabolites of progestins and androgens in urofecal samples from *Amazona vinacea* is an accurate, precise and reliable test.

Keywords: progestin, testosterone, immunoassay, *Amazona vinacea*

1 Introdução

O papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), família Psittacidae, é espécie endêmica da Mata Atlântica, no Brasil, Argentina e Paraguai (Sick 1997; Cockle et al. 2007) e está incluído na lista de espécies ameaçadas de extinção (Birdlife International 2014). Poucos estudos têm sido divulgados sobre a fisiologia reprodutiva da espécie com potencial aplicação no incremento de seu status populacional, em vida livre e cativeiro. Os métodos não invasivos de mensuração de metabólitos esteroidais fecais para avaliações endócrinas foram descritos, inicialmente, no final de 1970, em aves (Czekala e Lasley 1977) e início de 1980, em mamíferos (Möstl et al 1983). Nas últimas décadas, o aperfeiçoamento de métodos de quantificação de metabólitos urinários e fecais de esteroides permitiu a investigação das relações endócrino-comportamentais em inúmeras espécies selvagens (Peter et al 1996, Schwarzenberger et al 1996, Wasser et al 2000, Palme et al 2005). Atualmente, tais métodos têm sido utilizados, em ampla escala, para investigar associações entre variações hormonais e comportamentais, além de estudos de reprodução, bem-estar, ecologia, conservação e biomedicina (Palme 2005).

A análise hormonal de esteroides fecais em animais silvestres permite o monitoramento fisiológico da função gonadal, em longo prazo e sem necessidade de submeter os animais ao estresse, como ocorre na coleta de amostras sanguíneas (Lasley e Kirkpatrick 1991; Brown e Wildt 1997; Brown 2001). Porém, o metabolismo e a excreção dos hormônios esteroides apresentam enorme variação entre as espécies e, portanto, esses processos devem ser validados para cada espécie, previamente, a sua aplicação (Peter et al 1996; Schwarzenberger et al 1996). Contudo, ultimamente, houve progresso substancial no estudo da endocrinologia reprodutiva das aves selvagens (Elphick et al 2007) devido à crescente utilização dessas técnicas não invasivas, entre as quais, destacam-se as mensurações de metabólitos urofecais de hormônios esteroides (progestágenos, estrógenos, andrógenos e glicocorticóides) para a caracterização de perfis endócrinos, determinação de status reprodutivo e identificação de distúrbios reprodutivos em aves selvagens (Wasser e Hunt 2005; Jensen e Durrant 2006; Staley et al., 2007; Pereira 2008). Este estudo inclui a validação do ensaio imunoenzimático para dosagem hormonal de progestágenos e andrógenos de excretas cloacais em papagaio-do-peito-roxo (*Amazona vinacea*), espécie ameaçada de extinção.

2 Materiais e métodos

2.1 Aves e coleta de amostras

Para o experimento, foram utilizados 10 reprodutores (5 fêmeas e 5 machos) de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), alojados aos pares (5 casais) em Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil (Lat 29^o 43' 24,3" S, Long 50^o 36' 35,1" W). O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS n° 18476) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, segundo a autorização de criação da espécie ameaçada (IBAMA n° 97371). Cada gaiola continha as dimensões de 1 m de largura, 1,2 m de altura e 2 ms de comprimento, sendo suspensas 1 m do solo. Todos os animais foram, previamente, sexados e identificados com anilhas, duas nas fêmeas e uma nos machos. O experimento compreendeu dois meses, um dentro da estação reprodutiva (setembro) e outro fora (dezembro), durante 2012. As coletas das amostras urofecais nos recintos ocorreu a cada 3 dias, durante todo o período experimental, sempre durante a tarde, entre 12:30 e 16:30. Os casais foram separados dentro do próprio recinto por uma porta divisória e as amostras urofecais foram coletadas imediatamente após defecação. Para tanto, uma lona era colocada sob cada gaiola. As excretas foram acondicionadas em pequenos tubos plásticos de 2 mL com tampa rosca, rotulados com a identificação do animal, espécie, data da coleta e armazenadas a -20^oC. Ao final do período de coletas, todas as amostras foram acondicionadas em gelo seco e transportadas até o laboratório, onde foram processadas. Todos os dados referentes às datas de postura, comportamento reprodutivo de cópula e ovoscopia para verificar os ovos férteis durante o período experimental foram registrados em planilha. Os ninhos foram revisados diariamente e todos os ovos foram, imediatamente, retirados e destinados para incubação dos artificialmente.

2.2 Extração dos metabólitos das excretas

O protocolo de extração dos esteroides das excretas cloacais foi realizado conforme metodologia descrita por Tempel e Gutiérrez (2004). As excretas foram secas em estufas a 57°C por aproximadamente 72 horas, e posteriormente trituradas. Após isto, cada amostra foi pesada individualmente, e 0,05 g foram colocadas em tubos de ensaio de vidro contendo 1,0 mL de metanol 80%. Estas foram agitadas em vortex por 30 segundos e posteriormente em agitador horizontal por 12 horas. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a

2.500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante transferido para microtubos. Todas as amostras foram identificadas individualmente e estocadas a -20°C .

2.3 Seleção dos anticorpos

A escolha dos anticorpos utilizados obedeceu o critério de Goymann (2005). Foram utilizados os anticorpos para progesterinas CL425 e andrógenos R156/7 da California State University, Davis (USA). A reatividade cruzada do anticorpo CL425 foi descrita por Graham et al. (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3 α -ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3 β -ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11 α -ol-3,20-diona 147,0%; 5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona 94,0%; 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona 64,0%; 5 α -pregnan-3,20-diona 55,0%; 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona 12,5%; 5 β -pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11 β -ol-3,20-diona 2,7%; 5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona 2,5%; 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol (pregnanediol) $<0,1\%$; outros metabólitos $<0,1\%$.

A reatividade cruzada do anticorpo de andrógenos foi descrita por Polegato (2004) como sendo: 100% para testosterona; 57,37% para 5 β -dihidrotestosterona; 0,27% para androstenediona; 0,4% para androsterona; e $<0,04\%$ para todos os outros metabólitos analisados.

2.4 Ensaio Imunoenzimático

Para a validação dos ensaios imunoenzimáticos, utilizaram-se os seguintes testes descritos por Brown et al. (2004) e Wasser et al. (1995): Teste de Paralelismo, Teste Dose-Resposta e o Teste de Validação Fisiológica. Foram utilizados como controles internos os coeficientes de variação intra e inter-ensaio, que asseguraram a acurácia, a repetibilidade e a comparabilidade dos dados obtidos com o ensaio imunoenzimático.

2.4.1 Teste de Paralelismo

O teste de Paralelismo é uma forma de determinar se o ensaio está realmente medindo o metabólito de interesse. Foi utilizado um *pool* de 10 amostras de extratos fecais de 5 casais, separadas entre machos e fêmeas e escolhidas aleatoriamente, sendo um *pool* correspondente à estação reprodutiva (setembro) e outro fora da estação de reprodução dos animais (maio) e a partir destes *pools* foram realizadas as diluições seriadas (1:2 até 1:4.096).

2.4.2 Teste Dose-Resposta

Este teste determina se alguma substância presente no extrato pode interferir na ligação entre o anticorpo e o hormônio. Para isto, foi adicionada uma quantidade conhecida de hormônio a uma amostra que apresente naturalmente uma baixa concentração do hormônio investigado e preparada na diluição determinada pela curva de paralelismo, e comparando-a com a quantidade recuperada no final do processo. Considerou-se valido o teste quando o coeficiente de regressão linear for próximo a 1 e a inclinação da curva estiver entre 0,80 e 1,20.

2.4.3 Validação Fisiológica

A Validação Fisiológica evidencia se há correlação entre as concentrações obtidas com a dosagem e a resposta fisiológica do animal. Para a validação fisiológica, tanto em machos quanto em fêmeas, foi realizada a técnica de controle negativo. Foram utilizadas as amostras de excretas fecais coletadas de 5 casais (fêmeas e machos) que apresentaram comportamento de cópula e postura de ovos férteis no período reprodutivo, amostras dos mesmos casais fora da estação de reprodução. Esperou-se que estas amostras apresentassem uma oscilação fisiológica nos níveis de progesterona e testosterona, uma vez que os órgãos reprodutores deveriam estar produzindo maior concentração hormonal, conforme as observações de comportamento reprodutivo (cópula e postura) , durante a estação reprodutiva.

3 Resultados

No teste de paralelismo, o *pool* de amostras apresentou perfil semelhante ao da curva-padrão, durante a diluição. Apresentou disposição paralela à curva padrão para os dois anticorpos analisados (Figuras 1 e 2). O teste forneceu valores ideais de diluição para as amostras fecais (50% de ligação), 1:4 para progestinas e 1:3 para andrógenos.

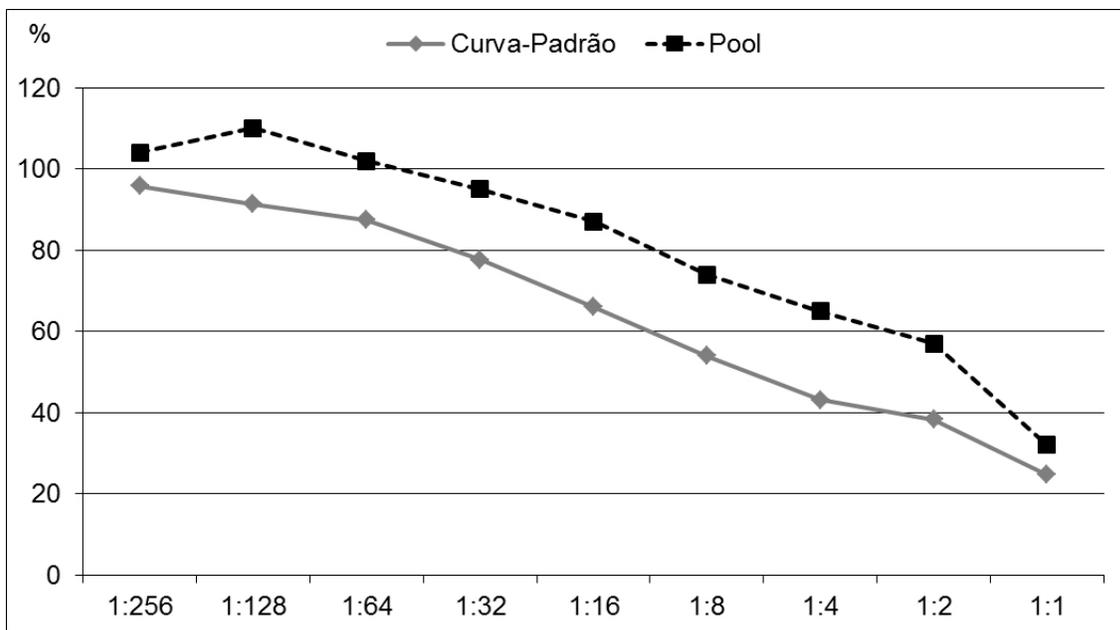


Figura 1. Teste de paralelismo para andrógenos. A linha tracejada representa o *pool* de amostras uofecais de 5 casais de *Amazona vinacea* e a linha contínua, a curva-padrão hormonal.

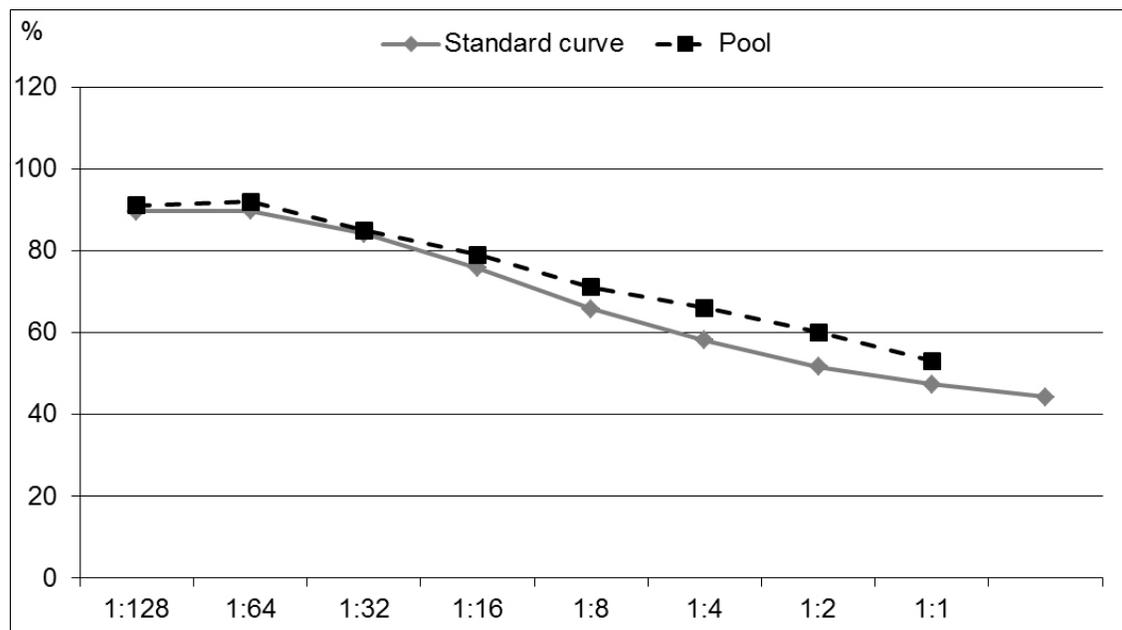


Figura 2. Teste de paralelismo para progestágenos. A linha tracejada representa o *pool* de amostras uofecais de 5 casais de *Amazona vinacea* e a linha contínua, a curva-padrão hormonal.

No teste de dose-resposta, o acréscimo de hormônio exógeno obteve recuperação significativa, nos dois anticorpos utilizados. Obteve-se a curva $y = 0,8926x + 1,5145$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9926$ para CL425 e $y = 0,8746x + 2,3986$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9931$ para R156/7. Em ambos os casos, os resultados estão dentro do intervalo aceitável para validação.

Os valores de progestinas e andrógenos observados na validação fisiológica estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Valores de andrógenos urofecais (ng/g excretas cloacais secas) de machos de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), fora (maio de 2012) e durante a estação reprodutiva (setembro de 2012).

Maio	02.05	06.05	09.05	13.05	16.05	21.05	24.05	28.05	31.05	Media
Macho 1	34,75	40,66	21,90	41,94	52,26	50,66	67,87	42,53	51,01	44,84
Macho 2	93,05	63,68	28,13	31,19	24,92	28,98	56,09	51,47	75,38	50,32
Macho 3	32,27	40,10	25,27	54,41	26,88	49,77	52,49	32,73	31,87	38,42
Macho 4	31,24	47,81	16,13	35,05	43,96	23,74	52,72	35,30	28,65	34,96
Macho 5	39,00	56,65	26,07	36,66	52,02	47,82	23,33	39,97	27,65	38,80
Setembro	03.09	06.09	10.09	13.09	17.09	20.09	24.09	27.09	Media	
Macho 1	43,27	78,89	97,75	491,80	99,30	182,55	212,43	218,61		178,07
Macho 2	30,96	43,76	102,28	202,73	80,51	121,48	60,19	24,25		83,27
Macho 3	40,09	63,15	370,48	584,74	270,95	162,69	102,50	70,90		208,19
Macho 4	36,99	97,34	259,60	428,53	140,29	119,99	62,71	65,60		151,38
Macho 5	84,97	215,65	117,66	525,81	115,63	170,92	47,66	36,98		164,41

Tabela 2. Valores de progestinas urofecais (ng/g excretas cloacais secas) de fêmeas de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), fora (maio de 2012) e durante a estação reprodutiva (setembro de 2012).

Maio	02.05	06.05	09.05	13.05	16.05	21.05	24.05	28.05	31.05	Media
Fêmea 1	14,46	19,74	8,97	6,54	20,29	14,98	9,70	-	12,11	13,35
Fêmea 2	14,03	30,86	15,55	5,19	17,69	17,58	13,40	12,15	18,22	16,07
Fêmea 3	16,23	27,79	8,16	10,40	65,64	13,95	19,73	21,23	14,01	21,90
Fêmea 4	18,08	42,70	8,33	8,59	15,72	12,37	8,99	20,47	9,55	16,09
Fêmea 5	23,07	34,62	6,46	14,44	17,93	17,03	8,74	17,44	19,03	17,64
Setembro	03.09	06.09	10.09	13.09	17.09	20.09	24.09	27.09	Media	
Fêmea 1	7,97	10,48	10,73	276,27	61,61	4,14	8,61	26,21	50,75	
Fêmea 2	12,36	13,76	23,74	44,94	29,71	35,39	22,69	3,40	23,25	
Fêmea 3	45,32	13,82	23,55	17,78	11,68	570,21	32,13	2,32	89,60	
Fêmea 4	38,84	55,45	42,89	13,93	40,16	494,46	75,33	458,62	152,46	
Fêmea 5	13,93	12,68	75,13	10,68	482,85	354,55	5,82	5,06	120,09	

A validação fisiológica nas fêmeas detectou uma oscilação expressiva nos níveis de progesterona durante a fase de oviposição. Foram observados níveis aumentados de metabólitos nesse período; enquanto, níveis inferiores foram registrados fora da estação de reprodução. A Figura 5 representa as dosagens hormonais de progesterona urofecais das 5 fêmeas registradas fora e a estação reprodutiva.

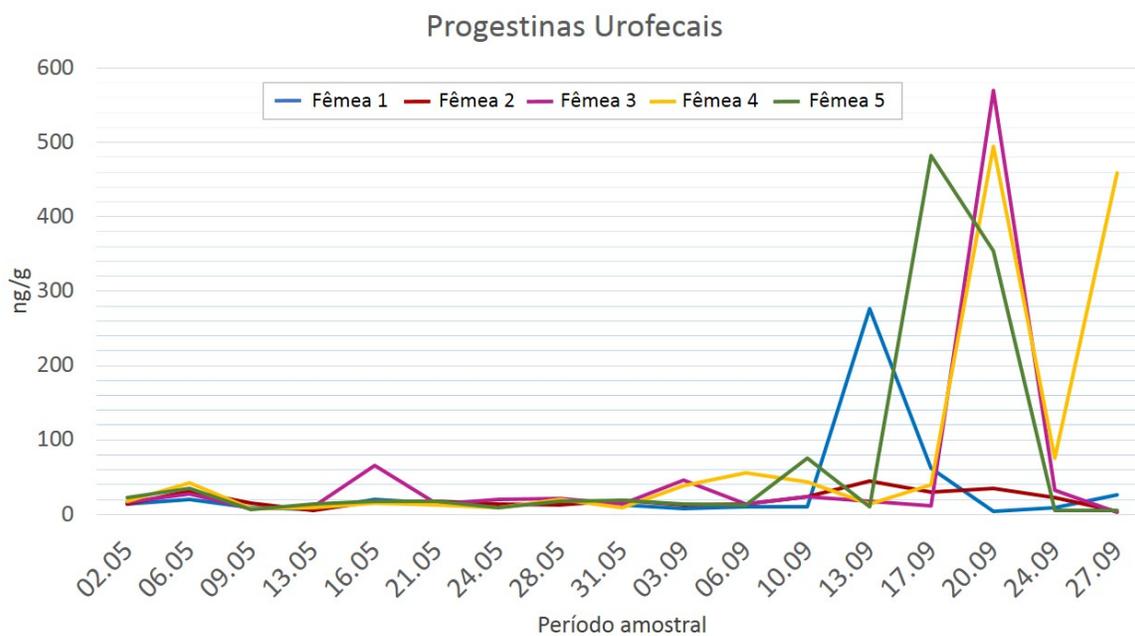


Figura 3. Valores de progestinas urofecais das fêmeas de *Amazona vinacea* (ng/g excretas cloacais secas) registrados fora (maio de 2012) e durante a estação reprodutiva (setembro de 2012).

Na validação fisiológica dos machos, também se detectou um aumento expressivo nos níveis de andrógenos urofecais, durante o período em que os animais estavam realizando a cópula. A Figura 4 apresenta as dosagens hormonais de metabólitos de testosterona dos 5 machos fora e durante a estação reprodutiva.

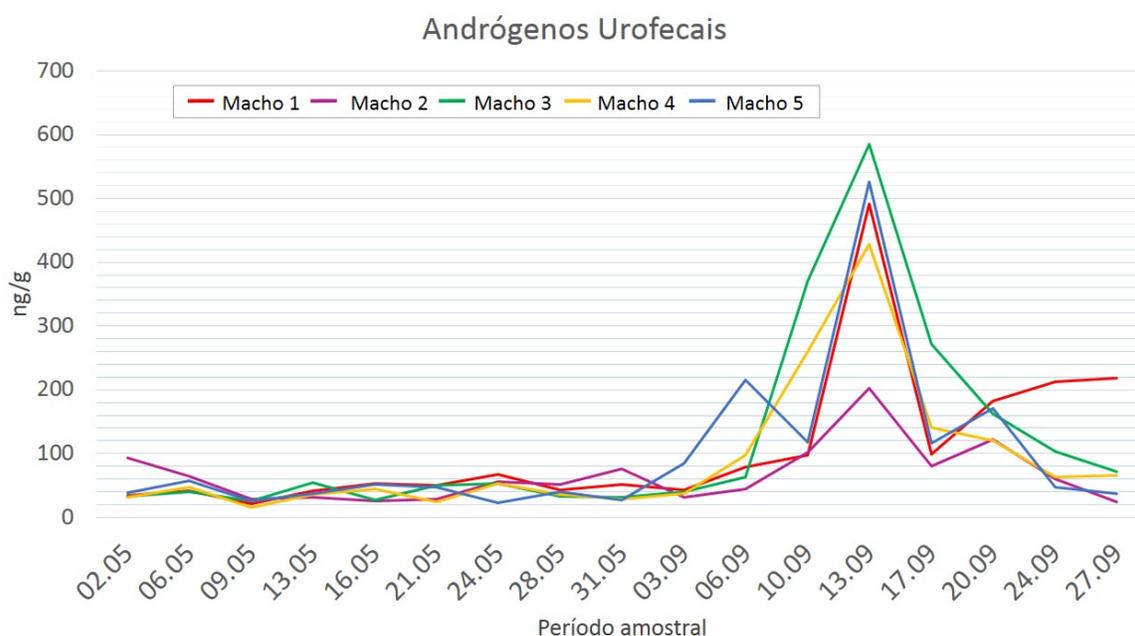


Figura 4. Valores de andrógenos urofecais (ng/g excretas cloacais secas) de machos de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), durante o período fora da estação reprodutiva (maio de 2012), e durante a estação reprodutiva (setembro de 2012).

Também foram utilizados como controle de qualidade interna os coeficientes de variação intra e inter-ensaios baixos (Progestágenos: controle alto 14,1% na ligação e 9,4% na concentração, e controle baixo 7,1% na ligação e 13,9% na concentração; Andrógenos: controle alto 11,2% na ligação e 12,8% na concentração, e controle baixo 4,8% na ligação e 13,8% na concentração), que asseguram a repetibilidade e comparação dos dados obtidos aqui com outros ensaios imunoenzimáticos.

Discussão

Em decorrência do metabolismo e excreção de esteroides diferirem significativamente entre as espécies, e às vezes até mesmo entre os sexos, os métodos não-invasivos de análise hormonal devem ser rigorosamente validados para cada espécie animal antes de sua aplicação prática em estudos de pesquisas (Palme 2005).

Crescentes evidências indicam que existem grandes diferenças na excreção dos metabólitos fecais e urinários entre as espécies de aves e, até agora, nenhum método para a avaliação não-invasiva de hormônios esteroides pode ser usado como único para aplicação inter-espécies, exigindo desta forma abordagens individualizadas e cuidadosas (Buchanan e Goldsmith 2004; Hirschenhauser et al. 2005).

No presente estudo, o Teste de Paralelismo demonstrou que a curva-padrão e a formada pelas amostras de concentração conhecida tiveram uma disposição paralela entre elas, validando o teste. Através deste resultado, foi possível determinar a diluição ideal para as dosagens das amostras fecais, determinada por aquela diluição que apresentou cerca de 50% de ligação entre o hormônio amostral e o anticorpo no ensaio (a parte mais acurada da curva-padrão, sendo o valor da diluição seriada que se encontrava no meio da curva).

No Teste Dose-Resposta, o acréscimo de hormônio exógeno obteve uma recuperação significativa nos dois anticorpos utilizados, revelando que nenhuma substância exógena interferiu na ligação hormônio-anticorpo.

A Validação Fisiológica foi realizada com o intuito de demonstrar uma técnica de ensaio capaz de detectar mudanças nos níveis de metabólitos de esteroides fecais quando ocorrem alterações fisiológicas nas concentrações dos esteroides no sangue (Palme 2005). O princípio ativo acetato de buserelina (análogo de GnRH), na dose de 8,0 µg/kg, aplicado pela via intramuscular, tem sido usado com sucesso em outras aves como a cacatua (*Cacatua galerita*) e a calopsita (*Nymphicus hollandicus*) com o objetivo de se obter a liberação lenta de hormônio luteinizante pela hipófise anterior, e consequente produção de testosterona (Lovas et al 2010). No entanto, validações fisiológicas desse tipo nem sempre são possíveis em se tratando de espécies ameaçadas de extinção (Palme 2005), como é o caso da espécie *Amazona vinacea*. Mesmo sob estas restrições, amostras de esteroides gonadais de diferentes estágios reprodutivos podem ser utilizados para avaliar a relevância biológica de um método não-invasivo, estabelecendo desta forma um parâmetro confiável

ao teste (Palme 2005). No presente estudo, optou-se pela validação sem estímulo hormonal exógeno, utilizando somente a validação com controle negativo, em vista de se tratar de uma espécie ameaçada de extinção e também pelo fato de se tentar preservar a biologia reprodutiva da espécie sem interferência humana. Desta forma, tentou-se minimizar qualquer estresse de manejo que pudesse levar a alteração do comportamento reprodutivo dos casais cativos já estabelecidos.

Os 5 casais de papagaios-de-peito-roxo que apresentaram comportamento de cópula e postura de ovos férteis foram avaliados em dois períodos distintos (dentro e fora da estação reprodutiva). Desta forma, tanto nos machos quanto nas fêmeas foi possível verificar uma elevação nos níveis de andrógenos uofecais e progestinas uofecais, consecutivamente, dentro da estação reprodutiva, em comparação a estação não reprodutiva.

Os aumentos observados dos níveis de metabólitos nas fêmeas podem ser correlacionados à postura com subsequente queda, sendo essa oscilação encontrada coincidente com o que é comumente relatado em aves domésticas, que atribuem ao aumento da atividade folicular desencadeada durante a estação reprodutiva. Os níveis de progesterona aumentam progressivamente antes da ovulação e tem seu pico próximo ao momento da ovulação (Pollock e Orosz 2002). Análises correlacionando o pico de progesterona com postura das fêmeas não foram feitas, pois as coletas de fezes não foram diárias.

A produção de testosterona nos machos estimula a espermatogênese, o crescimento do epidídimo, e desenvolvimento dos ductos deferentes. Porém, a testosterona atua também como mediadora dos comportamentos sexuais, envolvendo a instalação e defesa de territórios ou de ninhos durante a época reprodutiva, além dos comportamentos de canto e agressão (Pollock e Orosz 2002). Todos os machos dos 5 casais analisados para a validação fisiológica apresentaram comportamento de agressão e defesa do ninho e além disso, produziram ovos férteis, o que comprova a espermatogênese e os picos de testosterona encontrados durante o período de reprodução.

Analisando os valores de andrógenos uofecais de machos e progestinas uofecais das fêmeas (Tabela 1 e 2), durante o período experimental, é possível observar que todos os animais apresentaram em algum período da estação reprodutiva, um aumento no valor de

aproximadamente 2 vezes maior do que as amostras coletadas no período não-reprodutivo. Comparando as médias dos valores encontrados para cada animal entre as duas fases de coleta, apenas o casal 2 não apresentou o dobro nos valores de andrógenos e progestinas. Isto pode estar relacionado ao fato da coleta não ter sido diária, podendo desta maneira ter acarretado a ausência de amostras que apresentassem valores elevados neste período.

A partir dos resultados obtidos sob as condições experimentais do ensaio proposto, foi possível concluir que a técnica do ensaio imunoenzimático utilizando os anticorpos para progestinas CL425 e andrógenos R157-7 da California State University – Davis, para a dosagem de metabólitos progesterona em fêmeas e testosterona em machos a partir de amostras urofecais da espécie *Amazona vinacea* é acurada, precisa e confiável. Desta forma, este trabalho foi capaz de fornecer uma alternativa não-invasiva para a realização de estudos relacionados com a fisiologia reprodutiva de papagaio-do-peito-roxo. O estudo também se mostra útil, pois é capaz de avaliar o estado reprodutivo de uma espécie ameaçada de extinção em todo o território nacional brasileiro, contribuindo com estudos para a preservação da espécie e podendo servir como modelo em estudos futuros para outras espécies de psitacídeos.

Bibliografia

1. Birdlife International. 2014. Species factsheet: *Amazona vinacea*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 10/01/2014.
2. Brown J., Walker S., Steinman k. 2004. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. 2nd ed. Smithsonian Institution, 1-93.
3. Brown J. L. and Wildt D. E. 1997. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. *International Zoo Yearbook* 35:173-191.
4. Brown, J. L., Graham, L. H., Wielebnowski, N., Swanson, W F, Wildt, D. E., and Howard, J. G. 2001. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. *J. Reprod. Fétil. Suppl.* 57:71-82.

5. Buchanan K. and Goldsmith A. R. 2004. Noninvasive endocrine data for behavioral studies: the importance of validation. *Anim. Behav.* 67: 183–185.
6. Czekala N. M. and Lasley B. L. 1977. A technical note on sex determination in monomorphic birds using fecal steroid analysis. *Int. Zoo Yearb.* 17: 209–211.
7. Elphick C. S., Reed M. J., Delehanty D. J. 2007. Applications of Reproductive Biology to Bird Conservation and Population Management. Pp 367-399. in Jamieson B. G. M. ed. *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
8. Goymann W. 2005. Noninvasive Monitoring of Hormones in Bird Droppings: Physiological Validation, Sampling, Extraction, Sex Differences, and the Influence of Diet on Hormone Metabolite Levels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. *Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*, 1046:35-53.
9. Graham L. H., Schwarzenberger F., Möstl E., Galama W., Savage A. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. *Zoo Biol, New York* 20:227-236.
10. Hirschenhauser K., Kotrschal K., Möstl E. 2005. Synthesis of Measuring Steroid Metabolites in Goose Feces. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 138–153.
11. Lasley B. L., Kirkpatrick J. F. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J Zoo Wildl Med* 22:23-31.
12. Jawor J. M., McGlothlin J. W., Casto J. M., Greives T. J., Snajdr E. A., Bentley G. E., Ketterson E. D. 2006. Seasonal and individual variation in response to GnRH

challenge in male dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). Gen and Comp Endocrinol 149:182-189.

13. Jensen T. and Durrant B. 2006. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. Zoo Biol 25:25-34.
14. Lovas E. M., Johnston S. D., Filippich L. J. 2010. Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). Aust Vet Jour 88:1-2.
15. Möstl E., Nöbauer H., Choi H. S., Wurm W., Bamberg E. 1983. Trächtigkeitsdiagnose bei der Stute mittels Östrogenbestimmung im Kot. Prakt. Tierarzt 64: 491–492.
16. Palme R. Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005. New York Academy of Sciences 1046: 75–80.
17. Pereira R. J. G. Acompanhamento endócrino e comportamental da atividade reprodutiva anual de machos de falcões quiri-quiri (*Falco sparverius*) de vida livre. 2008. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
18. Peter A. T., Kasputin N., Crister J. K. 1996. Analysis of sex steroid metabolites excreted in feces and urine of nondomesticated animals. The Compendium 18:781-791.
19. Pollock C. G., Orosz S. E. 2002. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. Vet Clin North Am: Exotic Animal Practice 5:441-474.

20. Staley A. M., Blanco J.M., Dufty A. M., Wildt D. E., Monfort S.L. 2007. Fecal steroid monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden eagle and peregrine falcon. *J Comp Physiol B: Bioch, Syst, and Env Physiol* 177:609-622.
21. Wasser S. K., Hunt K. E. 2005. Noninvasive Measures of Reproductive Function and Disturbance in the Barred Owl, Great Horned Owl, and Northern Spotted Owl. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration, 1046:109-137.
22. Wasser S. K., Hunt K. E., Brown J.L., Cooper K., Crocket C. M., Bechert U., Millspaugh J. J., Larson S., Monfort S. L. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen Comp Endocrinol* 120:260-275.
23. Wasser S. K., Velloso A. L., Rodden M. D. 1995. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. *J Wildl Manag* 59:889-894.
24. Palme R., Rettenbacher S., Touma C., El-Bahr S.M., MÖStl E. 2005. Stress Hormones in Mammals and Birds: Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040:162-171.
25. Polegato B. F. 2004. Validação de método endócrino não-invasivo para monitoramento de fisiologia reprodutiva e de atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais. Monografia (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

26. Proudman J. A. 2004. Reprodução da Fêmea – Reprodução em Aves: Macho e Fêmeas. Pp. 242-256 in Hafez E. S. E., Hafez B., eds. Reprodução animal. Editora Manole, Barueri.
27. Tempel D. J., Gutiérrez R. J. 2004. Factors Related to Fecal Corticosterone Levels in California Spotted Owls: Implications for Assessing Chronic Stress. *Cons Biol* 18:538-547.

CAPÍTULO 3

ARTIGO 2 – REVISTA GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY

PERFIL ANUAL DE PROGESTÁGENOS E ANDRÓGENOS UROFECAIS DE PAPAGAIO-DO-PEITO-ROXO (*AMAZONA VINACEA*) POR MEIO DE MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS HORMONAIIS EM AMOSTRAS UROFECAIS

RESUMO

Pouco se sabe sobre a endocrinologia reprodutiva de psitacídeos. Atualmente, o uso de monitoramento não invasivo na descrição dos processos endócrinos e perfis reprodutivos tem sido cada vez mais explorado como ferramenta de estudo nessas espécies. Este trabalho descreve os perfis endócrinos anuais dos esteroides sexuais urofecaís em *Amazona vinacea* e sua utilização no aprimoramento do manejo reprodutivo da espécie. Foram utilizados 10 casais adultos de *Amazona vinacea* mantidos em viveiros suspensos, no Rio Grande do Sul, Brasil. As excretas foram coletadas duas vezes por semana, entre maio de 2012 e maio de 2013. O monitoramento da atividade gonadal foi feito de forma não invasiva por mensuração de metabólitos de andrógenos e progestágenos nas excretas de machos e

fêmeas, respectivamente. Foram coletadas amostras frescas de excretas, sempre no período entre 12h00min e 16h00min e mantidas congeladas até o processamento. As amostras foram secas em estufa a 57°C, trituradas e os hormônios extraídos com adição de metanol 80%. A dosagem hormonal foi realizada por ensaio imunoenzimático com anticorpos para andrógenos e progestágenos. O perfil reprodutivo apresentou variação na atividade hormonal durante a fase reprodutiva. Porém, a comparação de casais reprodutores com não-reprodutores demonstrou que os níveis de progestágenos não diferiram significativamente entre fêmeas que fizeram postura daquelas que não fizeram. Já os níveis de andrógenos diferiram, significativamente, entre os reprodutores e não-reprodutores. Observaram-se diferenças hormonais entre as estações anuais tanto nos machos, quanto nas fêmeas. Dados meteorológicos de temperatura e insolação demonstraram correlação negativa com os perfis anuais de progestágenos. A mensuração de metabólitos de andrógenos e de progestágenos por metodologia não invasiva demonstrou ser ferramenta útil para o conhecimento da fisiologia e manejo reprodutivo de *Amazona vinacea*.

Palavras-chave: endocrinologia, reprodução, monitoramento não invasivo, Psitaciformes.

ABSTRACT

Little is known about the reproductive endocrinology in parrots. Currently, the use of non invasive monitoring in the description of endocrine profiles and reproductive processes has been increasingly explored as a study tool in these species. This study describes the annual endocrine profiles of sex steroids in urofecal samples of vinacea Amazon and their use in improving the reproductive management of the species. A total of 10 adult pairs of *Amazona vinacea* were kept in suspended aviaries located in Rio Grande do Sul, Brazil. Samples were collected twice a week, from May 2012 to May 2013. The monitoring of gonadal activity was noninvasive by measurement of androgen and progestagens metabolites in excreta of males and females, respectively. Fresh excreta samples were collected, always in the period between 12 and 16 h, then kept frozen until processing. The samples were dried at 57°C, crushed and the hormones extracted using 80% methanol. The hormone dosage was performed by enzyme immunoassay with antibodies to androgens and progestins. The reproductive profile showed a variation in

hormonal activity during the reproductive phase. Comparing breeding to non-breeding pairs, the levels of progesterone did not differ significantly between laying and non-laying hens. However, the androgen levels differed significantly between breeding and non-breeding cocks. There were hormonal differences between the annual seasons in both cocks and hens. Meteorological data of temperature and insolation have demonstrated a negative correlation with the annual profiles of progestins. The use of measurement of metabolites of androgens and progestins by noninvasive methodology proved to be a useful tool for understanding the physiology and reproductive management.

Keywords: endocrinology, reproduction, noninvasive monitoring, Psittaciformes

1.Introdução

A fragmentação, exploração e poluição dos ambientes naturais têm resultado em perdas catastróficas de variabilidade genética devido à diminuição significativa de determinadas populações animais (Wildt et al, 1992). O papagaio-de-peito-roxo, *Amazona vinacea* (Kuhl, 1820) é uma espécie endêmica da Mata Atlântica no Brasil, onde ocorre desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. Sua distribuição inclui leste do Paraguai e norte da Argentina (Sick, 1997; Cockle et al, 2007). Atualmente, tem ocorrência limitada a esparsos e escassos fragmentos na área de distribuição original (Collar et al, 1992), o que justifica sua inclusão nas listas de espécies ameaçadas de extinção (Birdlife International, 2000, 2014, Ibama, 2003), conforme indicam pesquisas em Minas Gerais (Machado et al, 1998), São Paulo (São Paulo, 1998), Rio de Janeiro (Bergallo et al, 2000), Espírito Santo (Espírito Santo, 2005) e Rio Grande do Sul (Marques et al, 2002). Nesse contexto, estudos que possam, de alguma forma, melhorar o desempenho reprodutivo dessas aves são válidos, para colaborar tanto na criação e manutenção de um banco de reserva genético em cativeiro. Usualmente, espécies ameaçadas apresentam considerável dificuldade de manejo devido a sua predisposição ao estresse. Em vista disso, estudos endocrinológicos, com uma abordagem não invasiva, menos estressante e menos traumática, concentraram-se em mensurações desses esteroides através de excretas urofecais (Bercovitz et al, 1978a, 1982b; Bishop e Hall, 1991). Nas últimas décadas, houve progresso substancial no estudo e

entendimento da endocrinologia reprodutiva das aves selvagens (Elphick et al, 2007) em função da crescente utilização de técnicas não invasivas de monitoramento endócrino. Destaca-se a aplicação dessas técnicas na mensuração de metabólitos urofecais de hormônios esteroides para a caracterização de perfis endócrinos, acesso ao status reprodutivo e identificação de distúrbios reprodutivos em aves selvagens (Wasser e Hunt, 2005; Jensen e Durrant, 2006; Staley et al, 2007; Pereira, 2008). Este estudo avalia o perfil reprodutivo anual, em associação com valores de progesterágenos e andrógenos, de 10 casais de papagaio-do-peito-roxo (*Amazona vinacea*), mantidos em criadouro comercial. A atividade gonadal foi monitorada de forma não invasiva por meio da mensuração de metabólitos dos esteroides sexuais nas excretas urofecais de machos e fêmeas através da técnica de enzimoimunoensaio (EIE).

2. Materiais e métodos

2.1 Manejo das aves e coleta de dados

O presente estudo incluiu 20 papagaios-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), alojados aos pares (10 casais), no Criadouro Asas do Brasil, Novo Hamburgo, RS, Brasil (Lat 29° 43' 24,3" S, Long 50° 36' 35,1" W). As dimensões de cada gaiola eram 1 m de largura, 2 m de comprimento e 1,2 m de altura. Cada uma possuía um ninho plástico em formato de caixa retangular. A alimentação dos casais era feita com ração peletizada apropriada para a espécie (Nutrópica) e todos recebiam frutas duas vezes por semana, nos dias de coletas, além de do manejo adicional de enriquecimento ambiental com a oferta de pinhas (*Pinus sp.*) e poleiro de madeira para promover a distração e o comportamento de bicagem. Todos os papagaios foram previamente sexados e identificados com anilhas coloridas para a diferenciação entre machos e fêmeas. A frequência das coletas nos recintos ocorreu a cada 3 dias, durante todo o período experimental, o qual compreendeu as quatro estações do ano (365 dias). O casal era separado dentro do próprio recinto por uma porta divisória e as amostras fecais foram coletadas imediatamente após a defecação, com o auxílio de uma lona colocada sob cada gaiola. Para padronização do tempo de coleta, todas as excretas fecais foram coletadas no período da tarde, entre as 12h30min e 16h30min. As amostras fecais foram acondicionadas em tubos plásticos de 2 mL com tampa rosca, rotulados com a identificação do animal, espécie, data da coleta e armazenadas a -20°C. Diariamente, os

ninhos eram revisados, os ovos coletados e os dados registrados em planilha. Todos os ovos foram retirados para incubação artificial. A ovoscopia e identificação da fertilidade dos ovos seguiram o manejo de rotina do criadouro, realizado pelos funcionários locais. A ovoscopia era realizada no momento da retirada do ovo do ninho, ao colocá-lo na chocadeira, após 48 horas e diariamente até o 7º dia após a postura, quando, então ovos inférteis eram descartados. Durante as coletas, observou-se o comportamento reprodutivo dos papagaios. Os dados meteorológicos de temperatura, insolação (horas de luz solar) e precipitação pluviométrica (em mm) foram obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, conforme autorização de criação da espécie ameaçada *Amazona vinacea*, cadastro IBAMA 97371.

2.2 Ensaio Imunoenzimático

Os anticorpos foram escolhidos conforme sugerido por Goymann (2005), como princípio a validação do ensaio. Foram utilizados os anticorpos para progestágenos CL425 e andrógenos R156/7 da California State University (Davis, CA, USA). A validação dos ensaios para a espécie *Amazona vinacea* foi previamente descrita (Stein et al., 2014).

2.3 Processamento de dados

2.3.1 Extração dos metabólitos das excretas

As excretas cloacais foram secas em estufas a 57°C por, aproximadamente 72 horas, trituradas, pesadas em 0,05 g de excretas e colocadas em tubos de ensaio de vidro contendo 1,0 mL de metanol 80%. Após, as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos e, posteriormente, em agitador horizontal por 12 horas. Então, foram centrifugadas a 2.500 rpm, por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para microtubos limpos e estocadas a -20°C. O protocolo de extração dos esteroides das excretas foi realizado conforme metodologia descrita por Tempel e Gutiérrez (2004).

2.3.2 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram registrados em planilhas Excel e exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. A comparação das médias, ao longo do tempo,

foi realizada pela análise de variância para medidas repetidas. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas. Também foi realizada comparação entre os indivíduos que tiveram atividade reprodutiva e aqueles que não tiveram, definidos como reprodutores e não reprodutores. Considerou-se machos reprodutores os indivíduos que fertilizaram ovos e não-reprodutores os machos de fêmeas que puseram ovos inféteis, ou não fizeram postura. Foram consideradas reprodutoras as fêmeas que realizaram postura e não-reprodutoras as que não realizaram. Foram comparadas as distribuições de progesterona e testosterona entre reprodutores e não reprodutores pelo teste de Mann-Whitney e os gráficos apresentam as médias semanais, ao longo do tempo. As variações sazonais de temperatura, precipitação pluviométrica e luminosidade foram comparadas com os valores de progestágenos e andrógenos, ao longo do experimento. Para correlacionar variáveis quantitativas entre si, utilizou-se o teste de correlação de Spearman.

3 Resultados

Durante o período amostral, sete dos 10 casais estiveram em atividade reprodutiva e fizeram postura. No total, foram produzidos 29 ovos, mas um foi encontrado quebrado no ninho. Em média, cada casal fez postura de 4 ovos, durante a estação de reprodução. Dos ovos viáveis, apenas 16 eram férteis (ovoscopia positiva), dos quais 10 tiveram morte embrionária e 6 eclodiram. A taxa de eclosão foi 37,5% (16:6). A taxa de eclosão normal (sem interferência humana) foi 83,3% (6:5) e a com intervenção (nascimento com auxílio humano) foi 16,7% (6:1). O percentual de ovos brancos foi 42,9% (28:12) e o de ovos férteis foi 57,1% (28:16). Os casais 2 e 7 produziram apenas ovos não fecundados (brancos). Os casais 3, 9 e 10 foram os que não se reproduziram (sem postura de ovos). O tempo médio de incubação dos ovos férteis até o nascimento foi 26,2 dias, mínimo de 25 e máximo de 28 dias de incubação. Na Tabela 1, é possível visualizar um resumo das atividades reprodutivas ocorridas entre maio do ano de 2012 a maio do ano de 2013.

Os casais 1, 4, 6 e 8 demonstraram agressividade e proteção do ninho. As fêmeas dos casais 1, 5 e 6 permaneciam, longos períodos, dentro dos ninhos. Foram observados comportamentos de alimentação da fêmea pelo macho, cortejo, cópula dos casais 1, 3, 4, 5, 6 e 8. Normalmente, a cópula era observada após a junção do casal, depois do período de quatro horas separados para a coleta das excretas. Todos os casais demonstraram maior

interesse pelas pinhas e poleiros de madeira durante a reprodução, período no qual roíam esses materiais, inclusive com necessidade de reposição na próxima data de coleta.

Tabela 1 - Atividades reprodutivas apresentadas entre 28 de maio de 2012 e 24 de maio de 2013 por papagaios-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), mantidos em cativeiro no Criadouro Asas do Brasil, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

Casal	Data de postura	Ovoscoopia	Data de eclosão	Período de incubação	Eclosão	Observações
1	17.09.2012	-				
	20.09.2012	-				
	23.09.2012	-				
	27.09.2012	+	morte embrionaria			Óbito em 25.10.2012
	30.09.2012	+	eclosão em 27.10.2012	28 dias	IH	vivo
	05.10.2012	+	morte embrionaria			Óbito em 29.10.2012
	09.10.2012	+	morte embrionária			Óbito em 03.11.2012
	12.10.2012	-				
	16.10.2012	+	eclosão em 09.11.2012	25 dias	EN	vivo
2	17.09.2012	-				
	20.09.2012	-				
3	sem postura					
4	29.10.2012	+	eclosão em 23.11.2012	26 dias	EN	vivo
	01.11.2012	+	morte embrionária			Óbito em 28.11.2012
5	01.09.2012	+	eclosão em 26.09.2012	25 dias	EN	vivo
	05.09.2012	+	eclosão em 01.10.2012	27 dias	EN	vivo
	13.09.2012	+	morte embrionária			Óbito em 23.09.2012
	17.09.2012	-				
	21.09.2012	+	morte embrionária			Óbito em 20.10.2012
	24.09.2012	-				
6	11.09.2012	+	morte embrionária			Óbito em 30.09.2012
	14.09.2012	+	morte embrionária			Óbito em 24.09.2012
	25.09.2012	+	eclosão em 20.10.2012	26 dias	EN	vivo
	28.09.2012	-				
7	23.11.2012 -					
8	17.09.2012	+	morte embrionária			Óbito em 05.10.2012
	17.09.2012	-				
	22.09.2012	+	morte embrionária			Óbito em 01.10.2012
	24.09.2012		ovo quebrado			
	23.11.2012	-				
9	sem postura					
10	sem postura					

*EN=eclosão natural, IH=intervenção humana; (+) ovoscoopia positiva, (-) ovoscoopia negativa.

Para o estudo do perfil anual de andrógenos nas excretas dos machos de *Amazona vinacea* foram utilizadas 1010 amostras, com médias mensais: janeiro $25,9 \pm 3,7$ ng/g (n=90); fevereiro $28,7 \pm 3,2$ ng/g (n=60); março $31,7 \pm 17,7$ ng/g (n=80); abril $27,9 \pm 5,5$ ng/g (n=90); maio $43,3 \pm 7,9$ ng/g (n=90); junho $49,1 \pm 15,9$ ng/g (n=80); julho $36,5 \pm 7,5$ ng/g (n=90); agosto $86,9 \pm 46,2$ ng/g (n=90); setembro $125,7 \pm 42,1$ ng/g (n=80); outubro $110,3 \pm 63,2$ ng/g (n=90); novembro $74,2 \pm 57,7$ ng/g (n=90) e dezembro $43,3 \pm 13,4$ ng/g (n=80). Utilizando o mês de maior nível de andrógenos como base, setembro foi significativamente diferente dos meses de janeiro, fevereiro, março, abril, maio e julho (Figura 1).



Figura 1 - Médias mensais (ng/g de excreta) de andrógenos nas excretas de machos de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013. Letras diferentes se diferenciam significativamente ($p < 0,05$).

Para o estudo do perfil anual de progestágenos nas excretas das fêmeas de *Amazona vinacea* foram utilizadas 1010 amostras, com médias mensais: janeiro $7,2 \pm 0,9$ ng/g (n=90); fevereiro $9,26 \pm 1,3$ ng/g (n=60); março $15,8 \pm 2,9$ ng/g (n=80); abril $14,15 \pm 1,85$ ng/g (n=90); maio $16,05 \pm 3,16$ ng/g (n=90); junho $11,85 \pm 2,54$ ng/g (n=80); julho $11,89 \pm 2,17$ ng/g (n=90); agosto $13,52 \pm 3,48$ ng/g (n=90); setembro $45,7 \pm 55,79$ (n=80); outubro $15,44 \pm 24,91$ ng/g (n=90); novembro $4,27 \pm 6,42$ ng/g (n=90) e dezembro $2,76 \pm 0,42$ ng/g (n=80). Utilizando o

mês de maior nível de progestágenos como base, setembro não foi significativamente diferente dos outros meses avaliados no estudo (Figura 2).



Figura 2 - Médias mensais (ng/g de excreta) de progestágenos nas excretas de fêmeas de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013 e posturas registradas em cada mês. Letras diferentes se diferenciam significativamente ($p < 0,05$).

A fim de explorar as mensurações hormonais de forma mais ampla, foi realizada a comparação semanal entre casais reprodutores e não-reprodutores. Os níveis de progestágenos (Figura 3) não diferiram significativamente, mas os níveis de andrógenos (Figura 4) diferiram significativamente ($P < 0,05$), entre reprodutores e não-reprodutores, nas primeiras semanas de maio e setembro e na última semana de dezembro.

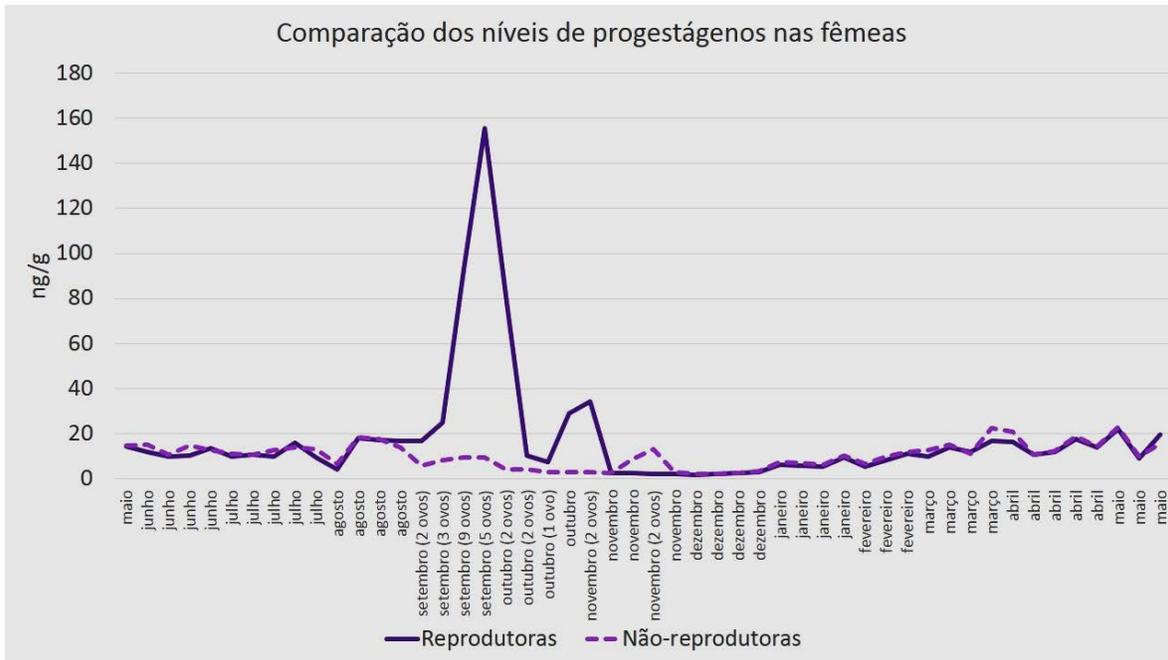


Figura 3 – Comparação entre os níveis de progesterona semanais nas fêmeas reprodutoras com registro das posturas e não-reprodutoras de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013.

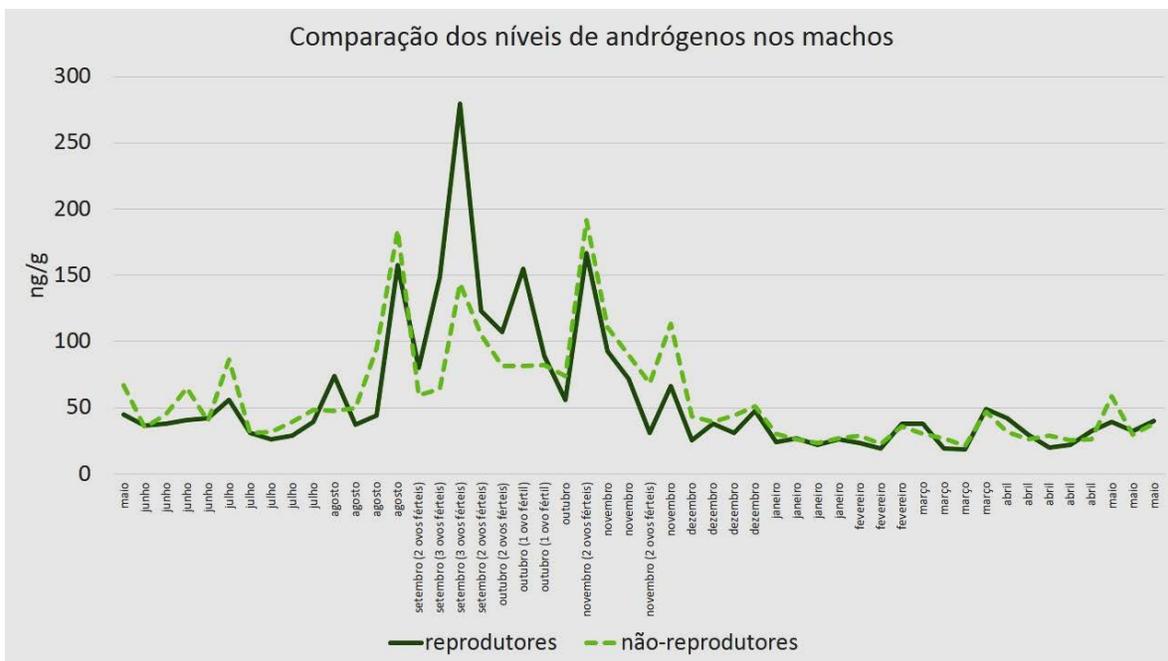


Figura 4 – Comparação entre os níveis de progesterona semanais nos machos reprodutores com registro de ovos férteis e não-reprodutores de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013.

Avaliando-se as médias dos valores de andrógenos dos machos reprodutores (n=5), durante as quatro estações do ano (primavera (23/09 a 21/12) 77,1±32,6ng/g; verão (21/12 a 21/03) 27,8±2,3ng/g; outono (21/03 a 21/06) 36,4±3,9ng/g e inverno (21/06 a 23/09) 84,3±16,9ng/g), observa-se que no inverno existe diferença significativa entre as estações verão e outono. Entretanto, machos não-reprodutores (n=5) não diferiram significativamente entre as quatro estações do ano (primavera 85,4±54,3ng/g; verão 29,7±6,2ng/g; outono 40,4±11,3ng/g e inverno 71,8±26,0ng/g). As médias dos valores de progestágenos entre as fêmeas reprodutoras (n=7), durante as quatro estações do ano (primavera 12,9±10,3ng/g; verão 8,6±0,9ng/g; outono 14,2±1,75ng/g; inverno 25,5±14,9ng/g) demonstraram diferença significativa no outono e inverno. Para fêmeas não-reprodutoras (n=3), houve diferença entre inverno e primavera (primavera 3±0,1ng/g; verão 9,3±1,1ng/g; outono 16,5±3ng/g; inverno 10,7±0,1ng/g) (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias dos valores de andrógenos de machos reprodutores (n=5) e não reprodutores (n=5), e de progestágenos de fêmeas reprodutoras (n=7) e não reprodutoras (n=3) de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), durante as quatro estações do ano.

	Fêmeas reprodutoras		Fêmeas não reprodutoras		Machos reprodutores		Machos não reprodutores	
	Média (ng/g)	Desvio padrão	Média (ng/g)	Desvio padrão	Média (ng/g)	Desvio padrão	Média (ng/g)	Desvio padrão
Outono	14,2	1,75	16,5	3,0	36,4	3,9	40,4	11,3
Inverno	25,5	14,9	10,7	0,1	84,3	16,9	71,8	26,0
Primavera	12,9	10,3	3,0	0,1	77,1	32,6	85,4	54,3
Verão	8,6	0,9	9,3	1,1	27,8	2,3	29,7	6,2

Dados meteorológicos foram plotados em gráficos conjuntos aos perfis anuais de progestágenos e andrógenos ao longo do ano e estão apresentados nas figuras 5, 6 e 7. Ao analisar a variação de temperatura durante o ano, percebe-se que existe correlação

significativa negativa ($r = -0,46$ $P < 0,05$) nos níveis de progestágenos das fêmeas em relação à temperatura, correlação não perceptível para andrógenos nos machos. Com relação à precipitação, não houve correlação significativa hormonal. Quanto à insolação, identificou-se correlação significativa negativa ($r = -0,35$ $P < 0,05$) nos níveis de progestágenos das fêmeas em relação à quantidade de luz diária, o que não acontece nos machos.

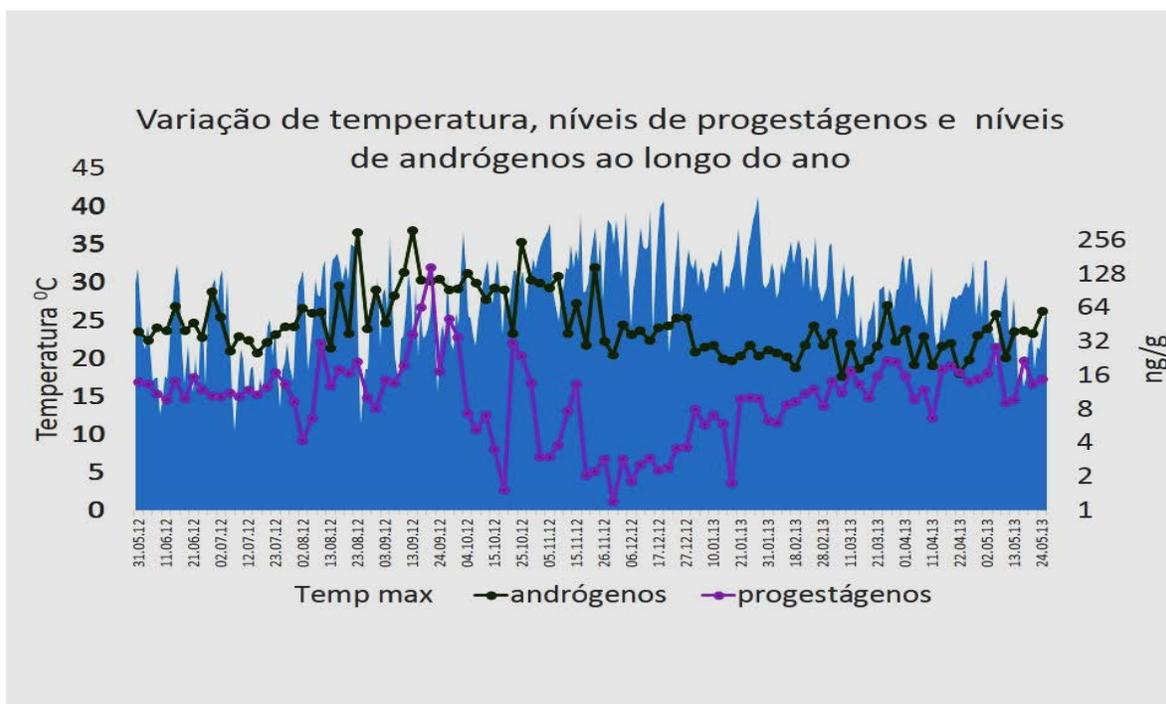


Figura 5 – Associação de variações de temperatura (sombreamento azul) com médias mensais de níveis de andrógenos e progestágenos de 10 casais de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013.

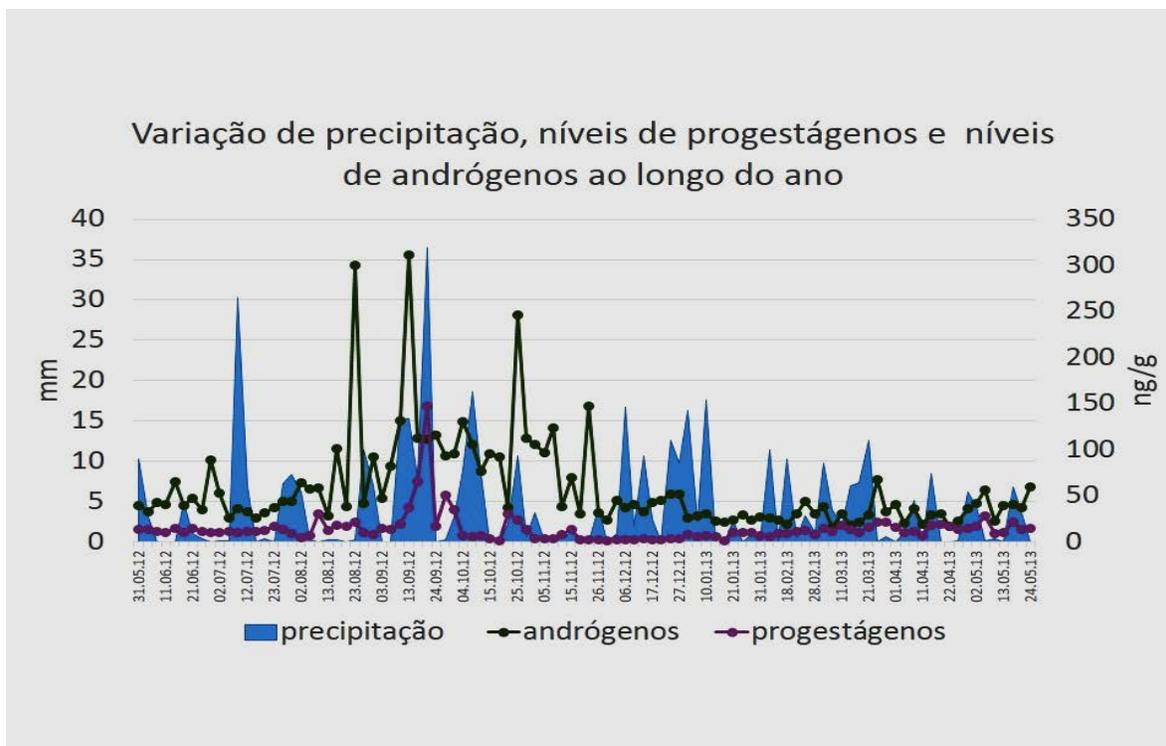


Figura 6 – Variação de precipitação (mm) e médias mensais de níveis de andrógenos e progestágenos de 10 casais de Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013.

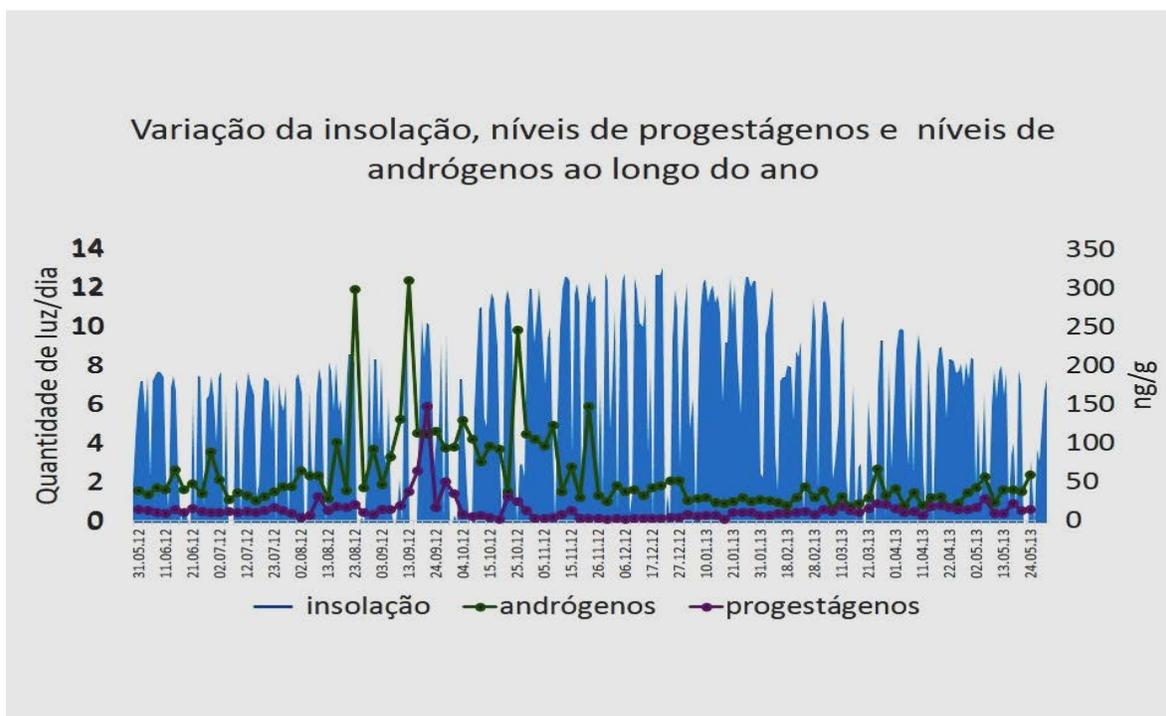


Figura 7 – Variação de insolação (quantidade de luz por dia) e médias mensais de níveis de andrógenos e progestágenos de 10 casais de Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) no período de 28 de maio de 2012 a 24 de maio de 2013.

4 Discussão

Ao longo do período experimental, 7 casais de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) mantidos em cativeiro produziram seis filhotes, proporcionalmente, 0,6 filhote por casal ano. Conforme descrição prévia (Francisco e Moreira, 2012), avalia-se a proporção obtida como baixo sucesso, pois a espécie pode botar de três a quatro ovos por casal em cativeiro, por temporada reprodutiva. Considerando-se o exposto por Francisco e Moreira (2012) e 57,1% de ovos férteis, os dez casais poderiam ter produzido 23 ovos férteis, se 3 casais não tivessem falhado em reproduzir. Como estratégia para reposição de ovos perdidos, pode-se retirar os ovos após a postura e, possivelmente, reproduzir cinco filhotes ou mais, por casal (Allgayer e Cziulik, 2007). Se considerarmos que nenhum casal foi mantido com seus ovos e que 3 casais colocaram mais de 4 ovos por estação reprodutiva (9, 6 e 5 ovos), registra-se uma produção adicional de 8 ovos na estação reprodutiva (aumento de 38%). O período médio encontrado de incubação dos ovos foi 26,2 dias, muito próximo dos 26 dias registrados, previamente (Francisco e Moreira, 2012).

A avaliação do mês de maior nível de andrógenos (setembro) indica níveis 50% superiores aos valores registrados fora da estação reprodutiva. Porém, as oscilações hormonais começam a ocorrer entre julho e agosto, período que coincide com o início da época reprodutiva da espécie. Este aumento, provavelmente, está relacionado com o aumento na espermatogênese, desenvolvimento das estruturas testiculares e do comportamento reprodutivo que são estimulados pela testosterona (Kirby e Froman, 2000). Comparando-se machos reprodutores com não reprodutores, observa-se diferenças nos níveis de andrógenos durante a estação reprodutiva somente na primeira semana de setembro. Considerando que os níveis de testosterona estão, positivamente, relacionados à massa testicular e à produção espermática (Garamszegi et al, 2005), esperava-se que os machos que fertilizaram ovos possuíssem maiores níveis de andrógenos do que aqueles que não fertilizaram, o que não foi observado. Também foi possível observar que a estação com maiores níveis hormonais de machos reprodutores foi o inverno que coincide com o a época

reprodutiva. Entretanto, machos não reprodutores demonstraram maiores níveis hormonais na primavera que também é estação reprodutiva. Em vista disso, a avaliação de fertilidade deu-se pela postura de ovos férteis ou não, não se considerou que pudessem existir machos férteis pareados com fêmeas não reprodutoras (incompatibilidade dos casais), falhas no comportamento reprodutivo e na cópula. Assim, é possível que tanto machos reprodutores quanto não reprodutores apresentem um perfil semelhante durante o ano, o que sugere que o problema de fertilidade nos ovos nesta criação pode não estar relacionado à atividade gonadal, mas sim a outros fatores.

Após o solstício de inverno (21 de junho), quando inicia o aumento da quantidade de horas-luz por dia, observa-se que os valores de andrógenos começam a oscilar, o que pode demonstrar sensibilidade da espécie à alteração do fotoperíodo como estímulo ao início das atividades reprodutivas, conforme relatado em outras espécies (Deviche et al, 2011). A espermatogênese completa nas aves domésticas dá-se em 13 dias (Deviche et al, 2011); entretanto, tal dado é desconhecido para *Amazona vinacea*, o que dificulta o entendimento sobre período de maturação e crescimento das gônadas e espermatogênese. O perfil de progestágenos urofecais nas fêmeas de *Amazona vinacea* não apresentou diferença significativa no mês de maior produção hormonal em relação ao demais meses do ano. Da mesma forma, não foi possível detectar diferenças significativas nos níveis de progestágenos, pela comparação de fêmeas reprodutoras com fêmeas não reprodutoras. As fêmeas reprodutoras apresentaram diferença significativa entre inverno e outono. No entanto, é possível identificar variação nos valores médios de progestágenos de praticamente o dobro no inverno, o qual corresponde ao período de maior número de posturas. Tal aumento nos níveis de progestágenos durante a postura já foi observado em outras aves selvagens (Jensen e Durrant, 2006; Bhavna et al, 2010). Em aves domésticas, sabe-se que a secreção de progesterona aumenta conforme o crescimento dos folículos pré-ovulatórios e alcança níveis máximos 6 a 8 horas, antes da ovulação seguido de queda e novo aumento, na postura de cada ovo (Johnson, 2000). Da mesma forma em que ocorre nos machos, um aumento da secreção de progestágenos pode estar influenciado pelo início do aumento diário de horas-luz. O fotoperíodo é o mais importante fator ambiental para a atividade reprodutiva na maioria das aves (Pollock e Orosz, 2002). Porém, muitos fatores podem ser responsáveis pela sazonalidade reprodutiva nas aves (Ubuka e Bentley, 2011).

Avaliando os dados de luminosidade e variações hormonais registrados para *Amazona vinacea*, percebe-se que as oscilações de progestágenos ocorrem na medida em que ocorre aumento da luminosidade. Ao longo do tempo, houve correlação significativa negativa nos níveis de progestágenos das fêmeas em relação à quantidade de luz diária, o que não acontece nos machos. Essa correlação negativa pode estar associada com o período de fotorefratariedade da espécie, que também pode ser influenciada pelo aumento da intensidade luminosa. Nos trópicos, apesar de inverno e verão não se caracterizarem de maneira conspícua pelas variações de temperatura, há grande variação pluviométrica que interfere na disponibilização ou não de alimentos e, conseqüentemente, no período reprodutivo (Molion, 1987). A análise da temperatura indica correlação significativa negativa nos níveis de progestágenos das fêmeas, o que não foi perceptível para andrógenos nos machos. Condições meteorológicas severas têm demonstrado interromper a reprodução através do aumento da corticosterona e depressão dos níveis circulantes de esteroides sexuais (Romero e Remage-Healey, 2000). Elevadas temperaturas durante o verão parecem interromper a atividade reprodutiva nessas fêmeas; no entanto, esse efeito pode estar associado com o período de fotorefratariedade da espécie. As variações nos períodos de chuvas parecem não interferir nas variações reprodutivas de *Amazona vinacea*, pois estes animais são mantidos em cativeiro, com disponibilidade de alimento o ano todo, não dependendo das variações de chuvas para disponibilidade de alimentos.

5 Conclusão

A mensuração hormonal não invasiva em excretas de *Amazona vinacea* serve como técnica adequada para descrição do perfil anual dos esteroides sexuais na espécie. Porém, necessita-se de estudos adicionais referentes à biologia reprodutiva em cativeiro da espécie, pois os perfis hormonais de casais reprodutores ou não foram semelhantes. Para adequado entendimento da correlação entre a reprodução dessas aves e variações climáticas, ou mesmo para entendimento mais abrangente da fisiologia reprodutiva da espécie, futuros estudos com mensuração de outros hormônios envolvidos na reprodução das aves poderiam esclarecer a fisiologia hormonal reprodutiva da espécie.

BIBLIOGRAFIA

- Allgayer M, Cziulik M. 2007. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. *Rev Bras Reprod Anim*, 31:344-350.
- Bhavna, B., Sapna, S., Geeta, P. 2010. Seasonal Fluctuation in Concentration of Progesterone and Testosterone in Three Avian Species-*Acridotheres ginginianus* (Sturnidae), *Sturnus pagodarum* (Sturnidae) and *Turdoides striatus* (Muscicapidae), with Diverse Breeding Strategies. *Acta Zool Bulgarica* 62:339-350.
- Deviche, P., Hurley, L. L., Fokidis, H. B. 2011. Avian testicular structure, function, and regulation, in: Norris, D. O., Lopez, K. H. (Eds), *Hormones and Reproduction in Vertebrates*. Elsevier, California, pp.27-69.
- Elphick, C. S., Reed, M. J., Delehanty, D. J. 2007. Applications of Reproductive Biology to Bird Conservation and Population Management, in: Jamieson, B. G. M. (Ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp.367-399.
- Francisco, L.; Moreira, N. 2012. Manejo, reprodução e conservação de psitacídeos brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36:215-219.
- Garamszegi, L., Eens, M., Hurtrez-Bousses, S., Møller, A. 2005. Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study. *Hormones and Behavior*, 47:389-409.
- Jensen, T., Durrant, B. 2006. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. *Zoo Biology*, 25:25-34.
- Johnson, A. L. 2000. Reproduction in the Female, in: Whittow, G. C. (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology*, Academic Press, California, pp.569-596.
- Kirby, J., Froman, D. 2000. Reproduction in male birds, in: (Ed.), Whittow, G. C., *Sturkie's avian physiology*, Academic Press, pp.597-615.
- Molion L.C. B. 1987. Climatologia dinâmica da região Amazônica: mecanismos de precipitação. *Rev Bras Meteorol*, 2:107-117.

- Wasser, S. K., Hunt, K. E. 2005. Noninvasive Measures of Reproductive Function and Disturbance in the Barred Owl, Great Horned Owl, and Northern Spotted Owl. *Annals of the New York Academy of Sciences. Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*, 1046:109-137.
- Pereira, R. J. G. 2008. Acompanhamento endócrino e comportamental da atividade reprodutiva anual de machos de falcões quiri-quiri (*Falco sparverius*) de vida livre. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- Pollock C. G, Orosz S. E. 2002. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *Vet Clin Exot Anim*, 5:441-474.
- Romero, L. M. e Remage-Healey, L. 2000. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): corticosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119: 52-59.
- Staley, A. M., Blanco J.M., Dufty A. M., Wildt D. E., Monfort S.L. 2007. Fecal steroid monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden eagle and peregrine falcon. *J Comp Physiol B: Bioch, Syst, and Env Physiol* 177:609-622.
- Tempel, D. J., Gutiérrez, R. J. 2004. Factors Related to Fecal Corticosterone Levels in California Spotted Owls: Implications for Assessing Chronic Stress. *Conservation Biology*, 18:538-547.
- Ubuka, T., Bentley, G. E. 2011. Neuroendocrine control of reproduction in birds, in: Norris, D. O., Lopez, K. H. (Eds). *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Birds*, Academic Press, California, pp.1-25.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO

A reprodução em cativeiro é e muito provavelmente, cada vez mais será fundamental para mantermos a diversidade biológica e genética das espécies de animais silvestres. Além disso, pode e deve ser utilizada em programas de conservação de espécies ameaçadas. A finalidade comercial, para suprir a demanda por aves de estimação, também deve ser considerada, na medida em que se contrapõe à retirada de animais da natureza pelo tráfico. Muitas instituições de pesquisa demonstram preocupação com planos de manejo e promoção de reprodução de espécies ameaçadas, através do intercâmbio de reprodutores existentes em zoológicos e vários criadouros do país. Dessa forma, o conhecimento sobre fisiologia e época reprodutiva dessas aves é de extrema importância para o sucesso e conservação dessas e de outras espécies, universalmente.

O ciclo hormonal reprodutivo, assim como ciclo ovulatório, espermatogênese, espermograma e outros dados reprodutivos ainda não estão bem definidos em psitacídeos, como em outras aves, das mais diversas espécies. Além disso, nem sempre ocorre reprodução desses animais e os índices de sucesso reprodutivo em cativeiro ainda são, usualmente, baixos. Em parte, isso pode decorrer do estresse de cativeiro, erros de manejo, deficiências nutricionais, falta de condicionamento nutricional durante a época de acasalamento, infertilidade dos machos, falta de luminosidade, clima adverso, habitat incorreto e desconhecimento do histórico reprodutivos dos pais. Concluímos com este trabalho, que o método não invasivo de mensuração hormonal possui a vantagem de minimizar o estresse causado no momento da coleta sanguínea, além de ter sido eficaz para as dosagens de progesteronas e andrógenos e pode, inclusive, servir de modelo para futuras pesquisas com outros hormônios reprodutivos. Além disso, a análise de hormônios fecais permitiu uma avaliação mais ampla do perfil hormonal de papagaios-de-peito-roxo, em um estudo longitudinal, com produção de um perfil anual de progesteronas e andrógenos urofecais.

A conservação das espécies deveria ser consequência da preservação dos seus ecossistemas naturais (*in situ*). No entanto, o risco de causarmos a extinção de várias espécies, se não aliarmos ações de conservação *ex situ* (em cativeiro) com ações *in situ* tem

que ser, seriamente, considerado. Sem dúvida, são necessárias cada vez mais pesquisas, tanto em vida livre como em cativeiro, não só para enriquecer as discussões sobre o tema, mas também para melhorar as medidas de manejo para conservação de várias espécies animais. Os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a importância de estudos adicionais em programas de reprodução em cativeiro, inclusive no auxílio de espécies ameaçadas de extinção com problemas reprodutivos.

REFERÊNCIAS

1. ALLGAYER, M.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.344-350, 2007.
2. AMOSS, M. R., BURGESS, R. BLACKWELL, R., VALE, W., FELLOWS, R., GUILLEMIN, R. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone factor (LRF) of ovine origin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 44, 205-210, 1971.
3. ATES, A.; ALTINER, A.; ÖZPINAR, A.; MÖSTL, E. Effect of energy restriction on serum cortisol and its faecal metabolite (11,17-dioxoandrostan) in pregnant ewes. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, 52, 373-376, 2008.
4. AUSTIN, J.R., O.L.. **Families of Birds**. New York: Golden Press, 200p, 1971.
5. BENTLEY, G.E.; MOORE, I.T.; SOWER, S.A., WINGFIELD, J.C. Evidence for a novel gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic and forebrain areas in songbirds. **Brain, Behavior and Evolution**. 63, 34-46, 2004.
6. BERCOVITZ, A.Z.; CZEKALA, N.M.; LASLEY, B.L.; A new method of sex determination in monomorphic birds. **Journal of Zoology and Animal Medicine**, v. 9, p. 114-124, 1978.

7. BERCOVITZ, A.Z.; COLLINS, J.; PRICE,P.; TUTLE, D. Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). **Zoo Biology**, v. 1, p. 111-117, 1982.
8. BERGALLO, H.G.; C.F.D. ROCHA, M.A.S. ALVES & M.V. SLUYS. **A fauna ameaçada de extinção do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, Editora UERJ, 166p, 2000.
9. BHAVNA, B.; SAPNA, S.; GEETA, P. Seasonal Fluctuation in Concentration of Progesterone and Testosterone in Three Avian Species-Acridotheres ginginianus (Sturnidae), Sturnus pagodarum (Sturnidae) and Turdoides striatus (Muscicapidae), with Diverse Breeding Strategies. **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 62, n. 3, p. 339-350, 2010.
10. BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Threatened birds of the world**. Barcelona, Lynx Edicions, Birdlife International, 852p., 2000.
11. BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Species factsheet: Amazona vinacea**. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 10/01/2014.
12. BISHOP, C.M. and HALL, M.R. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. **Journal of Zoology**, v. 224, p.649-668, 1991.
13. BLACHE, D.; TALBOT, R. T.; BLACKBERRY, M. A.; WILLIAMS, K. M.; MARTIN, G. B.; SHARP, P. J.. Photoperiodic control of the concentration of luteinizing hormone, prolactin and testosterone in the male emu (*Dromaius novaehollandiae*), a bird that breeds on short days. **Journal of Neuroendocrinology**. 13, 998–1006, 2001.
14. BLACKBURN, D. G. and EVANS, H. E. Why are there no viviparous bird. **The American Naturalist**. 128, 165-190, 1986.

15. BROCKWAY, B. F. Roles of budgerigar vocalization in the integration of breeding behavior. In: **Bird Vocalization**. Cambridge University Press, London, 1969. P. 131-158.
16. BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. 2nd ed. **Smithsonian Institution**, 2004, p. 1-93
17. BROWN, J. L. and WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, v. 35, p. 173-191, 1997.
18. BROWN, J. L.; GRAHAM, L. H.; WIELEBNOWSKI, N.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 71-82, 2001.
19. BUCHANAN, K. and GOLDSMITH, A. R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. **Animal Behavior**. 67: 183–185, 2004.
20. BURGER, J. W. The effect of psychic and stimuli on the reproductive cycle of the male starling, *Sturnus vulgaris*. **Journal of Experimental Zoology**. 124, 227-237, 1953.
21. CHENG, M. F. Ovarian development in the female ring dove in response to stimulation by intact and castrated male ring doves. **Journal of Endocrinology**. 63, 43-53, 1974.
22. CHENG, M. F. Interaction of lighting and other environmental variables on activity of hypothalamo-hypophysial-gonadal system. **Nature**. 263, 148-149, 1976.

23. COCKLE, K.; G. CAPUZZI; A. BODRATI; R. CLAY; H. DEL CASTILLO; M. VELÁZQUEZ; J.I. ARETA; N. FARIÑA and R. FARIÑA. Distribution, abundance, and conservation of Vinaceous Amazons (*Amazona vinacea*) in Argentina and Paraguay. **Journal Field Ornithology**. 78 (1): 21-39. 2007.
24. COLLAR, N. J. Family Psittacidae (Parrots). In: J. DEL HOYO; A. ELLIOT & J. SARGATAL (Eds). **Handbook of the birds of the World**. Barcelona, Lynx Edicions. 1997, p. 280-479.
25. COLLAR, N. J.; GONZAGA, L. P.; KRABBE, N.; MADROÑO NIETO, A.; NARANJO, L. G.; PARKER III, T. A.; WEGE, D. **Threatened birds of Americas: the ICBP/IUCN red data book**. Cambridge, International Council for Bird Preservation, 1992, 1150p.
26. CROSTA, L.; GERLACH, H.; BÜRKLE, M.; TIMOSSO, L. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 6, n. 1, p. 57-83, 2003.
27. CZEKALA, N. M. and LASLEY, B.L. A technical note on sex determination in monomorphic birds using fecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**. 17: 209–211, 1977.
28. DEVICHE, P.; HURLEY, L. L.; FOKIDIS, H. B. Avian testicular structure, function, and regulation. In: NORRIS, D. O. and LOPEZ, K. H. (Eds). **Hormones and reproduction in vertebrates**, v.4, p.27-69, 2011.
29. DUNN, I.C. and MILLAM, J.R. Gonadotropin releasing hormone: forms and functions in birds. **Poult. Avian Biology Reviews**. 9:61–85, 1998.

30. DUNN, I. C.; LEWIS, P. D.; WILSON, P. W.; SHARP, P. J. Acceleration of maturation of FSH and LH responses to photostimulation in prepubertal domestic hens by oestrogen. **Reproduction**, 126, 217–225, 2003.
31. ESPÍRITO SANTO. 2005. **Diário Oficial**. Vitória, Imprensa Oficial do Estado do Espírito Santo, Poder Executivo [16/VI.2006]
32. ELPHICK, C. S.; REED, M. J.; DELEHANTY, D. J. Applications of Reproductive Biology to Bird Conservation and Population Management. In.: JAMIESON, B. G. M. (ed). **Reproductive Biology and Phylogeny of Birds**. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 2007, p-367-399.
33. FRANCISCO, L.; MOREIRA, N. Manejo, reprodução e conservação de psitacídeos brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 215-219, 2012.
34. FEDUCCIA, A. **The Origin and Evolution of Bird**. Yale University Press, New Haven, CT and London, 1996.
35. FOLLET, B. K. Birds. In: **Marshall's Physiology of Reproduction**. 283-350. Longman Greene, Edinburgh. 1984.
36. FRIGERO, D.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Excreted corticosterone metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male Greylag geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**.137:29-36, 2001.
37. GARAMSZEGI, L.; EENS, M.; HURTREZ-BOUSSES, S.; MØLLER, A. Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 4, p. 389-409, 2005.

38. GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biology**, New York, v. 20, p. 227-236, 2001.
39. GOYMANN W. 2005. Noninvasive Monitoring of Hormones in Bird Droppings: Physiological Validation, Sampling, Extraction, Sex Differences, and the Influence of Diet on Hormone Metabolite Levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration, 1046:35-53.
40. GOLDSMITH, A. R. Plasma concentration of prolactin during incubation and parenteral feeding throughout repeated breeding cycles in canaries (*Serinus canarius*). **Journal Endocrinology**, 94, 51-59. 1982.
41. HAU, M. WIKELSKI, M., WINGFIELD, J. C. Visual and nutritional food cues fine-tune timing of reproduction on a neotropical rain forest bird. **Journal of Experimental Zoology**. 286:494-504, 2000.
42. HIRSCHENHAUSER, K.; KOTRSCHAL, K.; MÖSTL, E. Synthesis of Measuring Steroid Metabolites in Goose Feces. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1046: 138–153. New York Academy of Sciences. doi: 10.1196/annals.1343.011, 2005.
43. IBAMA. 2003. **Lista das espécies de fauna brasileira ameaçada de extinção**. Disponível na World Wide Web em: <http://www.ibama.gov.br/fauna/downloads/lista%20spp.pdf> [Acessado em 04/X/2005]
44. IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2010. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 01 fev 2012.

45. ISIS, 2001. **International species information system**. [Online] 17/07/2001. URLs:
<<http://156.99.114.200/joinisis/fundamentals.asp>>
<<http://156.99.114.200/abstracts/Mammalia.asp>>.
46. IASLEY, B. L.; KIRKPATRICK, J. F. Monitoring ovarian function in captive and free ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 23-31, 1991.
47. JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. **Zoo Biology**, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2006.
48. JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. **Zoo Biology**, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2006.
49. JOHNSON, A. L. Reproduction in the Female. In: Whittow, G. C. (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. San Diego: Academic Press, 2000, p.569-596.
50. JOHNSON, A.; WOODS, D. C. Ovarian dynamics and follicle development. In: (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Aves**, 2007, p.243-277.
51. KANAAN, V.T.; RECHE, J.. Reintrodução do Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) no Parque Nacional das Araucárias. **Revista Fundação Grupo Boticário**, 2011.
52. KIRBY, J.; FROMAN, D. Reproduction in male birds. In: (Ed.). **Sturkie's avian physiology**, 2000, p.597-615.
53. KIRBY, J. D.; VIZCARRA, J. A.; BERGHMAN, L. R.; PROUDMAN, J. A.; YANG, J.; SCANES, C. G. Regulation of FSH secretion: GnRH independent? In: DAWSON,

- A., Sharp, P.J. (Eds.), **Functional Avian Endocrinology**. Narosa Publishing House, New Delhi, 2005, pp. 83–96.
54. LASLEY B. L., KIRKPATRICK J. F. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **J Zoo Wildl Med** 22:23-31.
55. LOVAS, E. M.; JOHNSTON, S. D.; FILIPPICH, L. J. Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). **Australian Veterinary Journal**. 88, No. 1-2, 2010.
56. MACHADO, A. B. M.; FONSECA, G. A. B.; MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. S.; LINS, L. V. **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 1998, 605p.
57. MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Publicações Avulsas Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2002, 52p.
58. MEIJER, T.; NIENABER, U.; LANGER, U.; TRILLMICH, F. Temperature and timing of egg-laying of European starlings. **Condor**, 101, 124-132, 1999.
59. MILLAR, R. P.; KING, J. A. Structure-activity relations of LHRH in birds. **Journal of Experimental Zoology**. 232, 425-430, 1984.
60. MYERS, S. A., MILLAM, J. R., EL HALAWANI, M. E. Plasma LH and prolactin levels during the reproductive cycle of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). **General and Comparative Endocrinology**. 73, 85–91, 1989.

61. MIKICH, S.B.; BÉRNILS, R. S. **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná**. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, 2004, 763p.
62. MMA. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**. 2003. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008034002.pdf>. Acesso em: 13 mai 2012.
63. MOLION, L. C. B. Climatologia dinâmica da região Amazônica: mecanismos de precipitação. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.2, p.107-117. 1987.
64. MÖSTL, E.; NÖBAUER, H.; CHOI, H. S.; WURM, W.; BAMBERG, E. Trächtigkeitsdiagnose bei der Stute mittels Östrogenbestimmung im Kot. **Prakt. Tierarzt**, 64: 491–492, 1983.
65. MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, Y.; NOMURA, M.; IGARASHI, M.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 81, 3874-3878, 1984.
66. MURTON, R. K., WESTWOOD, N. J. Integration of gonadotropin and steroids secretion, spermatogenesis and behavior in the reproductive cycle of male pigeon. In: **Neural and Endocrine Aspects of Behavior in Birds**, Elsevir, Amsterdan. 1975, p-51-89.
67. PALME, R. Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York Academy of Sciences. doi: 10.1196/annals.1343.007. 1046: 75–80, 2005.
68. PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MÖSTL, E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism,

excretion and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals New York Academy of Sciences**, v.1046, p.24-30, 2005.

69. PEREIRA, R. J. G. **Acompanhamento endócrino e comportamental da atividade reprodutiva anual de machos de falcões qui-qui (Falco sparverius) de vida livre**. 2008. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 2008.
70. PETER, A.T.; KASPUTIN, N.; CRISTER, J. K. Analysis of sex steroid metabolites excreted in feces and urine of nondomesticated animals. **The Compendium**, v.18, n.7, p.781-791, 1996.
71. POLEGATO, B. F. **Validação de método endócrino não-invasivo para monitoramento de fisiologia reprodutiva e de atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais**. 2004. 43 f. Monografia (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
72. POLLOCK, C. G.; OROSZ, S. E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 5, n. 3, p. 441-474, 2002.
73. PROUDMAN, J. A. Reprodução da Fêmea – Reprodução em Aves: Macho e Fêmeas. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. Barueri: Editora Manole, 2004. p. 242-256.
74. ROMERO, L. M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in Ecology & Evolution**, 19:249–255, 2004.
75. ROMERO, L.M. and REMAGE-HEALEY, L. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): corticosterone. **General and Comparative Endocrinology**. 119: 52–59, 2000.

76. SAITO, N.; SHIMADA, K.; NOMURA, N.; OGURI, K.; SATO, K.; WADA, M.;
Seasonal changes in the reproductive functions of Java Sparrows (*Padda oryzivora*).
Comparative Biochemistry and Physiology. 101A, 459–463, 1992.
77. SALVANTE, K. G. and WILLIAMS, T. D. Effects of corticosterone on the
proportion of breeding females, reproductive output and yolk precursor levels.
General and Comparative Endocrinology, 130: 205-214. 2003.
78. SÃO PAULO. **Fauna ameaçada no estado de São Paulo**. São Paulo, Secretaria do
Meio Ambiente, Documentos Ambientais, Série Probio, 1998, 56p.
79. SCHALLY, A. V.; ARIMURA, A.; BAKER, Y. Isolation and properties of the FSH
and LH-releasing hormone. **Biochemical and Biophysical Research
Communications**. 43, 393-399, 1971.
80. SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R. Faecal steroid analysis for
non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals.
Animal Reproduction Science, v.42, p.515-526, 1996.
81. SHARP, P. J.; SREEKUMAR, K. P. Photoperiodic control of prolactin secretion. In.
DAWSON, A. and CHATURVEDI C. M (Eds), **Avian Endocrinology**. New Delhi,
India: Narosa, 2001, pp 245-255.
82. SHIELDS, K. M.; YAMAMOTO, J. T.; MILLAM, J. R. Reproductive behaviour and
LH levels of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) associated with photostimulation,
nest-box presentation, and degree of mate access. **Hormones and Behavior**. 23, 68–
82, 1989.

83. SICK, H. Ordem Psitaciforme. In: *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p. 351-382. 1997.
84. SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 862p. 1997.
85. STALEY, A. M.; BLANCO, J. M.; DUFTY, A. M.; WILDT, D. E.; MONFORT, S. L. Fecal steroid monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden eagle and peregrine falcon. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 177, n. 6, p. 609-622, 2007.
86. TEMPEL, D. J.; GUTIÉRREZ, R. J. Factors Related to Fecal Corticosterone Levels in California Spotted Owls: Implications for Assessing Chronic Stress. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 538-547, 2004.
87. UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. Neuroendocrine control of reproduction in birds. In: NORRIS, D. O. and LOPEZ, K. H. (Eds). **Hormones and Reproduction of Vertebrates: Birds**, 2011, p.1-25.
88. WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKET, C. M.; BECHERT, U.; MILLSAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v.120, p.260-275, 2000.
89. WASSER, S. K. and HUNT, K. E. Noninvasive Measures of Reproductive Function and Disturbance in the Barred Owl, Great Horned Owl, and Northern Spotted Owl. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. Bird Hormones and Bird Migrations: Analyzing Hormones in Droppings and Egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration, p. 109-137, 2005.

90. WASSER, S. K.; VELLOSO, A. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **Journal of Wildlife Management**, 59, n. 4, p. 889-894, 1995.
91. WILDT, D. E.; MONFORT, S. L.; DONOUGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology - or, how to make an endangered species embryo. **Theriogenology** 37:161-184. 1992.
92. WILSON, F. E. Neither retinal nor pineal photoreceptors mediate photoperiodic control of seasonal reproduction in American tree sparrows (*Spizella arborea*). **Journal of Experimental Zoology**. 259, 117-127, 1991.
93. VLECK, C.M. Hormones, reproduction, and behavior in birds of the Sonoran desert. In: SHARP, P.J. (Ed.), **Avian Endocrinology**. Society for Endocrinology, Bristol, 1993, pp. 73-86.