RODRIGO DE SOUZA AMARAL

Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia

(*Trichechus inunguis*) em cativeiro:

Ciclicidade ovariana e padrões hormonais em machos e fêmeas
em dois trimestres diferentes do ano

São Paulo

2012

RODRIGO DE SOUZA AMARAL

**Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia
(*Trichechus inunguis*) em cativeiro:**

Ciclicidade ovariana e padrões hormonais em machos e fêmeas
em dois trimestres diferentes do ano

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

Co-orientador:

Dr. Fernando Cesar Weber Rosas

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2575
FMVZ

Amaral, Rodrigo de Souza

Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) em cativeiro: Ciclicidade ovariana e padrões hormonais em machos e fêmeas em dois trimestres diferentes do ano / Rodrigo de Souza Amaral. -- 2012.
109 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.
Co-orientador: Dr. Fernando Cesar Weber Rosas.

1. Hormônios. 2. Ciclo estral. 3. Sazonalidade. 4. Reprodução. 5. Sirênio.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) em cativeiro", protocolado sob o nº1434/2008, utilizando 08 (oito) peixes-boi, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Reproductive physiology of captive Amazonian manatee (*Trichechis inunguis*)", utilizing 08 (eight) manatee, protocol number 1434/2008, under the responsibility Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16610-2	Data da Emissão: 06/01/2010 15:19
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA	CPF: 041.973.678-64
Título do Projeto: Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (Trichechus inunguis) em cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta do material biológico (saliva e urina)	03/2009	07/2009
2	coleta do material biológico (saliva e urina)	09/2009	12/2009
3	coleta do material biológico (saliva e urina)	03/2010	07/2010
4	coleta do material biológico (saliva e urina)	09/2010	12/2010
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	FERNANDO CÉSAR WEBER ROSAS	Colaborador	310.774.980-04	3003259185 SSP-RS	Brasileira
2	VERA MARIA FERREIRA DA SILVA	Colaborador	161.377.362-53	236856 SSP-INI-DF	Brasileira
3	Priscila Viau Furtado	Colaborador	666.135.074-15	37831381-2 SSP-SP	Brasileira
4	Rodrigo de Souza Amaral	Executor	702.356.601-59	1776439 SSP-DF	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MANAUS	AM	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - LMA/INPA	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Trichechus inunguis

Material e métodos

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 74235832

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16610-2	Data da Emissão: 06/01/2010 15:19
------------------------	--

Dados do titular

Nome: CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA	CPF: 041.973.678-64
Título do Projeto: Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (Trichechus inunguis) em cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

1	Amostras biológicas (Mamíferos Aquáticos: cetáceos, sirênios e pinípedes)	Urina
---	---	-------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	laboratório de pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 74235832

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16610-2	Data da Emissão: 06/01/2010 15:19
Dados do titular	
Nome: CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA	CPF: 041.973.678-64
Título do Projeto: Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (Trichechus inunguis) em cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 74235832

FOLHA AVALIAÇÃO

Nome: AMARAL, Rodrigo de Souza

Título: Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) em cativeiro: ciclicidade ovariana e padrões hormonais em machos e fêmeas em dois trimestres diferentes do ano.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____
Instituição: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____

DEDICATÓRIA

*Às negonas Boo, Cambá, Tukano e Cunhãtaí e
aos negões Tupy, Yanomama, Guarany e Erê.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, meu orientador, pela amizade e pelos seis anos de aprendizado;

Ao **Dr. Fernando C. W. Rosas**, meu co-orientador, pela amizade, conversas e cafés da tarde da cafeteira de inox;

À **Dra. Vera M. F. da Silva**, pela amizade, apoio e confiança permitindo a realização deste trabalho;

À toda equipe da **PREVET**, pela ajuda no manejo dos animais;

À amiga **Dra. Priscila Viau**, por todos os ensinamentos passados e pela força nas dosagens hormonais;

À **Dra. Laura H. Graham**, por abrir seu laboratório para mim e se dispor a me ensinar os “segredos” da dosagem de LH;

Ao amigo **Dr. Marcílio Nichi**, pela amizade e pela grande ajuda nos dilemas estatísticos deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Marcelo A. B. V. Guimarães**, por ceder o anticorpo para estradiol para uso neste trabalho e por permitir o uso do liofilizador;

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de doutorado;

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de doutorado nos primeiros meses da pós-graduação;

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro para a realização do projeto;

À **Associação Amigos do Peixe-boi – AMPA**, pelo auxílio financeiro de parte deste projeto;

À **Labtest Diagnostica S.A.**, pelo fornecimento dos conjuntos comerciais para dosagem de creatinina;

À **Fundação Amaral**, por sempre financiar meus projetos;

Aos **Profs. Dr. Marcelo A. B. V. Guimarães e Dra. Gisele Akemi Oda**, pelos grandiosos conselhos dados durante o exame de qualificação, os quais melhoraram muito este trabalho;

A todos os **pós-graduandos e funcionários do LMA/INPA, e funcionários da AMPA**, além dos estagiários e voluntários que passaram pelos tanques dos peixes-bois (especialmente **Felipe Simões, Lucas Campi, Júlia Lee e Natsumi Fernside**), por terem feito as épocas de coleta mais divertidas;

Aos **meus familiares de Manaus**, por todo apoio logístico nas minhas temporadas manauaras;

A **todos do LDH**, pós-graduandos e estagiários, por todas as discussões científicas, conversas e risadas;

Aos **agregados e visitantes constantes do LDH**, por tornarem o local de trabalho mais descontraído;

A todos os **professores do VRA**, pela amizade e pelos conhecimentos passados;

Aos **funcionários do VRA**, por me ajudarem quando foi preciso, sempre com boa vontade e um sorriso no rosto;

Aos **pós-graduandos do VRA**, grandes amigos, pelas conversas no corredor e principalmente pelos churrascos;

Ao “**núcleo candango da novela**”, por fazerem me sentir em Brasília mesmo estando em São Paulo, especialmente a **Larissa**, que teve que me aturar “morando no quarto ao lado”;

Aos **FF**, por serem os FF...;

Aos **grandes amigos “sirenólogos”**. Torcida mútua!;

A todos os meus **grandes amigos espalhados pelo mundo**, que se mostram muito mais que “simples amigos”, me dando todo o apoio necessário e sempre se esforçam para manter contato;

Aos **meus pais e minhas irmãs**, por sempre me apoiarem e permitirem que eu seguisse em busca dos meus sonhos;

Ao **Santo Expedito**, por ouvir as nossas súplicas;

Ao **São Josemaria Escrivá**, por resolver os problemas profissionais;

A **Deus**, sempre!

**“Se você está lendo esta lista de agradecimentos avidamente, é porque também tem o seu dedinho neste trabalho! Seja ouvindo um desabafo ou dando um pitaco no corredor. Saiba que seu nome foi lembrado implicitamente em algum tópico, mas para não ficar triste,
MUITO OBRIGADO PELA SUA AJUDA!”**

THE LIGHT
AT THE END
OF THE
THESIS.

CAN YOU
SEE IT?

RESUMO

AMARAL, R. S. **Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) em cativeiro: ciclicidade ovariana e padrões hormonais em machos e fêmeas em dois trimestres diferentes do ano.** [Reproductive physiology of captive Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): ovarian cyclicity and hormonal patterns in males and females during two different trimesters of the year]. 2012. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os objetivos deste estudo foram determinar os níveis hormonais urinários e salivares durante o ciclo estral em peixes-bois da Amazônia, e verificar a existência de variação nos padrões dos hormônios reprodutivos presentes na saliva e na urina durante dois trimestres diferentes do ano. Foram utilizados 7 animais (4 machos e 3 fêmeas) adultos, alojados no LMA/INPA. As coletas ocorreram durante dois anos em dois trimestres diferentes do ano (Trimestre I e Trimestre II), onde, durante 12 semanas de cada trimestre foram colhidas amostras de saliva dos machos e urina e saliva das fêmeas. A testosterona salivar nos machos foi dosada por radioimunoensaio usando conjunto diagnóstico comercial. Os estrógenos, progestinas e LH urinários e progesterona e estradiol salivares nas fêmeas foram dosados por enzaimunoensaio. O ciclo estral foi estimado em $39,67 \pm 1,15$ dias e $44 \pm 2,00$ dias para as matrizes urinária e salivar, respectivamente, com a presença peculiar de dois picos de estrógenos concomitantes com picos de LH urinário antes da elevação das progestinas, característica anteriormente observada somente para elefantes. Nos machos, a testosterona salivar apresentou um pico no final do Trimestre II ($35,91 \pm 5,64$ pg/mL; $P < 0,05$), sugerindo uma antecipação dos machos de *T. inunguis* à época reprodutiva das fêmeas. Para as fêmeas, os esteroides urinários e salivares e o LH urinário apresentaram valores significativamente maiores na maioria dos meses do Trimestre I quando comparado ao Trimestre II ($P < 0,05$), e as fêmeas, em grande parte, apresentaram padrão hormonal cíclico no Trimestre I e padrão acíclico no Trimestre II, sugerindo, assim, a existência de sazonalidade reprodutiva na espécie mesmo em condições de cativeiro. Desta forma, foi possível concluir que as características peculiares do ciclo estral do peixe-boi da Amazônia podem ter importância biológica na estratégia reprodutiva da espécie, como ocorrem

em elefantes; que aparentemente *T. inunguis* apresenta sazonalidade reprodutiva, e esta seria sincronizada por outro fator ambiental que não a disponibilidade de alimento; e que é possível utilizar tanto a matriz urinária quanto a salivar no monitoramento endócrino-reprodutivo de peixe-boi da Amazônia, sendo ferramentas importantes para estudos da biologia reprodutiva da espécie.

Palavras-chave: Hormônios. Ciclo estral. Sazonalidade. Reprodução. Sirênio.

ABSTRACT

AMARAL, R. S. **Reproductive physiology of captive Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): ovarian cyclicity and hormonal patterns in males and females during two different trimesters of the year.** [Fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) em cativeiro: ciclicidade ovariana e padrões hormonais em machos e fêmeas em dois trimestres diferentes do ano]. 2012. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The aims of this study were to define urinary and salivary hormone levels during estrous cycle in Amazonian manatees; and to verify the existence of differences on urinary and salivary reproductive hormones during two different trimesters of the year. Seven adult animals (4 males and 3 females), kept at LMA/INPA were analyzed. Salivary samples from males and urinary and salivary samples from females were collected during 12 weeks in two different trimesters, during two consecutive years. Salivary testosterone from males was measured by radioimmunoassay kit. Urinary estrogens progestins and LH and salivary estradiol and progesterone from females were measured by enzyme immunoassay. The estrous cycle showed duration of 39.67 ± 1.15 days and 44.00 ± 2.00 days for urinary and salivary matrices, respectively, and showed two estrogens peaks accompanied by peaks of urinary LH before the rise of progestins. This hormonal pattern was previously reported only in elephants. The males showed a salivary testosterone peak at the end of Trimester II (35.91 ± 5.64 pg/ml; $P < 0.05$), this fact suggest a male anticipation to the female reproductive season. The females showed high values of urinary and salivary steroids and urinary LH during most of months of the Trimester I when compared with the Trimester II ($P < 0.05$), and the females usually showed hormonal cyclic pattern during Trimester I and acyclic pattern during Trimester II, suggesting the existence of reproductive seasonality even in captive conditions. Therefore, I conclude that the peculiar characteristics of Amazonian manatee's estrous cycle may have biological importance for mating strategies, as in elephants; *T. inunguis* apparently shows reproductive seasonality, and it is not synchronized by food availability; it is possible to use as saliva as urine to monitor the reproductive

physiology of Amazonian manatee, being important tools in studies about reproductive biology for this species.

Key words: Hormones. Estrous cycle. Seasonality. Reproduction. Sirenian.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).....	28
Figura 2 –	Tanques dos peixes-bois da Amazônia no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMA/INPA.....	44
Figura 3 –	Média da variação mensal da duração da fotofase e precipitação pluviométrica na cidade de Manaus – AM, e nível d'água do rio Amazonas na Amazônia Central, durante os anos de 2009 e 2010.	46
Figura 4 –	Colheita de saliva em peixe-boi da Amazônia macho com o auxílio de uma colher de metal.....	48
Figura 5 –	Recipiente de metal (seta amarela) disposto sob a abertura genital de uma fêmea de peixe-boi da Amazônia para a colheita de urina..	48
Figura 6 –	Esquema utilizado na classificação das amostras coletadas em grupos para a análise estatística da variação do padrão hormonal..	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Valores médios das progestinas e estrógenos urinários durante o ciclo estral em dois peixes-bois da Amazônia (três ciclos completos e seis ciclos incompletos).....	60
Gráfico 2 –	Valores médios de progestinas e estrógenos urinários durante o ciclo estral em dois peixes-bois da Amazônia (3 ciclos completos e seis ciclos incompletos), e box plot dos valores de LH urinário durante os ciclos estrais observados.....	61
Gráfico 3 –	Valores médios de LH e estrógenos urinários durante a ocorrência de três picos de LH observados em ciclos estrais de dois peixes-bois da Amazônia.....	62
Gráfico 4 –	Valores médios de progesterona e estradiol salivares durante o ciclo estral em dois peixes-bois da Amazônia (três ciclos completos e seis ciclos incompletos).....	63

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 –	Características dos peixes-bois da Amazônia utilizados neste estudo.....	44
Tabela 1 –	Duração do ciclo estral e de suas fases, e níveis hormonais urinários durante os padrões cíclico e acíclico em três peixes-bois da Amazônia.....	59
Tabela 2 –	Duração do ciclo estral e de suas fases, e níveis hormonais salivares durante os padrões cíclico e acíclico em três peixes-bois da Amazônia.....	64
Tabela 3 –	Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de testosterona salivar de quatro peixes-bois da Amazônia machos.....	65
Tabela 4 –	Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de testosterona salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de quatro peixes-bois da Amazônia machos.....	66
Tabela 5 –	Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de progestinas urinárias de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	66
Tabela 6 –	Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progestinas urinárias (mediana $\pm$ desvio quartílico) de dois peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2009.....	67
Tabela 7 –	Efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progestinas urinárias (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2010.....	67
Tabela 8 –	Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de estrógenos urinários de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	68
Tabela 9 –	Efeito do Ano de coleta sobre os níveis de estrógenos urinários (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	68
Tabela 10 –	Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de estrógenos urinários (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	69

Tabela 11 –	Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de LH urinário de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	70
Tabela 12 –	Efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de LH urinário (mediana $\pm$ desvio quartílico) de dois peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2009.....	70
Tabela 13 –	Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de LH urinário (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2010.....	71
Tabela 14 –	Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de progesterona salivar de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	71
Tabela 15 –	Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progesterona salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de dois peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2009.....	72
Tabela 16 –	Efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progesterona salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2010.....	72
Tabela 17 –	Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de estradiol salivar de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	73
Tabela 18 –	Efeito do Trimestre em cada Ano de coleta e efeito do Ano em cada Trimestre de coleta sobre os níveis de estradiol salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	73
Tabela 19 –	Correlação entre hormônios urinários e salivares em peixes-bois da Amazônia fêmeas.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
ANA	Agência Nacional de Águas
°C	graus Celsius
CPTEC/INPE	Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos / Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
Cr	creatinina
EIE	enzimaimunoensaio
g	grama
GLM	General Linear Models (Modelos Lineares Gerais)
hs	horas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina – tipo 1
kg	quilograma
L	litro
LDH – VRA – FMVZ / USP	Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
LH	hormônio luteinizante
LMA/INPA	Laboratório de Mamíferos Aquáticos / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LSD	Least Square Difference (Diferença dos Mínimos Quadrados)
M	molar
m	metro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
µL	microlitro

N	valor amostral
ng	nanograma
nm	nanômetro
P	valor de probabilidade
pg	picograma
RIE	radioimunoensaio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1	O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA.....	28
2.2	CICLO ESTRAL EM SIRÊNIOS.....	29
2.3	SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM MAMÍFEROS.....	30
<u>2.3.1</u>	<u>Sazonalidade reprodutiva em sirênios.....</u>	<u>32</u>
2.4	USO DE MATRIZES ALTERNATIVAS NOS ESTUDOS ENDÓCRINO-REPRODUTIVOS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS.....	36
3	OBJETIVOS.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	ANIMAIS.....	43
4.2	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	45
4.3	ANÁLISE HORMONAL.....	49
<u>4.3.1</u>	<u>Machos.....</u>	<u>49</u>
<u>4.3.2</u>	<u>Fêmeas.....</u>	<u>50</u>
4.3.2.1	Progestinas urinárias e progesterona salivar.....	50
4.3.2.2	Estrógenos urinários.....	51
4.3.2.3	Estradiol salivar.....	52
4.3.2.4	LH urinário.....	53
4.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	54
5	RESULTADOS.....	58
5.1	CICLO ESTRAL.....	58
5.2	VARIAÇÃO NO PADRÃO HORMONAL.....	65
<u>5.2.1</u>	<u>Testosterona salivar.....</u>	<u>65</u>
<u>5.2.2</u>	<u>Progestinas urinárias.....</u>	<u>66</u>
<u>5.2.3</u>	<u>Estrógenos urinários.....</u>	<u>68</u>
<u>5.2.4</u>	<u>LH urinário.....</u>	<u>69</u>
<u>5.2.5</u>	<u>Progesterona salivar.....</u>	<u>71</u>
<u>5.2.6</u>	<u>Estradiol salivar.....</u>	<u>73</u>
5.3	CORRELAÇÃO ENTRE MATRIZES URINÁRIA E SALIVAR.....	74
6	DISCUSSÃO.....	76
6.1	CICLO ESTRAL.....	76

6.2	VARIAÇÃO NO PADRÃO HORMONAL.....	80
6.3	CORRELAÇÃO ENTRE AS MATRIZES URINÁRIA E SALIVAR.....	85
7	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	90

I N T R O D U Ç Ã O

1 INTRODUÇÃO

O peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, MAMMALIA: SIRENIA) é o maior mamífero aquático da bacia Amazônica, sendo o único estritamente herbívoro. No passado, a espécie foi caçada em larga escala para o comércio de seu couro e sua carne, tornando-se uma espécie protegida por lei a partir de 1967 (DOMNING, 1982; ROSAS, 1994). Entretanto, a caça de subsistência e o comércio ilegal de sua carne ainda persistem, mantendo a ameaça de extinção da espécie (ROSAS; PIMENTEL, 2001).

Vários trabalhos sobre os aspectos reprodutivos do peixe-boi da Amazônia têm sido realizados nas últimas décadas (BEST, 1982; PIMENTEL, 1998; NASCIMENTO et al., 2002; NASCIMENTO, 2004; RODRIGUES et al., 2008; AMARAL et al., 2009; AMARAL et al., 2010), porém, ainda existem muitas lacunas básicas a serem preenchidas, como por exemplo, a fisiologia e a duração do ciclo estral, a existência ou não de sazonalidade reprodutiva, e a idade de maturidade sexual.

Trabalhos sobre endocrinologia reprodutiva em animais domésticos normalmente são realizados com amostras sanguíneas. Porém, como alternativa na coleta de sangue, o uso de diferentes matrizes, como fezes, urina ou saliva, tem se mostrado como uma excelente ferramenta no monitoramento endócrino-reprodutivo de animais selvagens, minimizando o estresse causado pela captura e contenção, e possibilitando um acompanhamento endócrino longitudinal destes animais (GUIMARÃES, 2003; AMARAL et al., 2009).

Deste modo, tendo em vista os conhecimentos já existentes sobre a biologia reprodutiva da espécie, observa-se a necessidade de estudos para o levantamento de informações básicas e claras sobre sua fisiologia reprodutiva, facilitando assim, futuros manejos reprodutivos dos animais em cativeiro e uma maior compreensão sobre os aspectos ecológicos da espécie em vida-livre.

R
E
V
I
S
Ã
O

D
A

L
I
T
E
R
A
T
U
R
A

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura foi dividida em quatro grandes tópicos, sendo eles, 1 – o peixe-boi da Amazônia, 2 – ciclo estral em sirênios, 3 – sazonalidade reprodutiva em mamíferos, e 4 – uso de matrizes alternativas nos estudos endócrino-reprodutivos em mamíferos aquáticos.

2.1 O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA

O peixe-boi da Amazônia (Figura 1) é endêmico da Bacia Amazônica, se distribuindo desde os rios da Colômbia, Peru e Equador até a ilha de Marajó no estado do Pará, sendo o único sirênio exclusivamente de água doce (BEST, 1984; ROSAS, 1994). É o menor membro da família Trichechidae, medindo até 2,75 metros de comprimento e pesando no máximo 420kg (AMARAL; DA SILVA; ROSAS, 2010). Historicamente caçada em larga escala, a espécie encontra-se hoje ameaçada de extinção, sendo classificada como uma espécie “Vulnerável” (DA SILVA; ROSAS; CANTANHEDE, 2008; IUCN, 2011).

Figura 1 – Peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

O peixe-boi da Amazônia é um herbívoro não ruminante que alimenta-se principalmente de plantas aquáticas e semiaquáticas (BEST, 1981; GUTERRES PAZIN, 2010). Devido ao seu baixo metabolismo e seus hábitos alimentares, a espécie apresenta um longo tempo de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal (5 a 7 dias), possibilitando uma maior absorção dos nutrientes (GALLIVAN; BEST, 1980; BEST, 1981; GALLIVAN; BEST, 1986; ITAVO; ROSAS; CAVALLANTE, 1996).

T. inunguis não apresenta dimorfismo sexual no tamanho corporal, porém os machos e fêmeas podem ser externamente diferenciados pelo posicionamento da abertura genital, a qual nos machos encontra-se mais próxima da cicatriz umbilical e nas fêmeas mais próxima ao ânus (MARMONTEL; ODELL; REYNOLDS III, 1992). A gestação dura entre 11 e 12 meses (NASCIMENTO et al., 2002), sendo que em cada gestação nasce somente um filhote (BEST, 1984). A idade de maturidade sexual é desconhecida, mas estima-se que seja entre seis e dez anos com base em observações anatômicas feitas por Rodrigues et al. (2008) e em estimativas a partir de informações sobre o peixe-boi da Flórida (*Trichechus manatus latirostris*) (MARMONTEL; ODELL; REYNOLDS III, 1992; ROSAS, 1994).

2.2 O CICLO ESTRAL EM SIRÊNIOS

Os sirênios apresentam uma característica reprodutiva muito peculiar, que é a formação de múltiplos corpos lúteos (CLs) acessórios durante o ciclo estral e gestação (3 – 60 CLs). Este fato já observado no dugongo (*Dugong dugon*) e no peixe-boi da Flórida (MARSH; HEINSOHN; CHANNELLS, 1984; MARMONTEL, 1988, 1995; TRIPP, 2008), sendo também sugerido para *T. inunguis* por Rodrigues et al. (2008) após estudos anatômicos na espécie. Por esse motivo, apesar de serem uníparos, gerando um filhote em cada gestação, os sirênios têm sido caracterizados como poliétricos poliovuclares. De acordo com Marsh, Heinsohn e Channells (1984); Marmontel (1995); Rodrigues et al. (2008) e Tripp (2008), estas espécies acumulariam CLs, a partir de sucessivos ciclos estéreis, até atingir os níveis mínimos de progesterona capaz de manter uma possível gestação, ocorrendo, neste momento, a ovulação.

Alguns estudos foram desenvolvidos em sirênios para a determinação da duração do ciclo estral através do monitoramento de metabólitos de esteroides sexuais (LARKIN, 2000; WAKAI et al., 2002; HORIKOSHI, 2004; NASCIMENTO, 2004), entretanto, em nenhum desses trabalhos é abordada a existência de ciclos estéreis. Além do que, não há relatos de dosagem de outros hormônios, como hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), para a caracterização do ciclo estral em sirênios.

Wakai et al. (2002) definiram, baseados no intervalo entre os picos de progestinas urinárias, a duração média do ciclo estral para dugongos em $56 \pm 8,6$ dias. Já para o peixe-boi da Flórida, Larkin (2000) observou ciclos estrais variando entre 27 e 42 dias ao mensurar o intervalo entre picos de estrógenos fecais sucedidos por picos de progestinas fecais. Já Horikoshi (2004) estimou o ciclo estral médio para *T. m. latirostris* em $24 \pm 5,4$ dias (amplitude de 16 – 32 dias), utilizando como base dos cálculos o intervalo de tempo entre o pico de estrógenos fecais imediatamente anterior ao pico de progestinas fecais e a queda das progestinas fecais aos níveis basais. Em peixe-boi da Amazônia, Nascimento (2004) também encontrou variação na duração do ciclo estral, com animais apresentando ciclo médios de $20 \pm 2,8$ dias até $27 \pm 8,2$ dias, ao considerar o intervalo entre picos de estrógenos fecais como padrão no cálculo do ciclo estral.

As variações observadas por esses autores com relação à duração do ciclo estral podem ser variações fisiológicas das espécies em questão, ou estarem relacionadas com as frequências das coletas de amostras realizadas (uma a cinco vezes por semana, dependendo do autor), ou com a metodologia aplicada para definição do início e fim do ciclo estral.

2.3 SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM MAMÍFEROS

A sazonalidade reprodutiva é um mecanismo adaptativo de algumas espécies para restringir a atividade reprodutiva para uma época do ano onde os estágios reprodutivos de maior desafio energético e nutricional (final de gestação, nascimento, lactação e desmame do filhote) coincidam com os picos anuais de disponibilidade de alimento, condições mais propícias para a manutenção da mãe e

para a sobrevivência do neonato (GERLACH; AURICH, 2000; ALLEN; ULLREY, 2004; MALPAUX, 2006).

Desta forma, essas espécies alternarão entre fases distintas de atividade reprodutiva e quiescência. A fase de atividade reprodutiva pode ocorrer em diferentes épocas do ano, dependendo em grande parte de onde a espécie em questão vive, o que come, e quando suas fontes alimentares estão em maior disponibilidade, variando de espécie para espécie e até mesmo dentro da mesma espécie dependendo da região que habita (WICKINGS; NIESCHLAG, 1980; KRASNOW; STEINER, 2006).

Como efeito da sazonalidade, as espécies apresentam variação na frequência de ovulação (presença ou ausência de ovulação), na espermatogênese (redução ou interrupção na produção espermática), na qualidade dos gametas (variação nas taxas de fertilização e sobrevivência de embriões), na secreção hormonal (redução na síntese de esteroides), e também no comportamento sexual (CHEMINEAU et al., 2008). Em algumas espécies, somente as fêmeas apresentam mudanças na atividade gonadal, em outras espécies, tanto o macho quanto a fêmea apresentam quiescência reprodutiva durante a época não-reprodutiva, embora muitas vezes com variação no grau e na duração da quiescência (KRASNOW; STEINER, 2006).

O fotoperíodo (ciclo claro-escuro) é o principal parâmetro ambiental sincronizador desse processo, onde o ciclo claro-escuro irá regular a secreção circadiana de melatonina produzida pela glândula pineal, e, posteriormente, este ritmo secretório de melatonina estimulará ou inibirá a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (GERLACH; AURICH, 2000; MALPAUX, 2006; CHEMINEAU et al., 2008). Entretanto, outros fatores, como a variação na disponibilidade de alimento, chuvas, temperatura, pressão de predação e na competição entre espécies, também podem atuar como sincronizadores do processo (WICKINGS; NIESCHLAG, 1980; HOLEKAMP et al., 1999; ALLEN; ULLREY, 2004; KRETZSCHMAR; GANSLOSSE; DEHNHARD, 2004; ANDERSON; NORDHEIM; BOESCH, 2006; MALPAUX, 2006; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; CHRISTENSEN et al., 2009).

A modulação da reprodução pelo alimento não se dá tão somente pela disponibilidade e escassez de alimento, mas também pelo valor nutricional da dieta, onde o teor calórico e a presença de alguns nutrientes específicos serão de grande importância para a atividade reprodutiva (HOLEKAMP et al., 1999; ALLEN; ULLREY, 2004; KRASNOW; STEINER, 2006).

Em alguns casos, o controle reprodutivo pela nutrição é mais atuante nas fêmeas, onde a demanda nutricional para a gestação e lactação é alta. Nestes casos, o nascimento de filhote em épocas com baixa disponibilidade de alimento diminuiria as chances de sua sobrevivência. Já para os machos, a espermatogênese apresentaria um gasto energético baixo, com isso, evolutivamente seria mais vantajoso manter a espermatogênese ativa (mesmo que seja com baixa produção de espermatozoides) para estar pronto antecipadamente à época reprodutiva da fêmea (KRASNOW; STEINER, 2006).

A redução da alimentação pode acarretar na diminuição da concentração dos hormônios esteroides gonadais e gonadotróficos, impedir a maturação folicular, desordenar e/ou interromper o ciclo estral, inibir o surgimento do pico de LH pré-ovulatório, diminuir o diâmetro dos túbulos seminíferos e a eficiência espermática, e diminuir a receptividade sexual (KRASNOW; STEINER, 2006; MARTIN et al., 2010).

Vários mecanismos podem atuar na modulação da reprodução pela nutrição, como os níveis séricos de leptina, insulina, colesterol, glicose, hormônios tireoidianos, hormônio de crescimento, IGF-I e glucocorticoides, os quais são diretamente afetados pela restrição alimentar, e estão intimamente relacionados com o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (KRASNOW; STEINER, 2006).

2.3.1 Sazonalidade reprodutiva em sirênios

Devido a baixa taxa metabólica que os sirênios apresentam, as espécies viventes desta Ordem habitam regiões tropicais e/ou equatoriais, locais de baixas variações de temperatura e fotoperíodo (BERTRAM; RICARDO BERTRAM, 1973; MARSH; SPAIN; HEINSOHN, 1978; GALLIVAN; BEST, 1980; BEST, 1981; IRVINE, 1983; ANDERSON, 2002). A maioria das espécies de sirênios não apresenta um perfil reprodutivo marcadamente sazonal (épocas alternadas de atividade reprodutiva e de quiescência). Porém, apresentam uma maior concentração de acasalamentos e partos em épocas específicas, mais propícias para a sobrevivência dos filhotes, e uma baixa ocorrência em épocas menos favoráveis. Alguns autores, com o intuito de categorizar este padrão fisiológico, o chamam de “sazonalidade

reprodutiva difusa” (HARTMAN, 1979; MARSH; HEINSOHN; MARSH, 1984; RATHBUN et al., 1995; ANDERSON, 2002).

Em dugongos, apesar de evitarem temperaturas abaixo de 30°C, a espécie está suscetível a variações anuais de temperatura de até 8°C. Com isso, os nascimentos de filhotes se concentram em grande parte na primavera, possibilitando ao filhote um tempo maior em águas mornas durante os primeiros meses de vida (MARSH; HEINSOHN; CHANNELLS, 1984; MARSH; HEINSOHN; MARSH, 1984; ANDERSON, 1997, 2002). O tempo de gestação entre 12 a 14 meses propicia que a ocorrência de receptividade reprodutiva das fêmeas e os nascimentos ocorram na mesma época do ano (MARSH; HEINSOHN; MARSH, 1984; ANDERSON, 2002). Entretanto, os dugongos machos são reprodutivamente ativos durante o ano todo (MARSH; HEINSOHN; GLOVER, 1984).

Segundo Marsh, Heinsohn e Marsh (1984), a precipitação pluviométrica na região da Austrália é fortemente sazonal, e o início das chuvas na primavera proporcionaria a lixiviação, aumentando, assim, o aporte nutricional das águas. Este fato acarreta em um aumento na quantidade de plantas aquáticas, as quais são consumidas pelos dugongos. Com isso, as fêmeas tenderiam a concentrar a atividade reprodutiva, e consequentemente o nascimento dos filhotes, na época de maior disponibilidade de alimento.

Os peixes-bois da Flórida de vida-livre apresentam uma ampla área de vida, se distribuindo nas zonas tropical e temperada norte. Desta forma, como a espécie não tolera temperaturas abaixo de 16°C, esta migra no inverno para as áreas tropicais, com águas mais mornas (DEUTSCH et al., 2003). Esta variação na temperatura da água tem sido relatada como o fator determinante para os picos reprodutivos em *T. m. latirostris*. Hernandez et al. (1995) relatam uma diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos e na presença de espermatozoides nos testículos e epidídimos de peixes-bois da Flórida de vida-livre durante o inverno quando comparado com as outras estações do ano. Rathbun et al. (1995) e Hartman (1979) relatam que os grupos reprodutivos (vários machos disputando uma fêmea) são mais frequentes na primavera, e consequentemente os nascimentos raramente ocorrem durante o inverno, sugerindo assim, a existência da sazonalidade reprodutiva difusa.

O padrão de sazonalidade difusa também é observado no peixe-boi das Antilhas (*T. m. manatus*). Apesar desta espécie habitar as zonas tropical e

equatorial, e haver registro de encalhes de filhotes recém-nascidos ao longo do ano, a grande maioria destes encalhes ocorrem nos meses mais quentes do ano (entre outubro e maio) (PARENTE; VERGARA-PARENTE; LIMA, 2004; MEIRELLES, 2008). Os nascimentos e acasalamentos já registrados na natureza também ocorreram na mesma época (LIMA et al., 2005b; MEIRELLES, 2008; CASTELBLANCO-MARTÍNEZ et al., 2009).

Já para o peixe-boi da Amazônia, a bacia Amazônica não apresenta grandes variações de luminosidade e temperatura durante o ano devido a proximidade com a linha do Equador. Com isso, os fatores mais marcantes da região são as variações anuais dos regimes de chuva e do nível dos rios amazônicos, sendo estes fatores, determinantes na maioria dos processos ecológicos da região (JUNK; BAYLEY; SPARKS, 1989). A produção de macrófitas aquáticas na região amazônica é intensamente afetada por essa variação do nível d'água, onde a maioria das plantas aquáticas cresce nas épocas de enchente e cheia dos rios, e, durante as épocas de vazante e seca, estas plantas secam, são levadas para o canal do rio, ou se modificam para uma forma terrestre (JUNK; HOWARD-WILLIAMS, 1984).

Desta forma, durante épocas de seca há uma modificação na alimentação dos peixes-bois da Amazônia, onde há relatos de mudança nas espécies de plantas consumidas, ingestão de material vegetal em decomposição no fundo do rio, e até momentos de jejum prolongado (BEST, 1983; GUTERRES PAZIN, 2010).

Com isso, a variação na produção de macrófitas é o fator indicado por Best (1982) como sincronizador da sazonalidade reprodutiva das fêmeas de peixe-boi da Amazônia de vida-livre. Segundo este autor, os nascimentos de filhotes ocorrem entre dezembro e julho (com o pico de dos nascimentos ocorrendo entre fevereiro e maio), coincidindo com as épocas de enchente e cheia dos rios (época de maior disponibilidade e qualidade de alimento). Desta forma, considerando o período de gestação de aproximadamente 11 meses (NASCIMENTO et al., 2002), a receptividade reprodutiva das fêmeas também ocorreria durante a enchente e cheia dos rios da bacia Amazônica. Sendo assim, entre os sirênios, aparentemente *T. inunguis* é a única espécie que realmente apresenta sazonalidade reprodutiva (BEST, 1982). Os nascimentos documentados por Timm, Albuja e Clauson (1986) nos meses de dezembro, janeiro e junho no Equador também corroboram com a existência de sazonalidade reprodutiva na espécie, como previamente já mencionado por Best (1982).

Do mesmo modo, tem sido observado o mesmo padrão reprodutivo em sirênios mantidos em cativeiro. Wakai et al. (2002) monitoraram durante dois anos os estrógenos e progestinas urinários de uma fêmea cativa de dugongo, e não observaram variação nos padrões hormonais ao longo do ano, sugerindo, desta forma, a inexistência de sazonalidade reprodutiva em dugongos cativos. Entretanto, o fato de ter sido observado em uma única fêmea não descarta a possibilidade de existência de um padrão sazonal difuso em dugongos em condições de cativeiro.

No peixe-boi da Flórida, Larkin, Gross e Reep (2005) e Larkin (2000) observaram uma grande flutuação durante o ano, com variação individual, nos esteroides fecais de exemplares desta espécie mantidos em cativeiro, sem haver um padrão claro de sazonalidade reprodutiva. Já Horikoshi (2004) observou valores maiores de progestinas fecais durante o inverno e verão quando comparado com a primavera, porém, sem variação estacional ao analisar estrógenos fecais, corroborando, assim, com a possibilidade de reprodução durante o ano todo observada em animais de vida-livre. Por outro lado, os 28 nascimentos de *T. m. latirostris* em cativeiro registrados por Odell et al. (1995) ocorreram entre fevereiro e novembro, não havendo nascimentos nos meses mais frios, sugerindo uma sazonalidade difusa nos nascimentos em cativeiro.

Para *T. m. manatus*, não há estudos sobre a fisiologia reprodutiva de animais mantidos em cativeiro, porém, os 13 nascimentos já registrados em cativeiro no Brasil (PICANÇO; ZANIOLO; SÁ, 1998; VERGARA et al., 2000; LUNA et al., 2010) apontam para um padrão sazonal, onde todos os nascimentos ocorreram nas épocas mais quentes do ano (novembro a abril).

No peixe-boi da Amazônia, Nascimento (2004) observou uma variação anual nos estrógenos fecais de fêmeas em cativeiro com valores significativamente mais altos entre os meses de março e agosto, sugerindo que estas também apresentam sazonalidade reprodutiva. Entretanto, o mesmo não foi observado pelo autor ao analisar as progestinas fecais.

Pimentel (1998) também sugere a existência de sazonalidade reprodutiva em machos cativos de peixe-boi da Amazônia, onde, apesar de não observar diferenças estatísticas nos andrógenos fecais entre as três épocas de coleta realizadas (agosto-setembro, outubro-dezembro, e abril-maio), foi observada uma correlação negativa moderada entre temperatura ambiente e níveis de andrógenos fecais (sendo valores de andrógenos fecais baixos na primeira época, valores altos na

segunda época, e valores médios na terceira). Os nascimentos já registrados para a espécie em cativeiro no Brasil também sugerem um padrão sazonal, onde todos os nascimentos (N=12) ocorreram entre final de dezembro e início de agosto (DA SILVA et al., 1999; ROSAS et al., 2001; CARTER et al., 2008; BUENO et al., 2010).

2.4 USO DE MATRIZES ALTERNATIVAS NOS ESTUDOS ENDÓCRINO-REPRODUTIVOS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS

O monitoramento de hormônios reprodutivos tem sido cada vez mais utilizado em pesquisas com mamíferos aquáticos, sendo uma ferramenta adicional para a compreensão dos aspectos biológicos da espécie estudada (AMARAL, 2010).

Em animais domésticos, as dosagens hormonais são normalmente realizadas em amostras de soro ou plasma sanguíneo. Entretanto, para mamíferos aquáticos, a coleta de sangue pode ser um evento estressante devido a necessidade de captura e/ou contenção dos animais, sendo impraticável em alguns animais de vida-livre (AMARAL, 2010). Apesar de animais de cativeiro poderem ser condicionados a colaborar com a colheita de sangue, a colheitas seriadas para estudos longitudinais aumentam o risco de flebite (FRANCIS-FLOYD et al., 1991; AMARAL, 2010).

Matrizes alternativas como saliva, urina e fezes, têm sido utilizadas com sucesso na dosagem de hormônios reprodutivos em várias espécies de animais domésticos, como cães (GUDERMUTH et al., 1998; WILLIAMS et al., 2000), gatos (BROWN et al., 1994; BROWN; TERIO; GRAHAM, 1996), equinos (SCHWARZENBERGER et al., 1996; PALME et al., 1998; YAMADA et al., 2008) e ruminantes (GAO; SHORT; FLETCHER, 1988; FARIA JR., 2006; FURTADO, 2007; CAPEZZUTO et al., 2008) e silvestres, como elefantes (WASSER et al., 1996; FIEB; HERMANN; HODGES, 1999), canídeos (MONFORT et al., 1997; DLONIAK et al., 2004), felinos (MOREIRA et al., 2001; MORATO et al., 2004; VIAU; FELIPPE; OLIVEIRA, 2005; GUIÃO-LEITE, 2006; BRAUN et al., 2009) e primatas (DIGIANO et al., 1992; LIMA, 2006; PIZZUTTO et al., 2008; KUTSUKAKE et al., 2009; KUGELMEIER et al., 2011) tanto em cativeiro quanto em vida-livre. Em mamíferos aquáticos, há relatos de trabalhos em várias espécies de cetáceos (WALKER et al., 1988; ATKINSON et al., 1999; HOGG; VICKERS; ROGERS, 2005; ROBECK et al.,

2005b; ROLLAND et al., 2005; BIANCANI et al., 2009; ROBECK et al., 2009; STEINMAN et al., 2012), sirênios (PIMENTEL, 1998; LARKIN, 2000; WAKAI et al., 2002; HORIKOSHI, 2004; NASCIMENTO, 2004; LANYON; SMITH; CARRICK, 2005; LARKIN; GROSS; REEP, 2005; AMARAL et al., 2009), pinípedes (PIETRASZEK; ATKINSON, 1994; THEODOROU; ATKINSON, 1998; HARMON, 2001; LITZ et al., 2005) e mustelídeos (GUILHERME; COLARES; PINHO, 2001; DA SILVA; LARSON, 2005; KALZ; JEWGENOW; FICKEL, 2006; BATEMAN et al., 2009) utilizando essas matrizes alternativas.

Os hormônios esteroides livres no sangue atravessam o epitélio salivar principalmente por difusão passiva e a concentração destes hormônios na saliva não depende da taxa de produção salivar. Entretanto, hormônios proteicos entram na saliva por ultrafiltração ou por contaminação da saliva por plasma ou fluido gengival, sendo altamente dependentes da taxa de produção salivar (VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983).

O metabolismo hormonal ocorre principalmente no fígado, mas alguma atividade catabólica também ocorre nos rins. Os hormônios metabolizados são excretados nas fezes, via líquido biliar, e na urina. Os hormônios proteicos, após a sua metabolização, são eliminados pelos rins devido às suas características estruturais (glicoproteínas) e baixo peso molecular (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; GRAHAM, 2004; SENGGER, 2005).

Os esteroides salivares são muito utilizados em trabalhos com humanos por apresentarem uma forte correlação com os níveis plasmáticos (CHOE; KHAN DAWOOD; DAWOOD, 1983; DABBS JR, 1993; DELFS et al., 1994; GANDARA; LERESCHE; MANCL, 2007; CELEC et al., 2009; GRÖSCHL, 2009), fato este também já confirmado para alguns mamíferos terrestres, como ovinos (FURTADO, 2007), bovinos (GAO; SHORT; FLETCHER, 1988), e primatas (DIGIANO et al., 1992; KUTSUKAKE et al., 2009). Já em mamíferos aquáticos, esta correlação somente foi testada para foca-monge-do-Havaí (*Monachus schauinslandi*) (PIETRASZEK; ATKINSON, 1994; THEODOROU; ATKINSON, 1998) e leão-marinho-de-Steller (*Eumetopias jubatus*) (HARMON, 2001). Entretanto, já foram realizados trabalhos utilizando essa matriz em peixe-boi da Amazônia (AMARAL et al., 2009), falsa-orca (*Pseudorca crassidens*) (ATKINSON et al., 1999) e golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (HOGG; VICKERS; ROGERS, 2005), com resultados positivos. Com relação ao peixe-boi da Amazônia, Amaral et al. (2009)

demonstraram que a matriz salivar é capaz de expressar as alterações que possam ocorrer nos níveis de testosterona sérica na espécie.

Os hormônios urinários também têm sido muito utilizados em mamíferos aquáticos, principalmente nos animais mantidos em cativeiro, pela facilidade de coleta e pela proximidade com o evento fisiológico (WALKER et al., 1988; ROBECK et al., 1993; WAKAI et al., 2002; ROBECK et al., 2004; ROBECK et al., 2005b; AMARAL et al., 2009; ROBECK et al., 2009; AMARAL, 2010; STEINMAN et al., 2012). Em sirênios, a matriz já foi utilizada na dosagem de andrógenos em peixe-boi da Amazônia (AMARAL et al., 2009) e de estrógenos e progestinas em dugongos (WAKAI et al., 2002) e em peixe-boi da Flórida (HORIKOSHI, 2004).

A dosagem de LH em amostra de urina tem sido muito utilizada como ferramenta no monitoramento reprodutivo de cetáceos em cativeiro em programas de reprodução assistida, possibilitando a determinação do momento exato da ovulação (ROBECK et al., 2004; ROBECK et al., 2005b; MURACO et al., 2009; ROBECK et al., 2009; ROBECK et al., 2010; STEINMAN et al., 2012). Entretanto, não há relatos de dosagem desse hormônio em matrizes alternativas para outros mamíferos aquáticos, como sirênios, pinípedes e mustelídeos.

De acordo com Amaral (2010), a escolha da matriz a ser utilizada deve levar em consideração o objetivo proposto, as facilidades de coleta e as etapas laboratoriais envolvidas. Desta forma, cada matriz apresenta suas vantagens e desvantagens. As amostras salivares mostram-se como uma excelente matriz na dosagem de esteroides em peixe-boi da Amazônia, já que são de fácil obtenção e não necessitam de extração hormonal, porém, dependendo da técnica de dosagem hormonal adotada, é necessário um grande volume de amostra (400-500µL) e adaptações no protocolo tradicional de dosagem para aumentar a sensibilidade do ensaio (AMARAL et al., 2009).

Por outro lado, é possível obter amostras de urina de peixe-boi da Amazônia em grande volume (10-100mL) (AMARAL et al., 2009; PANTOJA et al., 2010), possibilitando a análise de vários hormônios com uma única amostra. Outra vantagem da matriz urinária é a possibilidade de acessar hormônios proteicos, como o LH (SENGER, 2005). Entretanto, dependendo do protocolo de dosagem hormonal adotado, as amostras urinárias podem ser analisadas diretamente no ensaio ou são necessárias etapas extras para a disponibilização dos hormônios presentes (GRAHAM, 2004; AMARAL et al., 2009; AMARAL, 2010). Além disso, a necessidade

de uma manipulação maior dos animais para a obtenção das amostras (AMARAL et al., 2009; PANTOJA et al., 2010), no caso de animais não condicionados a colaborar com as coletas, deve ser um fator a ser considerado.

O método de dosagem hormonal também deve ser levado em consideração no momento da escolha da matriz. Conjuntos comerciais de radioimunoensaio (RIE), sendo a grande maioria desenvolvido para dosagem em soro humano, têm sido bastante utilizados em estudos com mamíferos aquáticos (AMARAL, 2010), onde já foi relatado a validação destes conjuntos comerciais para dosagem de andrógenos salivares e estrógenos e progestinas fecais em peixe-boi da Amazônia (NASCIMENTO, 2004; AMARAL et al., 2009). Entretanto, esses conjuntos comerciais são desenvolvidos para os principais hormônios (como testosterona, estradiol e progesterona) e apresentam baixa reação cruzada com seus metabólitos, além do que, são dispendiosos e produzem resíduos radioativos (GRAHAM, 2004; PALME et al., 2005; KEAY et al., 2006; FURTADO, 2007; AMARAL, 2010). Uma alternativa é a utilização de ensaios imunoenzimáticos, mais conhecidos como enzima imunoensaios (EIE), possibilitando a redução dos custos do ensaio e evitando a produção de resíduos radioativos (GRAHAM, 2004; PALME et al., 2005; KEAY et al., 2006).

Os principais metabólitos hormonais excretados podem variar de uma espécie para outra, com isso, a confecção de anticorpos específicos para cada principal metabólito excretado para cada espécie seria o ideal, entretanto, o custo-benefício de sua aplicação a torna inviável (GRAHAM, 2004; PALME et al., 2005; SCHWARZENBERGER, 2007). Desta forma, EIE usando anticorpos grupo-específico estão sendo cada vez mais utilizados, possibilitando o uso do mesmo anticorpo em dosagens hormonais de diferentes espécies (ROBECK et al., 2005b; KALZ; JEWGENOW; FICKEL, 2006; SCHWARZENBERGER, 2007; BATEMAN et al., 2009; KELLAR et al., 2009; ROBECK et al., 2009).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Determinar a duração do ciclo estral, bem como seu padrão hormonal, em fêmeas cativas de peixe-boi da Amazônia com base nos níveis hormonais urinários (estrógenos, progestinas e LH) e salivares (estradiol e progesterona).
- Verificar a existência de variação no padrão hormonal (testosterona salivar) de machos cativos de peixe-boi da Amazônia em dois trimestres diferentes do ano.
- Verificar a existência de variação nos padrões hormonais (estrógenos, progestinas e LH urinários, e progesterona e estradiol salivares) de fêmeas cativas de peixe-boi da Amazônia em dois trimestres diferentes do ano.
- Comparar a viabilidade do uso das matrizes urinária e salivar no monitoramento endócrino-reprodutivo de peixes-bois da Amazônia fêmeas.

M
A
T
E
R
I
A
L

E

M
É
T
O
D
O
S

4 MATERIAL E MÉTODOS

Toda a parte experimental deste trabalho foi realizada de acordo com os preceitos éticos na experimentação animal e sob as autorizações da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP (Protocolo nº 1434/2008) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (Licença nº 16610-2).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados sete peixes-bois da Amazônia adultos (quatro machos e três fêmeas) com idade superior a dez anos (Quadro 1), todos inicialmente alojados em três tanques circulares (10m de diâmetro e 2,5m de profundidade) conectados entre si por tanques de câmbio (3,5 X 2,5 X 1,5m), juntamente com outros peixes-bois no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMA/INPA, Manaus – AM (Figura 2). Cada tanque possui fonte de água e drenagem independente. A água é retirada de poços artesianos e sua temperatura varia entre 25 e 29°C.

Os animais foram alimentados com capim colônia (*Brachiaria mutica*) e macrófitas aquáticas na proporção de aproximadamente 40% da dieta, sendo os demais 60% complementados por verduras e legumes variados, perfazendo um total de alimentos não inferior a 8% do peso do animal por dia (BEST, 1981).

Quadro 1 – Características dos peixes-bois da Amazônia utilizados neste estudo. Informações obtidas no ano de 2009

Animal	Sexo	Tempo em cativeiro (anos)	Chegada ao cativeiro	Histórico reprodutivo em cativeiro
Ti-018	M	32	Juvenil	2 filhotes
Ti-020	M	31	< um ano de idade	2 filhotes
Ti-070	M	15	< um ano de idade	Nunca foi pai
Ti-082	M	11	Nascido em cativeiro	Nunca foi pai
Ti-057	F	25	Juvenil/adulto	1 filhote
Ti-060	F	25	Juvenil/adulto	1 filhote
Ti-071	F	14	< um ano de idade	Nunca emprenhou

Figura 2 – Tanques dos peixes-bois da Amazônia no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMA/INPA. T 1: Tanque circular 1 (exposição); T 2: Tanque circular 2; T 3: Tanque circular 3; C 1: Tanque de câmbio 1; C 2: Tanque de câmbio 2

4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As coletas foram realizadas em duas épocas diferentes do ano (Trimestre I – 15 de março a 15 de junho, Trimestre II – 1 de setembro a 30 de novembro), escolhidas com base nos dados obtidos por Nascimento (2004) e Pimentel (1998), durante dois anos consecutivos (2009 e 2010). Informações sobre as variáveis ambientais durante os dois anos amostrados foram obtidas junto aos órgãos governamentais competentes para a caracterização ambiental das épocas de coleta escolhidas, desta forma, o Trimestre I foi caracterizado como uma época de diminuição da precipitação pluviométrica, decréscimo da duração da fotofase e enchente e cheia do rio Amazonas na Amazônia Central, e o Trimestre II como uma época de aumento na duração da fotofase, aumento da precipitação pluviométrica e vazante e seca do rio Amazonas na Amazônia Central (Figura 3). Durante 12 semanas consecutivas em cada Trimestre de coleta, foram colhidas amostras de saliva dos machos e saliva e urina das fêmeas. Todo material foi coletado entre 07:30 e 09:00hs da manhã.

Figura 3 – Média da variação mensal da duração da fotofase e precipitação pluviométrica na cidade de Manaus – AM, e nível d'água do rio Amazonas na Amazônia Central, durante os anos de 2009 e 2010. Faixas cinzas: épocas de coletas adotadas neste estudo (Trimestre I e Trimestre II). Fonte dos dados brutos: CPTEC-INPE; ANA

Durante todas as épocas de coleta, os machos foram mantidos no Tanque circular 2, o qual era seco uma vez por semana para limpeza. As fêmeas foram colocadas nos Tanques de cambiamiento, os quais eram secos diariamente. Ao finalizar cada época de coleta, as fêmeas retornavam aos tanques circulares (ver Figura 2).

A fêmea Ti-060 foi mantida no Tanque de cambiamiento 1, junto com outros animais, com acesso diário ao Tanque circular 1 (de exposição). Já a fêmea Ti-057 foi mantida sozinha no Tanque de cambiamiento 2 durante as épocas de coleta do ano de 2009, porém, compartilhou o tanque com a fêmea Ti-071 durante as coletas do ano de 2010. Por motivos logísticos, a fêmea Ti-071 só participou do experimento durante o ano de 2010.

As colheitas de saliva foram realizadas utilizando uma colher de metal, raspando suavemente a mucosa oral (AMARAL et al., 2009) após a drenagem do tanque. Caso fosse observado que o material estava contaminado (fezes ou sangue), este era descartado. Foram colhidas amostra dos machos uma vez por semana, aproveitando a drenagem dos tanques para limpeza (Figura 4). No caso das fêmeas, foram realizadas colheitas diárias seguindo o mesmo procedimento. Todo material coletado foi congelado a -20°C até análise hormonal.

As amostras de urina foram colhidas diariamente, com o auxílio de um recipiente de metal colocado sob a abertura genital após a drenagem do tanque, conforme descrito por Pantoja et al. (2010) (Figura 5). Alguns minutos após a realização deste procedimento, normalmente a amostra de urina era obtida. Um limite máximo de aproximadamente 10 minutos foi estipulado para a obtenção da amostra, com isso, caso o animal não urinasse, ele era liberado da colheita do dia para minimizar o estresse. O material colhido foi separado em três alíquotas e armazenado a -20°C até a análise hormonal.

Figura 4 – Colheita de saliva em peixe-boi da Amazônia macho com o auxílio de uma colher de metal

Figura 5 – Recipiente de metal (seta amarela) disposto sob a abertura genital de uma fêmea de peixe-boi da Amazônia para a colheita de urina

4.3 ANÁLISE HORMONAL

Toda análise hormonal foi realizada no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LDH-VRA-FMVZ/USP), São Paulo – SP.

4.3.1 Machos

As amostras de saliva dos machos foram submetidas à técnica de RIE em fase sólida para testosterona total utilizando o conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens, Los Angeles, CA, EUA) desenvolvido para soro humano, porém, já previamente validado para a utilização de saliva de *T. inunguis* (AMARAL et al., 2009).

A dosagem da testosterona salivar foi realizada de acordo com o protocolo modificado descrito por Amaral et al. (2009), onde as amostras passaram por dois ciclos de descongelamento/congelamento para serem liquefeitas, centrifugadas e posteriormente submetidas à dosagem hormonal. Foram adicionados 200µL de amostra ou de calibrador nos tubos de polipropileno e incubados por 24hs em temperatura ambiente (20-22°C). Após isso, foi adicionado 1mL da testosterona radiomarcada e novamente incubado “overnight” em temperatura ambiente. O material foi decantado e a radioatividade dos tubos medida em contador gama por dois minutos. Os calibradores utilizados na construção da curva padrão foram diluídos 20 vezes em água destilada. Todo o ensaio foi realizado em duplicata.

Os coeficientes de variação intra e interensaio foram inferiores a 8,33%, e a dose mínima detectada foi 5,0 pg/mL.

4.3.2 Fêmeas

As amostras de urina e saliva das fêmeas foram dosadas por EIE para a quantificação de estrógenos, progestinas e LH urinários, e estradiol e progesterona salivares.

Para eliminar as variações no clearance renal e possível contaminação das amostras de urina com água, foi dosada a creatinina urinária (Cr) de uma alíquota de cada amostra colhida, utilizando o conjunto comercial para dosagem de Cr da empresa Labtest (ref-35, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.3.2.1 Progestinas urinárias e progesterona salivar

Para a dosagem de progestinas urinárias e progesterona salivar foi adotado o protocolo de EIE já descrito para outros mamíferos (MUNRO et al., 1991; GRAHAM et al., 2001; ROBECK et al., 2005b; FURTADO, 2007), utilizando o anticorpo CL425 (C. Munro, UC Davis, CA, EUA), com modificações.

Devido ao baixo volume de amostra de saliva obtida em cada colheita, apenas uma ou duas amostras por semana de cada animal foram selecionadas para dosagem de progesterona salivar. As amostras selecionadas passaram por dois ciclos de descongelamento/congelamento para serem liquefeitas, foram então centrifugadas e posteriormente concentradas, onde, 375µL de cada amostra foi liofilizado (Liofilizador L108, Liotop, São Carlos, SP, Brasil) e posteriormente ressuscitado em 125µL de solução tampão ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,421g/L; Na_2HPO_4 : 8,662g/L; NaCl: 8,7g/L; Albumina sérica bovina: 1,0g/L; pH 7,0). As amostras de urina foram utilizadas puras ou diluídas em solução tampão em 1:5.

Microplacas de poliestireno de 96 poços de alta adsorção (MaxiSorp, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram marcadas (50µl/poço) com o anticorpo diluído (1:8.000) em solução de marcação (Na_2CO_3 : 1,59g/L; NaHCO_3 : 2,93g/L; pH 9,6), seladas com adesivo de acetato, e incubadas a 4°C por 16hs. Após a incubação, as microplacas foram submetidas a um ciclo de três lavagens com solução de lavagem (NaCl: 87,66g/L; Tween-20: 0,5%).

Foi adicionado 25µL de solução tampão em cada poço e, posteriormente, 50µL de cada amostra (saliva ou urina), padrão da curva (0,1 – 10.000pg/mL), ou controle. Imediatamente após, foi adicionado 50µL de solução de progesterona conjugada com enzima (HRP: horseradish peroxidase; C. Munro, UC Davis, CA, EUA) diluída em solução tampão (1:160.000). As microplacas foram seladas e incubadas por 2hs em temperatura ambiente.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas, e posteriormente adicionado 100µL/poço de substrato cromógeno (Enhanced K-Blue Substrate – TMB, Neogen do Brasil, Indaiatuba, SP, Brasil). A reação cromógena foi parada com 100µL de solução STOP (H₂SO₄: 10%).

A densidade óptica de cada poço foi medida em uma leitora automática (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) utilizando o filtro de 450nm.

Todas as amostras, controles e padrões foram analisados em duplicata, e a sensibilidade do ensaio foi de 0,90pg/mL. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram <6,88% e <12,87%, respectivamente. Diluições seriadas de amostras de urina e saliva apresentaram curvas de padrão similar à curva padrão ($R^2 = 0,99$ e $R^2 = 0,90$, respectivamente).

O anticorpo utilizado apresenta as seguintes reações cruzadas com os metabólitos de progesterona (de acordo com Graham et al. (2001)): 100% progesterona (4-pregnen-3,20-diona), 188% 4-pregnen-3α-ol-20-ona, 172% 4-pregnen-3β-ol-20-ona, 147% 4-pregnen-11α-ol-3,20-diona, 94% 5α-pregnan-3β-ol-20-ona, 64% 5α-pregnan-3α-ol-20-ona, 55% 5α-pregnan-3,20-diona, 12,5% 5β-pregnan-3β-ol-20-ona, 8% 5β-pregnan-3,20-diona, 2,5% 4-pregnen-11β-ol-3,20-diona, e < 1% com 5β-pregnan-3α-ol-20-ona, pregnanediol (5β-pregnan-3α,20α-diol), 5α-pregnan-3α,20β-diol, androstenediona (5β-pregnan-3,17-diona) e corticosterona (5β-pregnan-11β,21-diol-3,20-diona).

4.3.2.2 Estrógenos urinários

O protocolo adotado na dosagem dos estrógenos urinários foi o mesmo utilizado para progestinas, só que utilizando o anticorpo R522 para estrona

conjugada (C. Munro, UC Davis, CA, EUA) na concentração de 1:8.000, e hormônio conjugado com HRP (C. Munro, UC Davis, CA, EUA) na concentração 1:160.000. Para este ensaio, as amostras de urina foram utilizadas puras.

Os ensaios realizados apresentaram uma sensibilidade de 1,66pg/mL, os coeficientes de variação intra e interensaio foram <5,74% e <12,25%, respectivamente, e a diluição seriada de um “pool” de amostras apresentou paralelismo com a curva padrão ($R^2 = 0,81$).

O anticorpo utilizado apresenta as seguintes reações cruzadas (de acordo com Munro et al. (1991)): 100% estrona-3-glicuronídeo, 66% estrona-3-sulfato, 238% estrona, 7,8% estradiol-17 β , 3,8% estradiol-3-glicuronídeo, 3,3% estradiol-3-sulfato, 0,1% estradiol-17 β -sulfato, estradiol-3-disulfato, e < 0,1% com etinil-estradiol-17 β , estriol, progesterona, pregnanediol, cortisol, testosterona e androsterona.

4.3.2.3 Estradiol salivar

Inicialmente, quatro a sete amostras de saliva por semana de cada animal foram processadas e posteriormente concentradas conforme descrito anteriormente nas análises de progesterona salivar. Para as dosagens hormonais, o mesmo protocolo anteriormente descrito foi aplicado. Foi utilizado o anticorpo R-0008 para estradiol-17 β , com o respectivo HRP, fornecido por C. Munro (UC Davis, CA, EUA), nas concentrações 1:10.000 e 1:40.000, respectivamente.

Os coeficientes de variação intra e interensaio foram <12,52%, e a sensibilidade do ensaio foi de 0,88pg/mL. Diluições seriadas de um “pool” de saliva apresentaram um padrão paralelo à curva padrão ($R^2 = 0,99$).

As reações cruzadas que o anticorpo utilizado apresenta, de acordo com C. Munro, são: 100% estradiol-17 β , 0,73% estrona, e < 0,1% com estrona-3-sulfato, progesterona, testosterona, cortisol, corticosterona, e androstenediona.

4.3.2.4 LH urinário

A dosagem do LH urinário foi realizada utilizando o protocolo descrito por Graham et al. (2002a), com modificações.

Antes do ensaio hormonal, 500µL de cada amostra urinária foi liofilizada e posteriormente ressuspensa em 250µL de tampão fosfato-salino (pH 7,0).

Para o ensaio hormonal, as microplacas foram marcadas com GAMG purificado (goat anti-mouse gamma globulin) (25µg/placa; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em solução de marcação ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,59g/L; NaHCO_3 : 2,936g/L; pH 9.6) e incubado “overnight” a temperatura ambiente. Os poços foram lavados com solução de lavagem (Tween-20: 0,02%), preenchidos com tampão TRIZMA (Trizma: 2,42g/L; NaCl: 17,9g/L; Albumina sérica bovina: 1,0g/L; Tween-80: 0,1%; pH 7.5), e as placas foram mantidas em temperatura ambiente para estabilização por no mínimo uma hora.

As placas foram esvaziadas e acrescentado 100µL de cada amostra, padrão da curva (1,9 – 250,0 pg/poço; NIH-LH bovino padrão; A.F. Parlow, NIDDK National Hormone and Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, EUA) ou controle em cada poço, todos em duplicata. Posteriormente, 100µL do anticorpo para LH bovino (518-B7; J. Roser, UC Davis, CA, EUA) diluído em tampão Trizma (1:400.000) foi adicionado em cada poço, e as placas foram seladas e incubadas “overnight” em temperatura ambiente.

Após a incubação, 50µL de LH ovino biotinado (NIDDK-oLH-26; A.F. Parlow, NIDDK National Hormone and Pituitary Program; biotinado com o conjunto comercial para biotinação EZ-Link Sulfo-NHS-LC, Pierce Chemicals, Rockford, IL, EUA), diluído em tampão Trizma (1:200.000), foi adicionado em cada poço, e posteriormente incubado em temperatura ambiente por 3hs.

As placas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos com uma solução de estreptavidina-peroxidase (200µL/poço; 1µL de enzima diluído em 22mL de tampão Trizma). Mais um ciclo de lavagem foi aplicado, e posteriormente adicionado 200µL de solução substrato (500µL de tetrametilbenzidina diluída em dimetilsulfóxido (0,004g/mL) e 100µL de H_2O_2 a 0,6%, adicionados a 24mL de tampão substrato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}$: 1,36g/L; pH 5,0)) em cada poço, e incubadas por 45

minutos. A reação cromógena foi parada com 50µL de solução STOP e a densidade óptica foi medida a 450nm.

A sensibilidade do ensaio foi de 56,25pg/mL, e os coeficientes de variação intra e interensaio foram <5,94% e <13,73%, respectivamente. Um “pool” de amostras foi diluído seriadamente e apresentou um padrão paralelo à curva padrão ($R^2 = 0,95$).

De acordo com Matteri et al. (1987), o anticorpo utilizado apresenta uma alta especificidade para LH, porém não é espécie-específico, apresentando alta reação com LH de várias espécies de mamíferos.

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados nas amostras urinárias foram corrigidos com o valor de creatinina e expressos como ng/mg Cr, enquanto os hormônios salivares foram expressos como pg/mL. As amostras urinárias com valores de Cr <0,1mg/dL foram excluídas das análises por serem consideradas muito diluídas e/ou contaminadas.

Para a caracterização do ciclo estral, os dados hormonais foram inicialmente tabulados individualmente para cada animal. Os resultados de progestinas urinárias foram analisados em um processo iterativo de exclusão dos valores maiores que a média mais dois desvios padrões, até a determinação dos valores basais (GRAHAM et al., 2002b). O padrão cíclico foi considerado quando ocorria a manutenção de valores maiores que os basais por mais de três dias consecutivos, e posterior retorno aos valores basais. Caso isto não ocorresse durante toda a época de coleta, o animal foi considerado em aciclia.

Para os estrógenos urinários e LH urinário, considerou-se valores acima da média mais dois desvios padrões como picos, e abaixo como valores basais. As fases progesterônica (valores consistentes acima dos valores basais de progestinas urinárias) e não-progesterônica (valores basais de progestinas urinárias) foram determinadas, e o ciclo estral foi definido como o intervalo entre o início de uma fase progesterônica e o início da fase progesterônica subsequente. A duração do ciclo estral, das fases progesterônica e não-progesterônica, e do intervalo entre os picos

de estrógenos urinários e entre os de LH urinário foram calculados para cada animal, e posteriormente os valores médios entre os indivíduos foram determinados.

Os mesmos procedimentos descritos para a matriz urinária foram aplicados para os resultados hormonais na matriz salivar. Devido à maior amostragem para estradiol salivar do que para progesterona salivar, a duração do ciclo estral também foi calculada com base no intervalo entre os picos de estradiol salivar sucedidos por elevação da progesterona salivar.

Após a verificação da normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias de cada variável hormonal, a obtenção das mesmas ocorreu após transformação dos dados para logaritmo na base 10 (progestinas urinárias, LH urinário e estradiol salivar) e para raiz quadrada (estrógenos urinários e progesterona salivar). Os valores de progestinas urinárias e de progesterona salivar nas fases progesterônica e não-progesterônica e na aciclia foram comparados estatisticamente. Do mesmo modo, os valores de estrógenos urinários, estradiol salivar e LH urinário no padrão cíclico e aciclia também foram comparados. Para a análise estatística, foi utilizado o PROC GLM do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelos testes *t* de Student para dois grupos e LSD para mais de dois grupos. Um valor de probabilidade de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Para a análise de variação do padrão hormonal nos dois trimestres, os dados hormonais foram classificados em Mês (4 semanas = 1 mês), Trimestre e Ano de coleta (Figura 6), e o efeito dos fatores Mês, Trimestre, Ano e interações entre estes fatores foram analisados pelo PROC GLM. Foram utilizados como pós-teste, o teste *t* de Student para dois tratamentos e o teste LSD para mais de dois tratamentos, considerando um valor de probabilidade de $P < 0,05$ como significativo.

A variável “testosterona salivar” não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida por transformação para logaritmo na base 10.

Para a descrição dos resultados da variação do padrão hormonal, foram utilizadas as medianas e os desvios quartílicos.

Adicionalmente, também foi calculado a correlação de Pearson entre os valores de progestinas urinárias e progesterona salivar, e entre estrógenos urinários e estradiol salivar.

Figura 6 – Esquema utilizado na classificação das amostras coletadas em grupos para a análise estatística da variação do padrão hormonal

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados foram separados no tópicos 1 – ciclo estral, 2 – variação do padrão hormonal e 3 – correlação entre as matrizes urinária e salivar, para uma maior compreensão destes.

5.1 CICLO ESTRAL

O padrão cíclico das progestinas urinárias foi observado somente em duas das três fêmeas analisadas, sendo que na fêmea Ti-057 este foi observado durante o Trimestre I nos dois anos amostrados, estando em aciclia no Trimestre II. Por outro lado, para a fêmea Ti-060, somente foi observado padrão cíclico no Trimestre I do Ano I (2009), e aciclia nos outros Trimestres de coleta. Não foi observado padrão cíclico em nenhum Trimestre de coleta na fêmea Ti-071.

Para a matriz urinária, a duração média do ciclo estral foi de $39,67 \pm 1,15$ dias (39 – 41 dias) (Tabela 1 e Gráfico 1), sendo observados três ciclos completos e seis ciclos incompletos. As fases progesterônica e não-progesterônica tiveram uma duração média de $29,00 \pm 5,29$ dias (23 – 33 dias) e $10,67 \pm 6,43$ dias (6 – 18 dias), respectivamente (Tabela 1), sendo que os valores de progestinas urinárias foram significativamente maiores na fase progesterônica do que na fase não-progesterônica e na aciclia ($P < 0,0001$; Teste LSD).

Foram observados dois picos distintos de estrógenos urinários em todos os ciclos analisados. O primeiro pico (Pico I) foi acompanhado de níveis baixos de progestinas urinárias e ocorreu no final da fase progesterônica ou no início da fase não-progesterônica. O segundo pico (Pico II) foi imediatamente sucedido pela elevação das progestinas urinárias (Gráfico 1). O intervalo médio entre estes picos foi de $22,50 \pm 9,50$ dias (14 – 38 dias), sendo que entre os picos correspondentes, foram de $53,00 \pm 4,24$ dias (50 – 56 dias) e $48,00 \pm 19,80$ dias (34 – 62 dias) para os Picos I e II, respectivamente (Tabela 1). Os valores de estrógenos urinários durante o padrão cíclico foram significativamente maiores durante o padrão cíclico quando comparado com a aciclia ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

Tabela 1 – Duração do ciclo estral e de suas fases, e níveis hormonais urinários durante os padrões cíclico e acíclico em três peixes-bois da Amazônia. Valores do padrão cíclico referentes a três ciclos completos e seis ciclos incompletos

	Média±DP	Mín - Máx	N
<i>Padrão cíclico</i>			
Progestinas - Fase progesterônica (ng/mg Cr)	12,29±18,69	0,12 – 99,78	101
Progestinas – Fase não-progesterônica (ng/mg Cr)	0,60±0,65	0,01 – 3,46	133
Estrógenos (ng/mg Cr)	0,66±0,46	0,01 – 2,68	236
LH (ng/mg Cr)	5,34±3,73	0,69 – 25,51	236
Duração da fase progesterônica (dias)	29,00±5,29	23 – 33	3
Duração da fase não-progesterônica (dias)	10,67±6,43	6 – 18	3
Intervalo entre picos de estrógenos I e II (dias) ^a	22,50±9,50	14 – 38	6
Intervalo entre picos de estrógenos I (dias)	53,00±4,24	50 – 56	3
Intervalo entre picos de estrógenos II (dias)	48±19,80	34 – 62	3
Duração do ciclo (dias) ^b	39,67±1,15	39 – 41	3
<i>Padrão acíclico</i>			
Progestinas (ng/mg Cr)	0,36±0,30	0,01 – 2,64	436
Estrógenos (ng/mg Cr)	0,60±0,48	0,01 – 2,68	436
LH (ng/mg Cr)	4,26±3,21	0,19 – 23,87	436

a – Pico de estrógenos I: pico acompanhado dos níveis basais de progestinas urinárias; Pico de estrógenos II: pico imediatamente sucedido pela elevação das progestinas urinárias.

b – Ciclo = Fase progesterônica + Fase não-progesterônica.

Gráfico 1 – Valores médios das progestinas e estrógenos urinários durante o ciclo estral em dois peixes-bois da Amazônia (três ciclos completos e seis ciclos incompletos). Dia zero: dia imediatamente anterior à elevação das progestinas urinárias. Seta verde: pico de estrógeno urinário

Os valores de LH urinário foram significativamente maiores no padrão cíclico do que no padrão acíclico ($P < 0,001$; Teste t de Student). Por outro lado, não foi observado uma constância no aparecimento dos picos de LH, sendo observado somente três picos de LH em toda amostragem. Desta forma, não foi possível o cálculo médio do intervalo entre os picos. Porém, ao comparar os dados com o ciclo médio observado, os picos de LH urinário coincidiram com os dois picos de estrógenos urinários (Gráfico 2). Ao avaliar os três picos isoladamente, observou-se uma estreita relação entre os picos de LH e os de estrógenos adjacentes (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Valores médios de progestinas e estrógenos urinários durante o ciclo estral em dois peixes-bois da Amazônia (3 ciclos completos e seis ciclos incompletos), e box plot dos valores de LH urinário durante os ciclos estrais observados. Dia zero: dia imediatamente anterior à elevação das progestinas urinárias. Seta verde: pico de estrógeno urinário; seta roxa: pico de LH urinário

Gráfico 3 – Valores médios de LH e estrógenos urinários durante a ocorrência de três picos de LH observados em ciclos estrais de dois peixes-bois da Amazônia. Dia zero: dia do pico de LH. Símbolos abertos: picos hormonais

Para a matriz salivar, foi observado o mesmo padrão visto na matriz urinária, com padrão cíclico na progesterona salivar ocorrendo somente nos animais Ti-057 e Ti-060, e somente nos Trimestres anteriormente citados. Sendo assim, também foram observados três ciclos completos e seis ciclos incompletos. A duração das fases progesterônica e não-progesterônica foram de $28,33 \pm 9,61$ dias (18 – 37 dias) e $18,00 \pm 7,21$ dias (12 – 26 dias), respectivamente. Também foram observados dois picos distintos de estradiol salivar, como previamente relatado para estrógenos urinários, com intervalo médio de $23,29 \pm 4,11$ dias (18 – 29 dias) entre eles. O ciclo estral apresentou uma duração média de $46,67 \pm 2,52$ dias (44 – 49 dias) com base na progesterona salivar, e de $44,00 \pm 2,00$ dias (42 – 46 dias) com base no intervalo entre os picos de estradiol sucedidos pela elevação da progesterona (Pico II) (Gráfico 4 e Tabela 2). Os valores de progesterona salivar foram significativamente

maiores na fase progesterônica que na fase não-progesterônica e no padrão acíclico ($P<0,0001$; Teste LSD), e os valores de estradiol salivar durante o padrão cíclico foram significativamente maiores quando comparados com os valores do padrão acíclico ($P<0,0001$; Teste t de Student).

Gráfico 4 – Valores médios de progesterona e estradiol salivares durante o ciclo estral em dois peixes-bois da Amazônia (três ciclos completos e seis ciclos incompletos). Dia zero: dia do pico de estradiol salivar imediatamente sucedido pela elevação da progesterona salivar. Seta verde: pico de estradiol salivar

Tabela 2 – Duração do ciclo estral e de suas fases, e níveis hormonais salivares durante os padrões cíclico e acíclico em três peixes-bois da Amazônia. Valores do padrão cíclico referentes a três ciclos completos e seis ciclos incompletos

	Média±DP	Mín - Máx	N
<i>Padrão cíclico</i>			
Progesterona – Fase progesterônica (pg/mL)	38,06±40,20	6,29 – 152,78	23
Progesterona – Fase não-progesterônica (pg/mL)	8,89±7,28	0,03 – 29,28	33
Estradiol (pg/mL)	30,22±36,35	1,34 – 246,71	149
Duração da fase progesterônica (dias)	28,33±9,61	18 – 37	3
Duração da fase não-progesterônica (dias)	18,00±7,21	12 – 26	3
Intervalo entre picos de estradiol I e II (dias) ^a	23,29±4,11	18 – 29	7
Intervalo entre picos de estradiol I (dias)	48,67±4,73	45 – 54	3
Intervalo entre picos de estradiol II (dias)	44,00±2,00	42 – 46	3
Duração do ciclo (base progesterona ^b) (dias)	46,67±2,52	44 – 49	3
Duração do ciclo (base estradiol II ^c) (dias)	44,00±2,00	42 – 46	3
<i>Padrão acíclico</i>			
Progesterona (pg/mL)	8,37±4,55	0,63 – 28,39	91
Estradiol (pg/mL)	13,96±19,15	0,03 – 142,97	210

a – Pico de estradiol I: pico acompanhado dos níveis basais de progesterona salivar; Pico de estradiol II: pico imediatamente sucedido pela elevação da progesterona salivar.

b – Ciclo = Fase progesterônica + Fase não-progesterônica.

c – Ciclo = intervalo entre picos imediatamente sucedidos pela elevação da progesterona salivar (picos de estradiol II).

5.2 VARIAÇÃO DO PADRÃO HORMONAL

Os dados foram apresentados separadamente, de acordo com a variável analisada.

5.2.1 Testosterona salivar

Para a variável “testosterona salivar” avaliada nos machos não foi observado efeito significativo do fator Ano ($P=0,2072$), e nem sua interação com os outros fatores, entretanto, foi observado interação entre Mês e Trimestre ($P<0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de testosterona salivar de quatro peixes-bois da Amazônia machos. Significância $P<0,05$; Teste GLM para medidas repetidas

Fator	<i>P</i>
Mês	0,9976
Trimestre	0,2809
Ano	0,2072
Mês X Trimestre	0,0039
Mês X Ano	0,5465
Trimestre X Ano	0,9132
Mês X Trimestre X Ano	0,3929

No pós-teste, foi observado um efeito significativo do Mês em cada Trimestre e um efeito significativo do Trimestre em cada Mês (Tabela 4). Houve uma diminuição da testosterona salivar no Mês III do Trimestre I quando comparado ao Mês II do mesmo Trimestre, e um aumento significativo no Mês III do Trimestre II quando comparado com os outros Meses do mesmo Trimestre ($P<0,05$; Teste LSD).

Só houve diferença significativa no Mês III ao comparar o Trimestre I com o Trimestre II, com valores maiores de testosterona salivar no Trimestre II ($P < 0,05$, Teste t de Student).

Tabela 4 – Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de testosterona salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de quatro peixes-bois da Amazônia machos. Valores em pg/mL; N=28

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	26,56 $\pm$ 8,95 ^{AB}	30,22 $\pm$ 11,19 ^A	20,23 $\pm$ 8,91 ^{Ba}
Trimestre II	26,53 $\pm$ 11,07 ^B	24,06 $\pm$ 9,94 ^B	35,91 $\pm$ 5,64 ^{Ab}

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada linha ($P < 0,05$; Teste LSD).

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P < 0,05$; Teste t de Student).

5.2.2 Progestinas urinárias

Nas fêmeas, houve interação do fator Ano com os outros fatores na variável “progestinas urinárias” ($P < 0,01$) (Tabela 5), desta forma, a interação entre os fatores Mês e Trimestre foi avaliada de forma separada para cada ano amostrado.

Tabela 5 – Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de progestinas urinárias de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Significância $P < 0,05$; Teste GLM para medidas repetidas

Fator	P
Ano	0,0353
Mês	<0,0001
Trimestre	<0,0001
Mês X Trimestre	<0,0001
Mês X Ano	<0,0001
Trimestre X Ano	0,0007
Mês X Trimestre X Ano	0,0015

No Ano I (2009), o pós-teste mostrou um efeito significativo do Mês em cada Trimestre e um efeito significativo do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 6). Houve um aumento das progestinas urinárias nos Meses II e III do Trimestre I quando comparado com o Mês I do mesmo Trimestre ($P<0,01$; Teste LSD). Entretanto, sem diferenças entre os Meses do Trimestre II ($P=0,1580$; Teste LSD). Houve diferença nos Meses II e III ao comparar o Trimestre I com o Trimestre II, onde o Trimestre I valores maiores de progestinas urinárias ($P<0,01$; Teste t de Student).

Tabela 6 – Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progestinas urinárias (mediana $\pm$ desvio quartílico) de dois peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2009. Valores em ng/mg Cr

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	0,29 $\pm$ 0,23 (N=50) ^B	0,68 $\pm$ 15,72 (N=48) ^{Aa}	0,72 $\pm$ 3,87 (N=52) ^{Aa}
Trimestre II	0,24 $\pm$ 0,09 (N=19)	0,25 $\pm$ 0,10 (N=39) ^b	0,31 $\pm$ 0,19 (N=51) ^b

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada linha ($P<0,01$; Teste LSD).

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P<0,01$; Teste t de Student).

No Ano II (2010), foi observado somente efeito significativo do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 7). Os Meses I, II e III do Trimestre I apresentaram valores de progestinas urinárias significativamente maiores que os respectivos meses no Trimestre II ($P<0,05$; Teste t de Student).

Tabela 7 – Efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progestinas urinárias (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2010. Valores em ng/mg Cr

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	0,41 $\pm$ 0,40 (N=64) ^a	0,43 $\pm$ 0,33 (N=80) ^a	0,46 $\pm$ 0,33 (N=79) ^a
Trimestre II	0,34 $\pm$ 0,15 (N=54) ^b	0,24 $\pm$ 0,15 (N=57) ^b	0,29 $\pm$ 0,09 (N=55) ^b

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P<0,05$; Teste t de Student).

5.2.3 Estrógenos urinários

Os estrógenos urinários apresentaram variação entre os anos ($P<0,05$), porém, sem interação com os Meses e os Trimestres de coleta. Por outro lado, foi observado interação entre Mês e Trimestre ($P<0,01$) (Tabela 8).

No pós-teste, foi observado que o Ano I (2009) apresentou valores de estrógenos urinários significativamente menores que o Ano II (2010) ($P<0,05$; Teste t de Student) (Tabela 9).

Tabela 8 – Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de estrógenos urinários de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Significância $P<0,05$; Teste GLM para medidas repetidas

Fator	P
Ano	0,0429
Mês	0,2918
Trimestre	<0,0001
Mês X Trimestre	0,0048
Mês X Ano	0,1791
Trimestre X Ano	0,7513
Mês X Trimestre X Ano	0,6096

Tabela 9 – Efeito do Ano de coleta sobre os níveis de estrógenos urinários (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas

	Estrógenos urinários (ng/mg Cr)
Ano I	0,50 $\pm$ 0,21 (N=259) ^a
Ano II	0,55 $\pm$ 0,28 (N=389) ^b

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa ($P<0,05$; Teste t de Student).

A análise de interação entre Mês e Trimestre revelou, no pós-teste, efeito significativo do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito significativo do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 10). Houve um aumento de estrógenos urinários no Mês II do Trimestre I ao comparar com o Mês I do mesmo Trimestre (março/abril) ($P < 0,01$; Teste LSD). Os níveis de estrógenos urinários foram maiores nos Meses I, II e III do Trimestre I quando comparados com os respectivos Meses no Trimestre II ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

Tabela 10 – Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de estrógenos urinários (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Valores em ng/mg Cr

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	0,55 $\pm$ 0,28 (N=114) ^{Ba}	0,72 $\pm$ 0,29 (N=128) ^{Aa}	0,61 $\pm$ 0,26 (N=131) ^{ABa}
Trimestre II	0,40 $\pm$ 0,19 (N=73) ^b	0,37 $\pm$ 0,21 (N=96) ^b	0,47 $\pm$ 0,21 (N=106) ^b

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada linha ($P < 0,01$; Teste LSD).

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

5.2.4 LH urinário

A variável “LH urinário” apresentou interação do fator Ano com os outros fatores ($P < 0,05$) (Tabela 11), desta forma, como realizado para progestinas urinárias, a interação entre os fatores Mês e Trimestre foi avaliada de forma separada para cada ano amostrado.

Tabela 11 – Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de LH urinário de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Significância $P < 0,05$; Teste GLM para medidas repetidas

Fator	<i>P</i>
Ano	<0,0001
Mês	0,0035
Trimestre	<0,0001
Mês X Trimestre	0,0233
Mês X Ano	0,7982
Trimestre X Ano	0,0649
Mês X Trimestre X Ano	0,0279

No pós-teste do Ano I (2009), somente foi observado um efeito significativo do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 12), onde os Meses I e III do Trimestre I apresentaram níveis de LH urinário maiores que os respectivos meses no Trimestre II ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

Tabela 12 – Efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de LH urinário (mediana $\pm$ desvio quartílico) de dois peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2009. Valores em ng/mg Cr

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	3,77 $\pm$ 1,63 (N=50) ^a	3,29 $\pm$ 1,59 (N=48)	4,22 $\pm$ 2,45 (N=52) ^a
Trimestre II	2,65 $\pm$ 1,49 (N=19) ^b	3,05 $\pm$ 0,96 (N=39)	2,86 $\pm$ 1,45 (N=51) ^b

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

Para o Ano II (2010), foi observado no pós-teste efeito significativo do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito significativo do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 13). Houve um aumento do LH urinário no Mês II do Trimestre I quando comparado com os outros Meses do mesmo Trimestre ($P < 0,05$; Teste LSD). Para o Trimestre II, os valores de LH urinário no Mês III foram maiores que os do Mês I ($P < 0,05$; Teste LSD). Ao comparar os Trimestres I e II, os Meses I e II foram maiores no Trimestre I do que no Trimestre II ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

Tabela 13 – Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de LH urinário (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2010. Valores em ng/mg Cr

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	4,03 $\pm$ 1,44 (N=64) ^{Ba}	5,07 $\pm$ 2,26 (N=80) ^{Aa}	3,31 $\pm$ 1,47 (N=79) ^B
Trimestre II	3,19 $\pm$ 1,31 (N=54) ^{Bb}	3,72 $\pm$ 1,72 (N=57) ^{ABb}	3,87 $\pm$ 2,40 (N=55) ^A

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada linha ($P < 0,05$; Teste LSD).
 Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P < 0,05$; Teste *t* de Student).

5.2.5 Progesterona salivar

Os dados de progesterona salivar apresentaram interação do fator Ano com os outros fatores ($P < 0,005$) (Tabela 14), desta forma, as interações foram analisadas separadamente para cada ano.

Tabela 14 – Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de progesterona salivar de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Significância $P < 0,05$; Teste GLM para medidas repetidas

Fator	<i>P</i>
Ano	0,7848
Mês	0,0173
Trimestre	<0,0001
Mês X Trimestre	0,0168
Mês X Ano	0,0027
Trimestre X Ano	0,3367
Mês X Trimestre X Ano	0,0012

No pós-teste do Ano I (2009) foi observado efeito do Mês de coleta em cada Trimestre amostrado e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 15). Observou-se valores de progesterona salivar significativamente maiores no Mês II do Trimestre I ao comparar com os outros Meses do mesmo Trimestre ($P < 0,01$;

Teste LSD), entretanto, não foi observado diferenças entre os Meses do Trimestre II ($P=0,8108$; Teste LSD). Os Meses II e III apresentaram valores de progesterona salivar significativamente maiores no Trimestre I quando comparado com o Trimestre II ($P<0,05$; Teste t de Student).

Tabela 15 – Efeito do Mês em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progesterona salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de dois peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2009. Valores em pg/mL

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	7,27 $\pm$ 6,89 (N=11) ^B	27,68 $\pm$ 39,84 (N=12) ^{Aa}	16,39 $\pm$ 10,99 (N=15) ^{Ba}
Trimestre II	9,91 $\pm$ 2,13 (N=13)	9,75 $\pm$ 1,05 (N=15) ^b	9,45 $\pm$ 1,91 (N=12) ^b

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada linha ($P<0,01$; Teste LSD).

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P<0,05$; Teste t de Student).

Para o Ano II (2010), o pós-teste mostrou somente efeito do Trimestre em cada Mês de coleta (Tabela 16). Os Meses I e III do Trimestre I apresentaram valores de progesterona salivar significativamente maiores que os respectivos Meses no Trimestre II ($P<0,05$; Teste t de Student).

Tabela 16 – Efeito do Trimestre em cada Mês de coleta sobre os níveis de progesterona salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas no ano de 2010. Valores em pg/mL

	Mês I	Mês II	Mês III
Trimestre I	18,99 $\pm$ 11,01 (N=15) ^a	17,24 $\pm$ 5,74 (N=17)	24,74 $\pm$ 9,43 (N=18) ^a
Trimestre II	9,11 $\pm$ 4,45 (N=17) ^b	10,76 $\pm$ 3,94 (N=14)	10,08 $\pm$ 2,64 (N=14) ^b

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P<0,05$; Teste t de Student).

5.2.6 Estradiol salivar

A análise dos dados de estradiol salivar indicou interação dos fatores Ano e Trimestre (Tabela 17). No pós-teste, foi observado efeito do Ano em cada Trimestre de coleta e efeito do Trimestre em cada ano amostrado (Tabela 18), onde o Trimestre I apresentou valores significativamente maiores de estradiol salivar que o Trimestre II tanto para o Ano I quanto para o Ano II ($P<0,0001$; Teste t de Student), e os valores do Trimestre I no Ano I foram maiores quando comparados com o Ano II ($P<0,001$; Teste t de Student), fato este não ocorrendo no Trimestre II ao comparar os Anos I e II ($P=0,0951$; Teste t de Student).

Tabela 17 – Valores de probabilidade para os efeitos de Mês, Trimestre e Ano, e suas interações, nos níveis de estradiol salivar de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Significância $P<0,05$; Teste GLM para medidas repetidas

Fator	P
Ano	$<0,0001$
Mês	0,2904
Trimestre	$<0,0001$
Mês X Trimestre	0,0842
Mês X Ano	0,0597
Trimestre X Ano	$<0,0001$
Mês X Trimestre X Ano	0,0589

Tabela 18 – Efeito do Trimestre em cada Ano de coleta e efeito do Ano em cada Trimestre de coleta sobre os níveis de estradiol salivar (mediana $\pm$ desvio quartílico) de três peixes-bois da Amazônia fêmeas. Valores em pg/mL

	Trimestre I	Trimestre II
Ano I	19,76 $\pm$ 19,34 (N=98) ^{Aa}	9,21 $\pm$ 6,18 (N=91) ^B
Ano II	13,00 $\pm$ 12,10 (N=133) ^{Ab}	4,90 $\pm$ 7,06 (N=143) ^B

Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada linha ($P<0,0001$; Teste t de Student).

Letras minúsculas diferentes - diferença significativa dentro da cada coluna ($P<0,001$; Teste t de Student).

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS MATRIZES URINÁRIA E SALIVAR

Foi observada uma correlação significativa ($P < 0,05$) entre as matrizes urinária e salivar para os hormônios analisados (Tabela 19).

Tabela 19 – Correlação entre hormônios urinários e salivares em peixes-bois da Amazônia fêmeas. Significância $P < 0,05$; Teste Correlação linear de Pearson

Hormônios	R	P
Progesterona salivar X Progestinas urinárias	0,8921	<0,0001
Estradiol salivar X Estrógenos urinários	0,1993	0,0305

D I S C U S S Ã O

6 DISCUSSÃO

A discussão foi separada em três grandes tópicos, sendo estes: 1 – ciclo estral, 2 – variação do padrão hormonal e 3 – correlação entre as matrizes urinária e salivar.

6.1 CICLO ESTRAL

Informações sobre o ciclo estral de uma determinada espécie, como a duração do ciclo e os eventos que ocorrem durante este, são de extrema importância para a compreensão da fisiologia reprodutiva da referida espécie. Estas informações, tanto para o peixe-boi da Amazônia quanto para os outros membros da Ordem Sirenia, são extremamente escassas, sendo, as existentes, pouco precisas (LARKIN, 2000; WAKAI et al., 2002; HORIKOSHI, 2004; NASCIMENTO, 2004).

O padrão de ciclo estral observado nos peixes-bois analisados neste estudo, com dois picos distintos de estrógenos (tanto estrógenos urinários quanto estradiol salivar) antes da elevação das progestinas (progestinas urinárias e progesterona salivar), até o momento não havia sido descrito para nenhuma espécie de sirênio. Por outro lado, este padrão é semelhante ao descrito para o elefante africano (*Loxodonta africana*) e o elefante asiático (*Elephas maximus*).

Os elefantes são monovulares, porém, como os sirênios, apresentam a formação de múltiplos CLs (2 – 50 CLs) durante a gestação e ciclo estral. Já foi observado que essas espécies apresentam duas ondas foliculares, acompanhadas de dois picos de estradiol, antes da ovulação. Concomitantes aos picos de estradiol ocorrem dois picos de LH, sendo que o primeiro pico de LH causa a luteinização dos folículos maiores da primeira onda, porém sem ocorrer ovulação (pico anovulatório de LH), formando os CLs acessórios. O segundo pico de LH causa a ovulação do folículo dominante da segunda onda folicular e a luteinização deste folículo (pico ovulatório de LH). Os níveis séricos de progestinas se mantêm em níveis basais após o primeiro pico de LH e só aumentam após o segundo pico de LH. Foi observado também, que existe uma constância no intervalo entre os dois picos de

LH, sendo de 18 a 23 dias (SMITH; BUSS, 1975; BRANNIAN et al., 1988; KAPUSTIN et al., 1996; HODGES, 1998; BROWN et al., 1999; HERMES et al., 2000; CZEKALA et al., 2003; LUEDERS et al., 2010; LUEDERS et al., 2011).

Algumas especulações a respeito da importância biológica do primeiro pico de estradiol e de LH para os elefantes já foram levantadas, como a preparação do endométrio para o novo ciclo após a longa fase luteal anterior (KAPUSTIN et al., 1996), atuação como filtro na prevenção de ovulações múltiplas e ocorrência de gestações gemelares (HERMES et al., 2000; HILDEBRANDT et al., 2006), manutenção dos níveis séricos de progestinas no início da fase luteal através dos CL acessórios (LUEDERS et al., 2010), sincronizar o desenvolvimento folicular da onda ovulatória (HILDEBRANDT et al., 2011), e a produção de sinais químicos para a atração do macho, garantindo a presença deste no momento ovulatório (BROWN et al., 1999; RASMUSSEN; KRISHNAMURTHY, 2000; CZEKALA et al., 2003). Além disso, evidências sugerem que os CLs acessórios atuem na seleção do folículo dominante da segunda onda folicular através da síntese e liberação de inibina (KAEWMANEE et al., 2011; LUEDERS et al., 2011).

Os sirênios são filogeneticamente próximos aos elefantes, apresentando semelhanças moleculares e morfológicas (DE JONG; ZWEERS, 1980; KLEINSCHMIDT et al., 1986; CARTER et al., 2004; KELLOGG et al., 2007). Outra similaridade entre estas espécies é a presença dos múltiplos CLs durante o ciclo estral e gestação (MARSH; HEINSOHN; CHANNELLS, 1984; MARMONTEL, 1995; RODRIGUES et al., 2008). Com isso, as semelhanças entre os ciclos estrais de peixe-boi da Amazônia e dos elefantes podem ser de origem filogenética.

Desta forma, é possível que ocorram duas ondas foliculares durante o ciclo estral em *T. inunguis*, onde a primeira seria luteinizada pelo primeiro pico de LH, mas com a manutenção dos valores baixos de progestinas, e a segunda onda teria seu folículo dominante induzido à ovulação pelo segundo pico de LH, com posterior aumento das progestinas. Com isso, a manutenção dos níveis baixos de progestinas após a primeira onda folicular refutaria a teoria de ciclos estéreis para a formação de CLs acessórios até atingir os níveis mínimos de progesterona para uma gestação, defendida para sirênios (MARSH; HEINSOHN; CHANNELLS, 1984; MARMONTEL, 1988, 1995; RODRIGUES et al., 2008; TRIPP, 2008).

Tripp (2008); Marmontel (1988) e Marsh et al. (1984) relatam a existência de diferenças morfológicas entre CLs de uma mesma fêmea, para peixe-boi da Flórida

e dugongo. Adicionalmente, Tripp (2008), avaliando a expressão da proteína de regulação aguda da esteroidogênese StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) em CL de peixe-boi da Flórida, observou diferenças de expressão entre CLs durante o diestro, sugerindo taxas de produção de progesterona diferentes entre os CLs do mesmo ovário.

Picos sucessivos de estrógenos (fecais ou urinários) sem elevação da progesterona entre eles também foram observados em dugongos (WAKAI et al., 2002), peixe-boi da Flórida (LARKIN, 2000; HORIKOSHI, 2004) e até no peixe-boi da Amazônia (NASCIMENTO, 2004). No entanto, a relação destes com os níveis de progesterona ou sua influência na determinação do ciclo estral não foram comentadas pelos autores.

Assim sendo, é possível que, como sugerido para elefantes, o primeiro pico de estradiol e de LH em sirênios tenham função endógena e exógena, atuando na formação de CLs acessórios, na seleção do folículo dominante da onda ovulatória e estimulando a síntese e liberação de sinalizadores químicos para a atração dos machos.

Este é o primeiro estudo descrevendo resultados de dosagem de LH em sirênios. O LH é sintetizado na hipófise anterior e liberado de maneira pulsátil, apresentando uma meia-vida curta (até algumas horas) (SENGER, 2005), desta forma, para seu monitoramento é necessário a realização de coletas com curtos intervalos de tempo. Foi observado que em orcas (*Orcinus orca*), coletas de urina duas vezes ao dia possibilitam um melhor discernimento dos picos de LH quando comparado com análises de amostras diárias (ROBECK et al., 1993; ROBECK et al., 2004). Por outro lado, para o golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e o golfinho-do-flanco-branco-do-Pacífico (*Lagenorhynchus obliquidens*) são necessárias no mínimo três coletas de urina por dia para o acompanhamento do pico de LH (ROBECK et al., 2005b; ROBECK et al., 2009). Neste trabalho, somente foram observados três picos de LH em toda a amostragem, porém só foi realizada uma coleta de urina por dia para o monitoramento endócrino do ciclo estral. Desta forma, é possível que o aumento no número de coletas por dia possibilite um melhor acompanhamento dos picos de LH presentes no ciclo estral de peixe-boi da Amazônia. Entretanto, o condicionamento dos animais para colaborar com o manejo, como já realizado em outras espécies de sirênios (COLBERT et al., 2001; WAKAI et al., 2002; LIMA et al., 2005a), seria primordial para o aumento no número de

amostras diárias, diminuindo possíveis efeitos estressores da intensificação do manejo.

A duração do ciclo estral em *T. inunguis* observada no presente estudo (entre 39 a 46 dias, considerando as duas matrizes analisadas) foi maior que a relatada anteriormente para a espécie. Nascimento (2004), avaliando esteroides fecais de *T. inunguis*, encontrou uma grande variação entre os animais analisados, com ciclos médios variando de $20 \pm 2,8$ dias até $27 \pm 8,2$ dias, dependendo do indivíduo. Entretanto, segundo o autor, foi utilizado como base para definição do ciclo estral, o intervalo entre dois picos consecutivos de estrógenos fecais. Desta forma, considerando o padrão de dois picos de estrógenos (picos I e II) observado aqui neste trabalho, os quais ocorrem em média a cada 23 dias, é possível que os dados de Nascimento (2004) estejam subestimado, caso o autor tenha considerado o intervalo entre os picos I e II de estrógenos como um ciclo completo.

É possível que o mesmo padrão de ciclo estral observado neste estudo para peixe-boi da Amazônia se aplique para as outras espécies de sirênios, devido à característica de múltiplos CLs comum aos sirênios. Desse modo, determinações de duração do ciclo estral em outros sirênios devem ser analisadas com cautela. Para peixe-boi da Flórida, Larkin (2000) e Horikoshi (2004), utilizando estrógenos fecais como base para a determinação da duração do ciclo estral, observaram ciclos estrais com grande variação na duração (de 16 a 42 dias), porém, fatores como a definição do início e fim do ciclo estral e a frequência amostral podem ter influenciado nos resultados. Por outro lado, Wakai et al. (2002) utilizaram o intervalo entre os picos de progestinas urinárias para a definição da duração do ciclo estral em dugongos, obtendo uma duração média de $56 \pm 8,6$ dias, sendo, desta forma, valores que provavelmente refletem melhor a duração do ciclo estral nessa espécie.

Não foi possível definir uma causa para a aciclia observada nas fêmeas Ti-060 e Ti-071 durante Trimestre I do ano de 2010, já que a Fêmea Ti-060 apresentou padrão cíclico no mesmo Trimestre do ano anterior e a fêmea Ti-057 apresentou padrão cíclico no mesmo Trimestre durante os dois anos consecutivos.

De acordo com Dow, Holásková e Brown (2011), até 14% dos elefantes asiáticos e 31% dos elefantes africanos mantidos em cativeiro apresentam aciclia ou padrões cíclicos irregulares, com base nos padrões de progestinas séricas. Brown, Walker e Moeller (2004) avaliaram a relação entre aciclia e a atividade endócrina da hipófise, tireoide, adrenal e do ovário nessas duas espécies e observaram altos

valores de prolactina, estradiol e/ou cortisol em parte dos animais acíclicos, mas não foi identificada uma relação entre a aciclia com alguma disfunção endócrina específica. Dentre as inúmeras possibilidades de causa da aciclia mencionadas pelos autores, estão as situações estressoras, como o estresse social, por exemplo.

Os efeitos inibitórios do estresse sobre a função reprodutiva são amplamente conhecidos, entretanto, os mecanismos de interação entre os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal ainda são alvos de constantes estudos (CHAND; LOVEJOY, 2011). Sendo assim, é possível que o manejo intenso aplicado aos animais, a redução do espaço individual por manter o animal no tanque de cambiamento algumas vezes dividindo-o com outro animal, e/ou outro fator estressor, possa ter induzido o quadro de aciclia nos peixes-bois da Amazônia utilizados neste estudo. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da influência de outros fatores como idade dos animais, presença/ausência de macho, ou até padrão fisiológico normal, no padrão acíclico observado.

6.2 VARIAÇÃO DO PADRÃO HORMONAL

Ciclo anual da função reprodutiva, com épocas distintas de atividade reprodutiva alternando com épocas de quiescência, ocorre em várias espécies de mamíferos. Esta sazonalidade serve para sincronizar os nascimentos com ótimas condições ambientais para a sobrevivência dos filhotes (WICKINGS; NIESCHLAG, 1980).

Em várias espécies de mamíferos que apresentam sazonalidade reprodutiva, os machos apresentam uma variação sazonal nos níveis séricos de testosterona. O aumento nos níveis de testosterona podem ocorrer juntamente com o início da atividade reprodutiva das fêmeas ou antecipadamente a época reprodutiva feminina, e após esse pico ou platô, os níveis de testosterona começam a cair durante a época de atividade reprodutiva. Acredita-se que esta antecipação ocorra para estimular a espermatogênese, aumentar a libido e atuar no comportamento de dominância entre os machos (SCHROEDER; KELLER, 1989; BROWN; TERIO; GRAHAM, 1996; KJELD et al., 2004; KRETZSCHMAR; GANSLOSSE; DEHNHARD, 2004; ROBECK et al., 2005a; MALPAUX, 2006; ROBECK; MONFORT, 2006).

O aumento significativo de testosterona salivar observado no mês de novembro (Mês III do Trimestre II) sugere que neste mês haja um pico de testosterona. Segundo Best (1982), a época reprodutiva em peixes-bois da Amazônia de vida-livre se concentra entre os meses de dezembro a julho. Desta forma, o aumento de testosterona salivar seria anterior a época reprodutiva das fêmeas.

T. inunguis é uma espécie que aparentemente não forma grupos coesos, apresentando pouca interação entre indivíduos na mesma área, sendo que agregações mais duradouras parecem ocorrer entre mãe e filhote, devido ao longo período de lactação (dois anos), e em grupos reprodutivos, onde vários machos tentam copular com a mesma fêmea (PEREIRA, 1944; ROSAS, 1994). Desta forma, a antecipação do pico de testosterona observado pode ser uma estratégia reprodutiva da espécie para que o macho esteja pronto ao início da época reprodutiva da fêmea, além de favorecer o indivíduo no momento de disputa pela fêmea.

Por outro lado, Pimentel (1998) não observou diferenças estatísticas nos níveis de andrógenos fecais de peixes-bois da Amazônia cativos comparando três épocas diferentes (agosto-setembro, outubro-dezembro, e abril-maio). Entretanto, é possível que fatores amostrais (número de amostra coletadas e épocas de coleta) tenham influenciado nos resultados encontrados pelo autor.

O fato desse evento ter se repetido por dois anos consecutivos (sem efeito de Ano) é um forte indício da existência de sazonalidade reprodutiva em machos de peixe-boi da Amazônia em cativeiro. Entretanto, como não foram amostrados todos os meses do ano, não se pode afirmar a existência do padrão sazonal. Não há estudos anatômico-reprodutivos em machos de *T. inunguis*, onde a avaliação da morfologia testicular, bem como a avaliação espermática, colaborariam para confirmar a existência de sazonalidade reprodutiva.

No peixe-boi da Flórida, Hernandez et al. (1995) observaram alteração na morfologia testicular e redução na presença de espermatozoides no testículo e epidídimo durante o inverno quando comparado com as outras estações do ano, fato este que coincide com a época de menor quantidade de nascimentos nessa espécie.

Nas fêmeas, o fato de somente duas das três fêmeas estudadas terem apresentado padrão hormonal cíclico, onde se observou ciclo estral no ano de 2009 em ambas as fêmeas, mas somente uma apresentou no ano 2010, associado ao

fato da variação no número de fêmeas analisadas em cada ano (2009 = 2; 2010 = 3) fazem com que os resultados obtidos no presente estudo sejam interpretados com cautela.

Esses fatos explicariam as interações do fator Ano com os outros fatores, indicando que os hormônios analisados apresentaram interações entre Mês e Trimestre de coleta de forma diferente dependendo do ano amostrado. Da mesma forma, diferenças estatísticas entre os Meses dentro de cada Trimestre amostrado podem estar relacionadas com variações no momento de aparecimento do ciclo estral durante as épocas amostrais e com as características peculiares da espécie de padrão hormonal durante o ciclo estral e sua duração, como foram apresentadas neste estudo. Os valores maiores de estrógenos urinários no ano de 2010 quando comparados com o ano 2009 podem estar relacionados com a grande diferença no número de amostras analisadas (2009 = 259; 2010 = 389). Do mesmo modo, a não existência de diferença significativa entre os Trimestres I e II do Ano II para o estradiol salivar pode ser consequência do maior número de fêmeas sem padrão cíclico durante o Trimestre I, diferentemente do Ano I, onde houve diferenças estatísticas entre os Trimestres.

Entretanto, foi observado valores estatisticamente maiores de progestinas urinárias, LH urinário e progesterona salivar em todos, ou quase todos, os Meses do Trimestre I quando comparados com os Meses do Trimestre II, tanto para o ano de 2009 quanto de 2010, e para os dois anos na análise de estrógenos urinários. O fato desses hormônios serem maiores no Trimestre I que no Trimestre II e este evento se repetir por dois anos consecutivos indicam a restrição da atividade reprodutiva à uma época específica do ano, sugerindo fortemente a existência de sazonalidade reprodutiva em fêmeas de peixe-boi da Amazônia, mesmo em condições de cativeiro. A época de atividade reprodutiva observada neste estudo (março a junho) corrobora com a época reprodutiva mencionada por Best (1982) (dezembro a julho) e com as observações de nascimentos em cativeiro (dezembro a agosto) (DA SILVA et al., 1999; ROSAS et al., 2001; CARTER et al., 2008; BUENO et al., 2010).

Nascimento (2004) também observou valores significativamente maiores de estrógenos fecais em fêmeas cativas de *T. inunguis* durante os meses de março a agosto quando comparado com os outros meses, ao analisar amostras de um ano completo. Porém, o autor não observou a mesma diferença ao analisar as progestinas fecais. É possível que outros fatores, como ensaio hormonal utilizado

e/ou matriz utilizada, possam ter influenciado nos resultados de progestinas fecais observados por esse autor. A principal rota de excreção dos hormônios esteroides e o principal metabólito excretado e sua forma podem variar consideravelmente entre as espécies e entre cada esteroide em uma mesma espécie animal (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WHITTEN; BROCKMAN; STAVISKY, 1998; GRAHAM, 2004; AMARAL, 2010).

A existência de um padrão reprodutivo sazonal tanto em machos quanto em fêmeas de peixe-boi da Amazônia mantidos em cativeiro, com alimentação constante durante todo o ano, não corrobora com o que foi mencionado por Best (1982) ao sugerir a disponibilidade de alimento como sincronizador da sazonalidade reprodutiva em *T. inunguis*.

De acordo com Gerlach e Aurich (2000); Malpaux (2006) e Chemineau et al. (2008), o fotoperíodo é o principal parâmetro ambiental sincronizador da grande maioria dos processos sazonais na natureza. Desta forma, para a sazonalidade reprodutiva, a variação do fotoperíodo atuará como fator proximal, sinalizando ao animal, com antecedência, quanto à chegada ou ao término da estação favorável para reprodução. Segundo Nelson (1990) e Gwinner (2003), o fator proximal, sendo o fotoperíodo ou outra variável ambiental, pode ou não ter importância direta para a sobrevivência do animal. Por outro lado, mudanças fisiológicas podem ocorrer em resposta direta a flutuações do ambiente que possuem uma função adaptativa imediata (fatores distais). Desta forma, a diminuição na disponibilidade de alimento pode acarretar a inibição da atividade reprodutiva, do mesmo modo, o aumento na disponibilidade de alimento permite a atividade reprodutiva, tornando, assim, a disponibilidade de alimento um fator distal para a sazonalidade reprodutiva.

Já foi observado que Ptarmigan (*Lagopus muta hyperborean*) (um galináceo do Ártico) apresenta uma variação sazonal de ganho e perda de peso, onde há um grande acúmulo de gordura nos meses anteriores ao inverno para suportar um longo momento de jejum com consequente perda de peso durante o inverno. Porém, esta sazonalidade se mantém mesmo em condições de disponibilidade de alimento constante. Desta forma, foi observado que a variação do fotoperíodo e da temperatura atuam como fatores proximais antecipando ao organismo um evento que está por vir (MORTENSEN; BLIX, 1985; STOKKAN; MORTENSEN; BLIX, 1986; STOKKAN; LINDGARD; REIERTH, 1995). O mesmo fato também já foi relatado para hamsters Europeus (*Cricetus cricetus*), com a variação sazonal do

ganho de peso mesmo com fornecimento alimentar nas fases de privação (CANGUILHEM; MARX, 1973).

Desta forma, tendo em vista os resultados obtidos em *T. inunguis* em cativeiro, é possível supor que algum fator ambiental funcione como sincronizador da sazonalidade reprodutiva no peixe-boi da Amazônia, atuando como fator proximal. Já a disponibilidade de alimento deve atuar como fator distal, onde a sua redução ou ausência é capaz de inibir a atividade reprodutiva. No entanto, a abundância de alimento por si só não é capaz de induzir a estação reprodutiva na espécie. Assim, a disponibilidade de alimento faria uma “sintonia fina” para o organismo indicando o início exato do evento antecipado pelo sincronizador (NELSON, 1990; WIKELSKI; HAU; WINGFIELD, 2000; GWINNER, 2003).

O peixe-boi da Amazônia habita rios e lagos de águas pretas, brancas e claras, os quais apresentam transparência entre 0,10 a 4,30 metros, dependendo do tipo de água (SIOLI, 1984; ROSAS, 1994), porém este se aproxima da superfície da água a cada 2 a 20 minutos para respirar (GALLIVAN; BEST, 1980) possibilitando a percepção do dia e da noite. Por outro lado, a espécie habita a região equatorial, com baixa variação do fotoperíodo, colocando, assim, em dúvida a possibilidade de percepção desta variação. Entretanto, segundo Hau, Wikelski e Wingfield (1998), o guarda-floresta (*Hylophylax naevioides*), um pássaro equatorial, é capaz de perceber pequenas variações no fotoperíodo (de até 17 minutos), regulando, assim, a sazonalidade reprodutiva na espécie. Para o cartaxo-comum equatorial (*Saxicola torquata axillaris*), outro pássaro equatorial, Gwinner e Scheuerlein (1998) observaram que a intensidade luminosa diária, a qual diminui por causa do aumento no número de nuvens na estação chuvosa, atua juntamente com a variação do fotoperíodo para sincronizar a sazonalidade reprodutiva nessa espécie.

Em peixes, fatores como a variação da temperatura e da condutividade elétrica da água podem atuar em conjunto com a variação do fotoperíodo para sincronizar a sazonalidade reprodutiva (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2007). Além do que, a variação do fotoperíodo pode atuar como sincronizador da sazonalidade reprodutiva mesmo na região amazônica, tanto em águas brancas quanto claras, como já visto para piranhas (*Pygocentrus nattereri*) (DUPONCHELLE et al., 2007).

Padrão reprodutivo sazonal também tem sido relatado para outros mamíferos aquáticos da Amazônia, como boto-vermelho (*Inia geoffrensis*), tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) e ariranha (*Pteronura brasiliensis*), entretanto, os fatores proximais para a

sincronização da sazonalidade nestas espécies são desconhecidos (BEST; DA SILVA, 1984; ROSAS; DE MATTOS; CABRAL, 2007; BOZZETTI, 2011)

Desta forma, informações ambientais como variações no fotoperíodo, na intensidade luminosa e/ou até na temperatura da água podem estar atuando como fator proximal na sazonalidade reprodutiva de peixe-boi da Amazônia tanto em vida-livre quanto em cativeiro. Porém, qual (ou quais) variável ambiental é o sincronizador e como o animal capta a informação ambiental e a traduz, continuam sendo desconhecidos.

6.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS MATRIZES URINÁRIA E SALIVAR

A correlação positiva entre a matriz urinária e salivar observada no presente estudo demonstra a possibilidade de uso de ambas as matrizes no monitoramento endócrino-reprodutivo do peixe-boi da Amazônia. Amaral et al. (2009) já havia demonstrado correlação positiva entre essas duas matrizes ao analisar andrógenos urinários e testosterona salivar.

Os hormônios esteroides salivares apresentam uma forte correlação com os níveis plasmáticos. Já os hormônios presentes na urina são oriundos do metabolismo e excreção dos hormônios circulantes no sangue, sendo dependentes da taxa metabólica do animal. Entretanto, a excreção dos hormônios pela urina ocorre em menos de 24hs, desta forma, estes apresentam uma grande proximidade ao evento fisiológico (VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983; PALME et al., 1996; AMARAL, 2010).

A correlação fraca observada entre estrógenos urinários e estradiol salivar pode estar relacionada ao baixo número de ciclos acompanhados e suas peculiaridades. Desta forma, a grande flutuação nos valores basais ocorrida nas duas matrizes e a observação de poucos valores altos (picos) possivelmente influenciaram no enfraquecimento da correlação.

É importante mencionar que ao se utilizar uma matriz alternativa no monitoramento endócrino, deve-se levar em consideração o objetivo proposto, as facilidades de coleta e as etapas laboratoriais envolvidas (AMARAL, 2010). Desta forma, com base nos resultados obtidos neste trabalho e nos procedimentos de

coleta e laboratoriais aplicados, o monitoramento reprodutivo de peixe-boi da Amazônia pode ser realizado com coletas diárias de saliva para dosagem de estradiol e/ou duas coletas semanais para o monitoramento da progesterona salivar, permitindo assim, um acompanhamento do ciclo estral na espécie. Por outro lado, para um estudo mais aprofundado do ciclo estral e maior precisão do início de suas fases, é recomendado o uso da matriz urinária, realizando uma ou mais coletas por dia. A matriz urinária propicia a possibilidade de dosagem de um número maior de hormônios (devido ao grande volume de amostra obtido), além do que, possibilita o monitoramento dos picos de LH.

CONCLUSIONS

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que:

- O ciclo estral em peixe-boi da Amazônia dura aproximadamente 42 dias e apresenta características peculiares semelhante aos elefantes, as quais podem ter importância biológica na estratégia reprodutiva da espécie.
- Tanto machos quanto fêmeas de peixes-bois da Amazônia mantidos em cativeiro apresentam variação no padrão hormonal dependendo da época do ano, sugerindo a existência de sazonalidade reprodutiva na espécie e que esta sazonalidade não seria sincronizada pela disponibilidade de alimento.
- É possível utilizar tanto a matriz urinária quanto a salivar no monitoramento endócrino-reprodutivo de peixe-boi da Amazônia, sendo ferramentas importantes para um maior conhecimento acerca da biologia reprodutiva da espécie.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLEN, M. E.; ULLREY, D. E. Relationships among nutrition and reproduction and relevance for wild animals. **Zoo Biology**, v. 23, n. 6, p. 475-487, 2004.

AMARAL, R. S. Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: a review. **Aquatic Mammals**, v. 36, n. 2, p. 162-171, 2010.

AMARAL, R. S.; DA SILVA, V. M. F.; ROSAS, F. C. W. Body weight/length relationship and mass estimation using morphometric measurements in Amazonian manatees *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). **Marine Biodiversity Records**, v. 3, n. e105, p. 1-4, 2010.

AMARAL, R. S.; LUCCI, C. M.; ROSAS, F. C. W.; DA SILVA, V. M. F.; BÃO, S. N. Morphology, morphometry and ultrastructure of the Amazonian manatee (Sirenia: Trichechidae) spermatozoa. **Zoologia (Curitiba, Impresso)**, v. 27, n. 6, p. 1014-1017, 2010.

AMARAL, R. S.; ROSAS, F. C. W.; VIAU, P.; D'AFFONSECA NETO, J. A.; DA SILVA, V. M. F.; OLIVEIRA, C. A. Noninvasive monitoring of androgens in male Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): biologic validation. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 3, p. 458-465, 2009.

ANDERSON, D. P.; NORDHEIM, E. V.; BOESCH, C. Environmental factors influencing the seasonality of estrus in chimpanzees. **Primates**, v. 47, n. 1, p. 43-50, 2006.

ANDERSON, P. K. Shark Bay dugongs in summer. I: Lek mating. **Behaviour**, v. 134, n. 5-6, p. 433-462, 1997.

_____. Habitat, niche and evolution of sirenian mating systems. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 9, n. 1-2, p. 55-98, 2002.

ATKINSON, S.; COMBELLES, C.; VINCENT, D.; NACHTIGALL, P.; PAWLOSKI, J.; BREESE, M. Monitoring of progesterone in captive female false killer whales, *Pseudorca crassidens*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 3, p. 323-332, 1999.

BATEMAN, H. L.; BOND, J. B.; CAMPBELL, M.; BARRIE, M.; RIGGS, G.; SNYDER, B.; SWANSON, W. F. Characterization of basal seminal traits and reproductive endocrine profiles in North American river otters and Asian small-clawed otters. **Zoo Biology**, v. 28, n. 2, p. 107-126, 2009.

BERTRAM, G. C. L.; RICARDO BERTRAM, C. K. The modern Sirenia: their distribution and status. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 5, n. 4, p. 297-338, 1973.

BEST, R. C. Foods and feeding habits of wild and captive Sirenia. **Mammal Review**, v. 11, n. 1, p. 3-29, 1981.

_____. Seasonal breeding in the Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, v. 14, n. 1, p. 76-78, 1982.

_____. Apparent dry-season fasting in Amazonian manatees (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, v. 15, n. 1, p. 61-64, 1983.

_____. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: SIOLI, H. **The Amazon, limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. 1. ed. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1984. p. 371-412.

BEST, R. C.; DA SILVA, V. M. F. Preliminary analysis of reproductive parameters of the boto, *Inia geoffrensis*, and the tucuxi, *Sotalia fluviatilis*, in the Amazon River system. **Report of the International Whaling Commission (Special issue)**, v. 6, n. 1, p. 361-369, 1984.

BIANCANI, B.; DA DALT, L.; LACAVE, G.; ROMAGNOLI, S.; GABAI, G. Measuring fecal progesterone as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1282-1292, 2009.

BOZZETTI, B. F. **Caracterização de habitat e aspectos reprodutivos da ariranha (*Pteronura brasiliensis*, Zimmermann, 1780) no lago da Usina Hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil**. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2011.

BRADSHAW, W. E.; HOLZAPFEL, C. M. Evolution of animal photoperiodism. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 38, n. 1, p. 1-25, 2007.

BRANNIAN, J. D.; GRIFFIN, F.; PAPKOFF, H.; TERRANOVA, P. F. Short and long phases of progesterone secretion during the oestrous cycle of the African elephant (*Loxodonta africana*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 1, p. 357-365, 1988.

BRAUN, B. C.; FRANK, A.; DEHNHARD, M.; VOIGT, C. C.; VARGAS, A.; GÖRITZ, F.; JEWGENOW, K. Pregnancy diagnosis in urine of Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 754-761, 2009.

BROWN, J. L.; SCHMITT, D. L.; BELLEM, A.; GRAHAM, L. H.; LEHNHARDT, J. Hormone secretion in the Asian elephant (*Elephas maximus*): characterization of ovulatory and anovulatory luteinizing hormone surges. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 5, p. 1294-1299, 1999.

BROWN, J. L.; TERIO, K. A.; GRAHAM, L. H. Fecal androgen metabolite analysis for noninvasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v. 15, n. 4, p. 425-434, 1996.

BROWN, J. L.; WALKER, S. L.; MOELLER, T. Comparative endocrinology of cycling and non-cycling Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 360-370, 2004.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 776-786, 1994.

BUENO, K. C.; LAZZARINI, S. M.; RIBEIRO, D. C.; FRANZINI, A. M.; PICANÇO, M. Nascimento de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) no Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos, Balbina, AM. In: REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL E CONGRESSO SOLAMAC, 14., 2010, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Sociedade Latino-Americana de Especialistas em Mamíferos Aquáticos - SOLAMAC, 2010. p. 3090.

CANGUILHEM, B.; MARX, C. Regulation of the body weight of the European hamster during the annual cycle. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 338, n. 2, p. 169-175, 1973.

CAPEZZUTO, A.; CHELINI, M. O. M.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids

throughout gestation in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 1-2, p. 78-86, 2008.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C.; KÜNZLE, H.; ODUOR-OKELO, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 1, p. 35-48, 2004.

CARTER, A. M.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; SANTOS, T. C.; ROSAS, F. C. W.; NETO, J. A. D.; LAZZARINI, S. M.; CARVALHO, A. F.; DA SILVA, V. M. F. Placentation in the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 4, p. 537-545, 2008.

CASTELBLANCO-MARTÍNEZ, D. N.; BERMÚDEZ-ROMERO, A. L.; GÓMEZ-CAMELO, I. V.; ROSAS, F. C. W.; TRUJILLO, F.; ZERDA-ORDOÑEZ, E. Seasonality of habitat use, mortality and reproduction of the vulnerable Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* in the Orinoco river, Colombia: implications for conservation. **ORYX**, v. 43, n. 2, p. 235-242, 2009.

CELEC, P.; OSTATNÍ-KOVÁ, D.; SKOKNOVÁ, M.; HODOSY, J.; PUTZ, Z.; KÚDELA, M. Salivary sex hormones during the menstrual cycle. **Endocrine Journal**, v. 56, n. 3, p. 521-523, 2009.

CHAND, D.; LOVEJOY, D. A. Stress and reproduction: controversies and challenges. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, n. 3, p. 253-257, 2011.

CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MIGAUD, M.; THIÉRY, J. C.; PELLICER-RUBIO, M. T.; MALPAUX, B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 40-47, 2008.

CHOE, J. K.; KHAN DAWOOD, F. S.; DAWOOD, M. Y. Progesterone and estradiol in the saliva and plasma during the menstrual cycle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 147, n. 5, p. 557-562, 1983.

CHRISTENSEN, B. W.; TROEDSSON, M. H. T.; YOUNG, L. J.; OLIVA, M.; PENFOLD, L. M. Effects of sociosexual environment on serum testosterone in captive male African rhinoceros. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1105-1111, 2009.

COLBERT, D. E.; FELLNER, W.; BAUER, G. B.; MANIRE, C. A.; RHINEHART, H. L. Husbandry and research training of two Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **Aquatic Mammals**, v. 27, n. 1, p. 16-23, 2001.

CZEKALA, N. M.; MACDONALD, E. A.; STEINMAN, K.; WALKER, S.; GARRIGUES II, N. W.; OISON, D.; BROWN, J. L. Estrogen and LH dynamics during the follicular phase of the estrous cycle in the Asian elephant. **Zoo Biology**, v. 22, n. 5, p. 443-454, 2003.

DA SILVA, I. M.; LARSON, S. Predicting reproduction in captive sea otters (*Enhydra lutris*). **Zoo Biology**, v. 24, n. 1, p. 73-81, 2005.

DA SILVA, V. M. F.; D'AFFONSECA NETO, J. A.; FARACO, R. R.; RODRÍGUEZ, Z. M. C.; MATTOS, G. E. Conception and birth of the first Amazonian manatee *Trichechus inunguis* in captivity. In: BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 13., 1999, Wailea. **Abstracts...** Wailea: The Society for Marine Mammalogy, 1999. p. 54.

DA SILVA, V. M. F.; ROSAS, F. C. W.; CANTANHEDE, A. M. Peixe-boi da Amazônia, *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883). In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1. ed. Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, 2008. p. 816-818.

DABBS JR, J. M. Salivary testosterone measurements in behavioral studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, n. 1, p. 177-183, 1993.

DE JONG, W. W.; ZWEERS, A. Confirmação da relação entre peixes-bois, hyraxes e elefantes, por meio do estudo da proteína das lentes dos olhos. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 4, p. 897-902, 1980.

DELFS, T. M.; KLEIN, S.; FOTTRELL, P.; NAETHER, O. G.; LEIDENBERGER, F. A.; ZIMMERMANN, R. C. 24-Hour profiles of salivary progesterone. **Fertility and Sterility**, v. 62, n. 5, p. 960-966, 1994.

DEUTSCH, C. J.; REID, J. P.; BONDE, R. K.; EASTON, D. E.; KOCHMAN, H. I.; O'SHEA, T. J. Seasonal movements, migratory behavior, and site fidelity of West Indian manatees along the Atlantic coast of the United States. **Wildlife Monographs**, v. 151, n. 1, p. 1-77, 2003.

DIGIANO, L.; NAGLE, C. A.; QUIROGA, S.; PAUL, N.; FARINATI, Z.; TORRES, M.; MENDIZABAL, A. F. Salivary progesterone for the assessment of the ovarian function in the capuchin monkey (*Cebus apella*). **International Journal of Primatology**, v. 13, n. 2, p. 113-123, 1992.

DLONIAK, S. M.; FRENCH, J. A.; PLACE, N. J.; WELDELE, M. L.; GLICKMAN, S. E.; HOLEKAMP, K. E. Non-invasive monitoring of fecal androgens in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, n. 1, p. 51-61, 2004.

DOMNING, D. P. Commercial exploitation of Manatee *Trichechus* in Brazil, c. 1785-1973. **Biological Conservation**, v. 22, n. 2, p. 101-126, 1982.

DOW, T. L.; HOLÁSKOVÁ, I.; BROWN, J. L. Results of the third reproductive assessment survey of north American Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) female elephants. **Zoo Biology**, v. 30, n. 6, p. 699-711, 2011.

DUPONCHELLE, F.; LINO, F.; HUBERT, N.; PANFILI, J.; RENNO, J.-F.; BARAS, E.; TORRICO, J. P.; DUGUE, R.; NUÑEZ, J. Environment-related life-history trait variations of the red-bellied piranha *Pygocentrus nattereri* in two river basins of the Bolivian Amazon. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. 4, p. 1113-1134, 2007.

FARIA JR., S. P. **Níveis séricos de progesterona, estrógenos e seus metabólitos fecais durante o ciclo estral em cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1978)**. 2006. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FIEB, M.; HERMANN, M.; HODGES, J. K. Patterns of urinary and fecal steroid excretion during the ovarian cycle and pregnancy in the African elephant (*Loxodonta africana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 76-89, 1999.

FRANCIS-FLOYD, R.; WHITE, J. R.; CHEN, C. L.; CARDEILHAC, P. T.; CICHRA, C. E. Serum progesterone and estradiol concentrations in captive manatees *Trichechus manatus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, n. 1, p. 70-73, 1991.

FURTADO, P. V. **Perfil analítico de estrógenos e progestinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aries*)**. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GALLIVAN, G. J.; BEST, R. C. Metabolism and respiration of the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). **Physiological Zoology**, v. 53, n. 3, p. 245-253, 1980.

_____. The influence of feeding and fasting on the metabolic rate and ventilation of the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). **Physiological Zoology**, v. 59, n. 5, p. 552-557, 1986.

GAO, Y.; SHORT, R. V.; FLETCHER, T. P. Progesterone concentrations in plasma, saliva and milk of cows in different reproductive states. **British Veterinary Journal**, v. 144, n. 3, p. 262-268, 1988.

GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 3-4, p. 197-213, 2000.

GRAHAM, L. H. Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 91-98, 2004.

GRAHAM, L. H.; BOLLING, J.; MILLER, G.; PRATT-HAWKES, N.; JOSEPH, S. Enzyme-immunoassay for the measurement of luteinizing hormone in the serum of African elephants (*Loxodonta africana*). **Zoo Biology**, v. 21, n. 4, p. 403-408, 2002a.

GRAHAM, L. H.; REID, K.; WEBSTER, T.; RICHARDS, M.; JOSEPH, S. Endocrine patterns associated with reproduction in the Nile hippopotamus (*Hippopotamus amphibius*) as assessed by fecal progestagen analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 74-81, 2002b.

GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

GRÖSCHL, M. The physiological role of hormones in saliva. **BioEssays**, v. 31, n. 8, p. 843-852, 2009.

GUDERMUTH, D. F.; CONCANNON, P. W.; DAELS, P. F.; LASLEY, B. L. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 237-248, 1998.

GUIÃO-LEITE, F. L. **Avaliação da eficiência da eletroforese capilar como técnica analítica na prospecção de metabólitos de esteróides em extratos fecais de onça-pintada (*Panthera onca*)**. 2006. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GUILHERME, C.; COLARES, E. P.; PINHO, G. L. L. Variação sazonal de testosterona em fezes de lontras (*Lontra longicaudis*) In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2., 2001, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: FMRP-USP, 2001. p. 216.

GUIMARÃES, M. A. B. V. The importance of the application of non-invasive techniques in the study of wild animal reproduction. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 29-37, 2003.

GUTERRES PAZIN, M. G. **Ecologia alimentar do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) (Sirenia, Trichechidae) nas reservas de desenvolvimento sustentável Mamirauá e Amanã**. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

GWINNER, E. Circannual rhythms in birds. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, n. 6, p. 770-778, 2003.

GWINNER, E.; SCHEUERLEIN, A. Seasonal changes in day-light intensity as a potential zeitgeber of circannual rhythms in equatorial Stonechats. **Journal für Ornithologie**, v. 139, n. 4, p. 407-412, 1998.

HARMON, H. L. **Seasonal reproductive endocrinology and anatomy of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*)**. 2001. 133 f. Thesis (Master of Science) - University of Alaska Fairbanks, Fairbanks, 2001.

HARTMAN, D. S. **Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida**. 1. ed. Lawrence: The American Society of Mammalogists, 1979. 153 p.

HAU, M.; WIKELSKI, M.; WINGFIELD, J. C. A neotropical forest bird can measure the slight changes in tropical photoperiod. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B, Biological Sciences**, v. 265, n. 1391, p. 89-95, 1998.

HERMES, R.; OLSON, D.; GÖRITZ, F.; BROWN, J. L.; SCHMITT, D. L.; HAGAN, D.; PETERSON, J. S.; FRITSCH, G.; HILDEBRANDT, T. B. Ultrasonography of the estrous cycle in female African elephants (*Loxodonta africana*). **Zoo Biology**, v. 19, n. 5, p. 369-382, 2000.

HERNANDEZ, P.; REYNOLDS III, J. E.; MARSH, H.; MARMONTEL, M. Age and seasonality in spermatogenesis of Florida manatees. In: O' SHEA, T. J.; ACKERMAN, B. B.; PERCIVAL, H. F. **Population biology of the Florida manatee**.

1. ed. Gainesville: National Biological Service Information and Technology Report 1, 1995. p. 84-97.

HILDEBRANDT, T. B.; GÖRITZ, F.; HERMES, R.; REID, C.; DEHNHARD, M.; BROWN, J. L. Aspects of the reproductive biology and breeding management of Asian and African elephants *Elephas maximus* and *Loxodonta africana*. **International Zoo Yearbook**, v. 40, n. 1, p. 20-40, 2006.

HILDEBRANDT, T. B.; LUEDERS, I.; HERMES, R.; GOERITZ, F.; SARAGUSTY, J. Reproductive cycle of the elephant. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 176-183, 2011.

HODGES, J. K. Endocrinology of the ovarian cycle and pregnancy in the Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephant. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1-4, p. 3-18, 1998.

HOGG, C. J.; VICKERS, E. R.; ROGERS, T. L. Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 814, n. 2, p. 339-346, 2005.

HOLEKAMP, K. E.; SZYKMAN, M.; BOYDSTON, E. E.; SMALE, L. Association of seasonal reproductive patterns with changing food availability in an equatorial carnivore, the spotted hyaena (*Crocuta crocuta*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, n. 1, p. 87-93, 1999.

HORIKOSHI, C. **Effect of hormonal and temporal factors on captive female manatee (*Trichechus manatus latirostris*) behavior**. 2004. 117 f. Thesis (Master of Science) - Georgia Southern University, Statesboro, 2004.

IRVINE, A. B. Manatee metabolism and its influence on distribution in Florida (*Trichechus manatus*). **Biological Conservation**, v. 25, n. 4, p. 315-334, 1983.

ITAVO, R. V.; ROSAS, F. C. W.; CAVALLANTE, A. P. Tempo de passagem do alimento no trato digestivo do peixe-boi da Amazônia, *Trichechus inunguis*, em cativeiro. In: REUNIÓN DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUÁTICOS DE AMÉRICA DEL SUR & CONGRESO SOLAMAC, 7., 1996, Viña del Mar. **Resúmenes...** Viña del Mar: Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos - SOLAMAC, 1996. p. 105.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. Gland: The World Conservation Union, 2011. Disponível em: < <http://www.iucn.org> >. Acesso em: 15 mar. 2011.

JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. **Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 106, n. 1, p. 110-127, 1989.

JUNK, W. J.; HOWARD-WILLIAMS, C. Ecology of aquatic macrophytes in Amazonia. In: SIOLI, H. **The Amazon, limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. 1. ed. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1984. p. 269-293.

KAUEWMANEE, S.; WATANABE, G.; KISHIMOTO, M.; JIN, W. Z.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; NAGAOKA, K.; NARUSHIMA, E.; KOMIYA, T.; TAYA, K. Secretion of inhibin during the estrous cycle in the female Asian elephant (*Elephas maximus*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 1, p. 77-82, 2011.

KALZ, B.; JEWGENOW, K.; FICKEL, J. Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany - results of DNA and hormone analyses from faecal samples. **Mammalian Biology**, v. 71, n. 6, p. 321-335, 2006.

KAPUSTIN, N.; CRITSER, J. K.; OLSON, D.; MALVEN, P. V. Nonluteal estrous cycles of 3-week duration are initiated by anovulatory luteinizing hormone peaks in African elephants. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 5, p. 1147-1154, 1996.

KEAY, J. M.; SINGH, J.; GAUNT, M. C.; KAUR, T. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 3, p. 234-244, 2006.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K.; ARCHER, F. I. Blubber testosterone: a potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 3, p. 507-522, 2009.

KELLOGG, M. E.; BURKETT, S.; DENNIS, T. R.; STONE, G.; GRAY, B. A.; MCGUIRE, P. M.; ZORI, R. T.; STANYON, R. Chromosome painting in the manatee supports Afrotheria and Paenungulata. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2007.

KJELD, M.; ALFREDSSON, A.; ÓLAFSSON, O.; TRYLAND, M.; CHRISTENSEN, I.; STUEN, S.; ÁRNASON, A. Changes in blood testosterone and progesterone

concentrations of the North Atlantic minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) during the feeding season. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, n. 2, p. 230-237, 2004.

KLEINSCHMIDT, T.; CZELUSNIAK, J.; GOODMAN, M.; BRAUNITZER, G. Paenungulata: a comparison of the hemoglobin sequences from elephant, hyrax, and manatee. **Molecular Biology and Evolution**, v. 3, n. 5, p. 427-435, 1986.

KRASNOW, S. M.; STEINER, R. A. Physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction. In: NEILL, J. D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p. 2553-2626.

KRETZSCHMAR, P.; GANSLOSSE, U.; DEHNHARD, M. Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2004.

KUGELMEIER, T.; DO VALLE, R. R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; MUNIZ, J. A. P. C.; MONTEIRO, F. O. B.; OLIVEIRA, C. A. Tracking the ovarian cycle in black-and-gold howlers (*Alouatta caraya*) by measuring fecal steroids and observing vaginal bleeding. **International Journal of Primatology**, v. 32, n. 3, p. 605-615, 2011.

KUTSUKAKE, N.; IKEDA, K.; HONMA, S.; TERAMOTO, M.; MORI, Y.; HAYASAKA, I.; YAMAMOTO, R.; ISHIDA, T.; YOSHIKAWA, Y.; HASEGAWA, T. Validation of salivary cortisol and testosterone assays in chimpanzees by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **American Journal of Primatology**, v. 71, n. 8, p. 696-706, 2009.

LANYON, J. M.; SMITH, K. M.; CARRICK, F. N. Reproductive steroids are detectable in the faeces of dugongs. **The Australian Zoologist**, v. 33, n. 2, p. 247-250, 2005.

LARKIN, I. L. V. **Reproductive endocrinology of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*): estrous cycles, seasonal patterns and behavior**. 2000. 354 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Department of Physiological Sciences, University of Florida, Gainesville, 2000.

LARKIN, I. L. V.; GROSS, T. S.; REEP, R. L. Use of faecal testosterone concentrations to monitor male Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) reproductive status. **Aquatic Mammals**, v. 31, n. 1, p. 52-61, 2005.

LIMA, A. B. F. **Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* - E. GEOFFROY, 1806) por meio de**

dosagem de metabólitos de esteróides fecais. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LIMA, D. S.; VERGARA-PARENTE, J. E.; YOUNG, R. J.; PASZKIEWICZ, E. Training of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* (Linnaeus, 1758) as a management technique for individual welfare. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 4, n. 1, p. 61-68, 2005a.

LIMA, R. P.; ALVITE, C. M. C.; VERGARA-PARENTE, J. E.; CASTRO, D. F.; PASZKIEWICZ, E.; GONZALEZ, M. Reproductive behavior in a captive-released manatee (*Trichechus manatus manatus*) along the northeastern coast of Brazil and the life history of her first calf born in the wild. **Aquatic Mammals**, v. 31, n. 4, p. 420-426, 2005b.

LITZ, B. J.; MASHBURN, K. L.; PETRAUSKAS, L.; ATKINSON, S. Non-invasive monitoring of testosterone in an endangered species, the Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*). In: BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 16., 2005, San Diego. **Abstracts...** San Diego: Society of Marine Mammalogy, 2005. p. 170.

LUEDERS, I.; NIEMULLER, C.; GRAY, C.; RICH, P.; HILDEBRANDT, T. B. Luteogenesis during the estrous cycle in Asian elephants (*Elephas maximus*). **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 777-786, 2010.

LUEDERS, I.; TAYA, K.; WATANABE, G.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; KAEWMANEE, S.; NIEMULLER, C.; GRAY, C.; STREICH, J. W.; HILDEBRANDT, T. B. Role of the double luteinizing hormone peak, luteinizing follicles, and the secretion of inhibin for dominant follicle selection in Asian elephants (*Elephas maximus*). **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 4, p. 714-720, 2011.

LUNA, F. O.; ATTADEMO, F. L. N.; HAGE-MAGALHÃES, L. R.; COUTINHO, P. D. F. Registro de nascimentos de filhotes de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) ocorridos em cativeiro. In: REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL & CONGRESSO SOLAMAC, 14., 2010, Florianópolis. Florianópolis: Sociedade Latino-Americana de Especialistas em Mamíferos Aquáticos - SOLAMAC, 2010. p. 3104.

MALPAUX, B. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: NEILL, J. D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p. 2231-2281.

MARMONTEL, M. **The reproductive anatomy of the female manatee *Trichechus manatus latirostris* (Linnaeus 1758) based on gross and histologic observations.** 1988. 91 f. Thesis (Master of Science) - University of Miami, Miami, 1988.

_____. Age and reproduction in female Florida manatees. In: O' SHEA, T. J.; ACKERMAN, B. B.; PERCIVAL, H. F. **Population biology of the Florida manatee.** 1. ed. Gaisneville: National Biological Service Information and Technology Report 1, 1995. p. 98-119.

MARMONTEL, M.; ODELL, D. K.; REYNOLDS III, J. E. Reproductive biology of South American manatees. In: HAMLETT, W. C. **Reproductive biology of South American vertebrates.** 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 295-312.

MARSH, H.; HEINSOHN, G. E.; CHANNELLS, P. W. Changes in the ovaries and uterus of the dugong, *Dugong dugon* (Sirenia: Dugongidae), with age and reproductive activity. **Australian Journal of Zoology**, v. 32, n. 6, p. 743-766, 1984.

MARSH, H.; HEINSOHN, G. E.; GLOVER, T. D. Changes in the male reproductive organs of the dugong, *Dugong dugon* (Sirenia: Dugongidae) with age and reproductive activity. **Australian Journal of Zoology**, v. 32, n. 6, p. 721-742, 1984.

MARSH, H.; HEINSOHN, G. E.; MARSH, L. M. Breeding cycle, life history and population dynamics of the dugong, *Dugong dugon* (Sirenia: Dugongidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 32, n. 6, p. 767-788, 1984.

MARSH, H.; SPAIN, A. V.; HEINSOHN, G. E. Physiology of the dugong. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 61A, n. 2, p. 159-168, 1978.

MARTIN, G. B.; BLACHE, D.; MILLER, D. W.; VERCOE, P. E. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. **animal**, v. 4, n. 7, p. 1214-1226, 2010.

MATTERI, R. L.; ROSER, J. F.; BALDWIN, D. M.; LIPOVETSKY, V.; PAPKOFF, H. Characterization of a monoclonal antibody which detects luteinizing hormone from diverse mammalian species. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 157-165, 1987.

MEIRELLES, A. C. O. Mortality of the Antillean manatee, *Trichechus manatus manatus*, in Ceará State, north-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 88, n. 6, p. 1133-1137, 2008.

MONFORT, S. L.; WASSER, S. K.; MASHBURN, K. L.; BURKE, M.; BREWER, B. A.; CREEL, S. R. Steroid metabolism and validation of noninvasive endocrine monitoring in the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Zoo Biology**, v. 16, n. 6, p. 533-548, 1997.

MORATO, R. G.; BUENO, M. G.; MALMHEISTER, P.; VERRESCHI, I. T. N.; BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1903-1907, 2004.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E.; BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v. 20, n. 2, p. 103-116, 2001.

MORTENSEN, A.; BLIX, A. S. Seasonal changes in the effects of starvation on metabolic rate and regulation of body weight in Svalbard ptarmigan. **Ornis Scandinavica**, v. 16, n. 1, p. 20-24, 1985.

MUNRO, C. J.; STABENFELDT, G. H.; CRAGUN, J. R.; ADDIEGO, L. A.; OVERSTREET, J. W.; LASLEY, B. L. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 838-844, 1991.

MURACO, H.; CHENG, A.; RAVIDA, N.; ARN, D.; HUDSON, J.; DURRANT, B. A new approach to detection of luteinizing hormone in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Aquatic Mammals**, v. 35, n. 3, p. 386-393, 2009.

NASCIMENTO, C. C. **Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais**. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NASCIMENTO, C. C.; OLIVEIRA, C. A.; DA SILVA, V. M. F.; D'AFFONSÊCA NETO, J. A. Estimativa do período de gestação em fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro, com base nos níveis plasmáticos de progesterona. In: REUNIÓN DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUÁTICOS DE AMÉRICA DEL SUR & CONGRESO SOLAMAC, 10., 2002, Valdivia. **Libro de Resúmenes...** Valdivia: Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos - SOLAMAC, 2002. p. 41-42.

NELSON, R. J. Mechanisms of seasonal cycles of behavior. **Annual Review of Psychology**, v. 41, n. 1, p. 81-108, 1990.

ODELL, D. K.; BOSSART, G. D.; LOWE, M.; HOPKINS, T. Reproduction of the West Indian manatee in captivity. In: O' SHEA, T. J.; ACKERMAN, B. B.; PERCIVAL, H. F. **Population biology of the Florida manatee**. 1. ed. Gainesville: National Biological Service Information and Technology Report 1, 1995. p. 192-193.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M. N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

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 of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, n. 1, p. 162-171, 2005.

PALME, R.; SCHERZER, S.; STOLLÄR, K.; NAGY, P.; SZENCI, O.; MÖSTL, E. Hormonal diagnosis of equine cryptorchidism. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 85, n. 6, p. 188-191, 1998.

PANTOJA, T. M. A.; ROSAS, F. C. W.; DA SILVA, V. M. F.; DOS SANTOS, A. M. F. Urinary parameters of *Trichechus inunguis* (Mammalia, Sirenia): reference values for the Amazonian Manatee. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 607-615, 2010.

PARENTE, C. L.; VERGARA-PARENTE, J. E.; LIMA, R. P. Strandings of Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in northeastern Brazil. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 3, n. 1, p. 69-75, 2004.

PEREIRA, M. N. O peixe-boi da Amazônia. **Boletim do Ministério da Agricultura**, v. 33, n. 5, p. 21-95, 1944.

PICANÇO, M.; ZANIOLO, G.; SÁ, F. C. N. Desenvolvimento de dois indivíduos gêmeos de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) do sexo feminino nascidos em cativeiro no Centro Peixe-boi / IBAMA no seu primeiro ano de vida. In: REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL E CONGRESSO SOLAMAC, 8., 1998, Olinda. **Resumos...** Olinda: Sociedade Latino-Americana de Especialistas em Mamíferos Aquáticos - SOLAMAC, 1998. p. 160.

PIETRASZEK, J.; ATKINSON, S. Concentrations of estrone sulfate and progesterone in plasma and saliva, vaginal cytology, and bioelectric impedance during the estrous cycle of the Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). **Marine Mammal Science**, v. 10, n. 4, p. 430-441, 1994.

PIMENTEL, G. P. **Determinação da testosterona presente nas fezes do peixe-boi da Amazônia *Trichechus inunguis* (Sirenia: Trichechidae), utilizando a técnica de radioimunoensaio**. 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

PIZZUTTO, C. S.; NICHI, M.; SGAI, M. G. F. G.; CORRÊA, S. H. R.; VIAU, P.; BERESCA, A. M.; OLIVEIRA, C. A.; BARNABÉ, R. C.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Effect of environmental enrichment on behavioral and endocrine aspects of a captive orangutan (*Pongo pygmaeus*). **Laboratory Primate Newsletter**, v. 47, n. 2, p. 10-14, 2008.

RASMUSSEN, L. E. L.; KRISHNAMURTHY, V. How chemical signals integrate Asian elephant society: The known and the unknown. **Zoo Biology**, v. 19, n. 5, p. 405-423, 2000.

RATHBUN, G. B.; REID, J. P.; BONDE, R. K.; POWELL, J. A. Reproduction in free-ranging Florida manatees. In: O' SHEA, T. J.; ACKERMAN, B. B.; PERCIVAL, H. F. **Population biology of the Florida manatee**. 1. ed. National Biological Service Information and Technology Report 1, 1995. p. 135-156.

ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L. Characterization of male killer whale (*Orcinus orca*) sexual maturation and reproductive seasonality. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 242-250, 2006.

ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L.; CALLE, P. P.; DUNN, J. L.; JENSEN, E.; BOEHM, J. R.; YOUNG, S.; CLARK, S. T. Reproduction, growth and development in captive beluga (*Delphinapterus leucas*). **Zoo Biology**, v. 24, n. 1, p. 29-49, 2005a.

ROBECK, T. R.; SCHNEYER, A. L.; MCBAIN, J. F.; DALTON, L. M.; WALSH, M. T.; CZEKALA, N.; KRAEMER, D. C. Analysis of urinary immunoreactive steroid metabolites and gonadotropins for characterization of the estrous cycle, breeding period, and seasonal estrous activity of captive killer whales (*Orcinus orca*). **Zoo Biology**, v. 12, n. 2, p. 173-188, 1993.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GEARHART, S.; REIDARSON, T. R.; MCBAIN, J. F.; MONFORT, S. L. Reproductive physiology and development of artificial

insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 650-660, 2004.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GREENWELL, M.; RAMIREZ, K.; VAN BONN, W.; YOSHIOKA, M.; KATSUMATA, E.; DALTON, L.; OSBORN, S.; O'BRIEN, J. K. Seasonality, estrous cycle characterization, estrus synchronization, semen cryopreservation, and artificial insemination in the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **Reproduction**, v. 138, n. 2, p. 391-405, 2009.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; MONTANO, G. A.; KATSUMATA, E.; OSBORN, S.; DALTON, L.; DUNN, J. L.; SCHMITT, T.; REIDARSON, T.; O'BRIEN, J. K. Deep intra-uterine artificial inseminations using cryopreserved spermatozoa in beluga (*Delphinapterus leucas*). **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 989-1001, 2010.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; YOSHIOKA, M.; JENSEN, E.; O'BRIEN, J. K.; KATSUMATA, E.; GILI, C.; MCBAIN, J. F.; SWEENEY, J.; MONFORT, S. L. Estrous cycle characterization and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Reproduction**, v. 129, n. 5, p. 659-674, 2005b.

RODRIGUES, F. R.; DA SILVA, V. M. F.; BARCELLOS, J. F. M.; LAZZARINI, S. M. Reproductive anatomy of the female Amazonian manatee *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia). **Anatomical Record**, v. 291, n. 5, p. 557-564, 2008.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 308-317, 2005.

ROSAS, F. C. W. Biology, conservation and status of the Amazonian manatee *Trichechus inunguis*. **Mammal Review**, v. 24, n. 2, p. 49-59, 1994.

ROSAS, F. C. W.; DA SILVA, V. M. F.; SOUSA-LIMA, R. S.; D'AFFONSECA NETO, J. A.; MATTOS, G. E. Adoption and growth of a captive Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) calf. In: BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 14., 2001, Vancouver. **Abstract book...** Vancouver: The Society of Marine Mammalogy, 2001. p. 183.

ROSAS, F. C. W.; DE MATTOS, G. E.; CABRAL, M. M. M. The use of hydroelectric lakes by giant otters *Pteronura brasiliensis*: Balbina lake in central Amazonia, Brazil. **ORYX**, v. 41, n. 4, p. 520-524, 2007.

ROSAS, F. C. W.; PIMENTEL, T. L. Order Sirenia (manatees, dugongs and sea cows). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 352-362.

SCARAMUZZI, R. J.; MARTIN, G. B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 129-136, 2008.

SCHROEDER, J. P.; KELLER, K. V. Seasonality of serum testosterone levels and sperm density in *Tursiops truncatus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 249, n. 3, p. 316-321, 1989.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52-74, 2007.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 515-526, 1996.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, 2005. 368 p.

SIOLI, H. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: SIOLI, H. **The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. 1. ed. the Netherlands: Dr. W. Junk Publishers, 1984. p. 127-165.

SMITH, N. S.; BUSS, I. O. Formation, function, and persistence of the corpora lutea of the African elephant (*Loxodonta africana*). **Journal of Mammalogy**, v. 56, n. 1, p. 30-43, 1975.

STEINMAN, K. J.; O'BRIEN, J. K.; MONFORT, S. L.; ROBECK, T. R. Characterization of the estrous cycle in female beluga (*Delphinapterus leucas*) using urinary endocrine monitoring and transabdominal ultrasound: evidence of facultative induced ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 389-397, 2012.

STOKKAN, K. A.; LINDGARD, K.; REIERTH, E. Photoperiodic and ambient temperature control of the annual body mass cycle in Svalbard ptarmigan. **Journal**

of **Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 165, n. 5, p. 359-365, 1995.

STOKKAN, K. A.; MORTENSEN, A.; BLIX, A. S. Food intake, feeding rhythm, and body mass regulation in Svalbard rock ptarmigan. **American Journal of Physiology**, v. 251, n. 2, p. R264-R267, 1986.

THEODOROU, J.; ATKINSON, S. Monitoring total androgen concentrations in saliva from captive Hawaiian monk seals (*Monachus Schauinslandi*). **Marine Mammal Science**, v. 14, n. 2, p. 304-310, 1998.

TIMM, R. M.; ALBUJA V., L.; CLAUSON, B. L. Ecology, distribution, harvest, and conservation of the Amazonian manatee *Trichechus inunguis* in Ecuador. **Biotropica**, v. 18, n. 2, p. 150-156, 1986.

TRIPP, K. M. **Reproductive and stress analyses in West Indian manatees (*Trichechus manatus*)**. 2008. 135 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - University of Florida, Gainesville, 2008.

VERGARA, J. E.; PARENTE, C. L.; SOMMERFELD, P. A.; LIMA, R. P. Estudo da composição do leite do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus 1856) do Nordeste do Brasil com inferências para uma dieta artificial. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 3, n. 3, p. 159-166, 2000.

VIAU, P.; FELIPPE, E. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Quantificação de esteróides fecais de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro: validação da técnica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 267-275, 2005.

VINING, R. F.; MCGINLEY, R. A.; SYMONS, R. G. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1752-1756, 1983.

WAKAI, Y.; HASEGAWA, K.; SAKAMOTO, S.; ASANO, S.; WATANABE, G.; TAYA, K. Annual changes of urinary progesterone and estradiol-17b of the dugong (*Dugong dugon*) in captivity. **Zoological Science**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2002.

WALKER, L. A.; CORNELL, L.; DAHL, K. D.; CZEKALA, N. M.; DARGEN, C. M.; JOSEPH, B.; HSUEH, A. J.; LASLEY, B. L. Urinary concentrations of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales

(*Orcinus orchus*) during ovarian cycles and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 5, p. 1013-1020, 1988.

WASSER, S. K.; PAPAGEORGE, S.; FOLEY, C.; BROWN, J. L. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 102, n. 2, p. 255-262, 1996.

WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 41, n. 1, p. 1-23, 1998.

WICKINGS, E. J.; NIESCHLAG, E. Seasonality in endocrine and exocrine testicular function of the adult Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) maintained in a controlled laboratory environment. **International Journal of Andrology**, v. 3, n. 1-6, p. 87-104, 1980.

WIKELSKI, M.; HAU, M.; WINGFIELD, J. C. Seasonality of reproduction in a neotropical rain forest bird. **Ecology**, v. 81, n. 9, p. 2458-2472, 2000.

WILLIAMS, T. M.; KIND, A. J.; HYDE, W. G.; HILL, D. W. Characterization of urinary metabolites of testosterone, methyltestosterone, mibolerone and boldenone in greyhound dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 121-129, 2000.

YAMADA, M.; ARAMAKI, S.; KUROSAWA, M.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Detection of urinary metabolites common to structurally related 17 α -alkyl anabolic steroids in horses and application to doping tests in race horses: methandienone, methandriol, and oxymetholone. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 387-391, 2008.