

SUZANA BEZZEGH HIRATA

**Avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides
fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*)
mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na
função reprodutiva**

São Paulo

2009

SUZANA BEZZEGH HIRATA

**Avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides
fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*)
mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na
função reprodutiva**

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2175
FMVZ

Hirata, Suzana Bezzegh

Avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva / Suzana Bezzegh Hirata. – São Paulo : S. B. Hirata, 2009.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2009.

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Cachorro-vinagre. 2. Glicocorticóides fecais. 3. Dosagem hormonal.
4. Radioimunoensaio. 5. Reprodução. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Levantamento dos perfis de corticóides fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*)", protocolado sob o nº1094/2007, utilizando 03 (três) cachorros, 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 em reunião de 20/02/2008.

(We certify that the Research "Fecal corticoids profiles survey in busk dog (*Speothos venaticus*)", protocol number 1094/2007, utilizing 03 (three) dogs, 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 Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 02/20/2008).

São Paulo, 22 de março de 2008



Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, _____ / _____ / _____

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HIRATA, Suzana Bezzegh

Título: Avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Para Zequinha e Miró (*in memoriam*)
Saudades...

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, que sempre me apóia em meus projetos.
Ao meu pai, que me ajudou muito nessa etapa da minha vida, em todos os sentidos.
A minha mãe, que nunca deixou de segurar a minha mão e que, nos momentos em
que precisei ainda me puxou para cima.

A Vera, irmã, amiga, companheira e conselheira de todas as horas.
Ao Lucas, por compartilhar cada dia, de alegrias, conquistas e tristezas também,
com amor, carinho e dedicação.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A FAPESP, pelo auxílio à pesquisa concedido.

A Cleyde Chieregatto, cujo incentivo foi fundamental.

Aos proprietários do Criadouro Onça-pintada, Luciano e Cristiane, pela
acolhida em um lugar tão especial.

A todos os funcionários do Criadouro Onça-pintada, pela ajuda e simpatia.
Aos veterinários Paulo e Cristiane Mangini, Márcia e JC, de Curitiba, pela grande
ajuda e sugestões.

As estudantes Nathalie, Bárbara e Camila, pela ajuda no processamento das
amostras.

Aos amigos e amigas do VRA, pela amizade, alegria e pelas boas risadas.
Aos funcionários do VRA e a Elza Faquim, da biblioteca, pela eficiência e simpatia.

A Dra. Priscila Viau, do Laboratório de Dosagens Hormonais, pela amizade e
enorme colaboração.

Ao meu orientador, Professor Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, obrigada por
todos os ensinamentos e paciência!

“O importante é não parar de questionar.”

Albert Einstein

RESUMO

HIRATA, S. B. **Avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva.** [Evaluation of fecal glucocorticoid metabolite profiles in captive bush dog (*Speothos venaticus*) and its possible role in the reproductive function]. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais através de radioimunoensaio em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva. Duas fêmeas e quatro machos adultos, após período de condicionamento, foram marcados e tiveram suas fezes recolhidas durante 45 dias. Estes animais recebiam diariamente marcadores (corantes e miçangas) para a devida identificação das amostras fecais. O desafio com ACTH foi realizado em uma das fêmeas e mostrou o perfil reativo esperado, validando a técnica do ponto de vista fisiológico. As concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais para o grupo em geral variaram de 2,32 a 65,09 µg/g de fezes secas, com média e desvio-padrão de $18,11 \pm 11,33$ µg/g de fezes secas, respectivamente. Quatro animais apresentaram um pico cada um, porém aparentemente, sem relação com qualquer evento estressante em particular. Não se verificou diferença significativa nos perfis de glicocorticóides fecais entre machos e fêmeas, nem entre a fêmea dominante e os outros indivíduos. Tais resultados sugerem que os animais estão bem adaptados à condição do cativeiro e provavelmente isentos ou minimamente afetados pelo estresse. A dosagem dos glicocorticóides fecais é uma ferramenta útil no monitoramento não-invasivo para avaliar a condição de estresse do cachorro-vinagre, demonstrando se aspectos de manejo e fatores ambientais interferem de modo importante ou não no bem-estar animal e no potencial reprodutivo, sendo de interesse para a manutenção e conservação da espécie.

Palavras-chave: Cachorro-vinagre. Glicocorticóides fecais. Dosagem hormonal.

Radioimunoensaio. Reprodução

ABSTRACT

HIRATA, S. B. **Evaluation of fecal glucocorticoid metabolite profiles in captive bush dog (*Speothos venaticus*) and its possible role in the reproductive function.** [Avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva]. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The aim of this study was to evaluate the fecal glucocorticoid metabolite profiles by radioimmunoassay in captive bush dog (*Speothos venaticus*) and its possible role in the reproductive function. Six adult animals (two females and four males), after training, were marked and their fecal samples were collected during 45 days. Every day the animals received markers (dye and colored plastic beads) for the appropriate identification of each sample. One female was used to the ACTH challenge and showed the expected classical response, with a significant peak one day after stimulation, therefore confirming the physiological validation. The overall fecal glucocorticoid metabolite concentrations for the whole group, ranged from 2,32 to 65,09 µg/g of dried feces, with an average and standard deviation of 18,11±11,33 µg/g of dried feces, respectively. Four animals revealed one individual peak during the observation period, however they could not be correlated with any stressful event. The fecal glucocorticoid metabolite concentrations did not show significant differences between males and females neither between the dominant female and the other animals in the study. The results suggest that the animals are well adapted to the captive conditions and likely without or minimally affected by stress. The fecal glucocorticoid metabolite dosage is a useful non-invasive tool to evaluate the bush dog stress situation and to monitor local management and environmental factors that could possibly influence the well being and reproductive success, considered both key factors for the specie maintenance and conservation.

Keywords: Bush dog. Fecal glucocorticoid. Hormonal dosage. Radioimmunoassay. Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 – | Cachorro-vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)..... | 21 |
| Figura 2 – | Distribuição geográfica do cachorro vinagre..... | 21 |
| Figura 3 – | Estrutura das categorias da IUCN..... | 27 |
| Figura 4 – | Cambiamento..... | 40 |
| Figura 5 – | Plataforma suspensa..... | 40 |
| Figura 6 – | Toca..... | 40 |
| Figura 7 – | Animal próximo ao riacho..... | 40 |
| Figura 8 – | Administração de carne com corante azul para F1..... | 43 |
| Figura 9 – | Administração de carne com e sem marcadores..... | 43 |
| Figura 10 – | Macho M3..... | 44 |
| Figura 11 – | Fêmea F1 (à frente)..... | 44 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|--------------|---|----|
| Gráfico 1 – | Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para glicocorticóides fecais..... | 51 |
| Gráfico 2 – | Representação gráfica do perfil de metabólitos de glicocorticóides fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas) para a fêmea F2, submetida ao desafio com ACTH..... | 52 |
| Gráfico 3 – | Representação gráfica das médias e desvios-padrões das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas dos animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4, durante o período de estudo (não houve diferença significativa entre os animais, $\alpha = 0,05$)..... | 53 |
| Gráfico 4 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal F1 durante o período de estudo..... | 55 |
| Gráfico 5 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal F2 durante o período de estudo..... | 56 |
| Gráfico 6 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal M1 durante o período de estudo..... | 56 |
| Gráfico 7 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal M2 durante o período de estudo..... | 57 |
| Gráfico 8 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal M3 durante o período de estudo..... | 57 |
| Gráfico 9 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal M4 durante o período de estudo..... | 58 |
| Gráfico 10 – | Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas) dos machos e fêmeas durante o período de estudo..... | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Número do microchip, data de nascimento ou entrada no criadouro e sexo dos animais - Campina Grande do Sul – 2008..... | 39 |
| Tabela 2 – | Controle de qualidade obtido nos ensaios de corticosterona fecais - São Paulo – 2009..... | 50 |
| Tabela 3 – | Número de amostras, média das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas) para os animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4 - Campina Grande do Sul – 2008..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| ACTH | hormônio adrenocorticotrópico |
| CITES | Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção |
| cm | centímetro |
| g | grama |
| GTC | Grupo de Trabalho de Canídeos |
| ha | hectares |
| IBAMA | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| IUCN | União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais |
| Kg | quilograma |
| km ² | quilômetro quadrado |
| m ² | metro quadrado |
| mg | miligrama |
| ml | mililitro |
| mm | milímetro |
| NaCl | cloreto de sódio |
| NaPO ₄ | fosfato de sódio |
| pg | picograma |
| ONG | organização não-governamental |
| RIE | radioimunoensaio |
| rpm | rotações por minuto |
| UI | unidades internacionais |
| µg | micrograma |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----|------------------|
| °C | graus celsius |
| α | alfa |
| % | porcentagem |
| ® | marca registrada |
| ™ | marca registrada |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 2.1 | O cachorro-vinagre | 20 |
| 2.2 | Espécies ameaçadas: extinção versus conservação no Brasil | 24 |
| 2.3 | Situação atual da espécie | 30 |
| 2.4 | Glicocorticóides e estresse | 32 |
| 2.5 | Estresse e reprodução | 33 |
| 2.6 | Dosagem de metabólitos de glicocorticóides fecais | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 37 |
| 3.1 | Objetivos gerais | 37 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 37 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 | Animais | 39 |
| 4.1.1 | Alojamento dos animais..... | 40 |
| 4.1.2 | Dieta..... | 41 |
| 4.2 | Condicionamento dos animais | 41 |
| 4.3 | Identificação dos animais | 43 |
| 4.4 | Colheita das amostras | 44 |
| 4.5 | Teste de desafio ao ACTH: validação fisiológica | 45 |
| 4.6 | Dosagens hormonais | 46 |
| 4.6.1 | Processamento das amostras para extração hormonal..... | 47 |
| 4.6.2 | Validação laboratorial..... | 48 |
| 4.7 | Análise estatística | 48 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 50 |
| 5.1 | Controle de qualidade do ensaio hormonal | 50 |
| 5.2 | Validação laboratorial | 50 |
| 5.3 | Desafio com ACTH | 51 |
| 5.4 | Metabólitos de glicocorticóides fecais | 52 |
| 5.4.1 | Perfis individuais dos animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4 durante o período de estudo..... | 55 |
| 5.4.2 | Comparação entre os perfis de machos e fêmeas..... | 58 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.4.3 | Comparação entre os perfis da fêmea alfa e dos outros indivíduos..... | 59 |
| 6 | CONCLUSÕES | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 64 |

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) é um canídeo ainda pouco estudado, tanto a campo quanto em cativeiro, atualmente está classificado como quase ameaçado pela IUCN e tem como principal causa de ameaça a perda do habitat (IUCN, 2009). Levando em consideração que existe uma pequena população mantida em cativeiro, é fundamental adquirir conhecimento sobre a espécie. Os esforços para a promoção do bem-estar animal estão aumentando. O estresse crônico, freqüentemente observado em animais mantidos em cativeiro, causa efeitos deletérios à saúde animal, inclusive em relação aos aspectos ligados à reprodução. Os glicocorticóides são utilizados como indicadores biológicos da resposta neuroendócrina ao estresse em mamíferos, sendo que a dosagem de metabólitos de glicocorticóides nas fezes é um método não-invasivo, adequando-se desse modo às pesquisas com a espécie em questão.

Pouco se sabe sobre aspectos endócrinos para a maioria dos canídeos, assim, as populações mantidas em cativeiro são o foco de estudos. O cativeiro oferece a condição ideal para esse tipo de pesquisa, principalmente porque os animais estão habituados com a presença humana. Além disso, as amostras para a realização de dosagem hormonal são mais facilmente colhidas do que em indivíduos de vida livre (BAUMAN et al., 2004).

A avaliação da resposta fisiológica ao estresse representa uma ferramenta indispensável à compreensão, à manutenção e ao melhoramento da saúde e do bem-estar dos animais. Portanto, quantificar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pode ser útil para avaliar como um animal reage a eventos considerados estressantes (MÖSTL; PALME, 2002).

Como o cachorro-vinagre depende de esforços voltados para a sua conservação, o monitoramento de hormônios ligados ao estresse pode ser uma ferramenta para identificar situações que estão levando a esse estresse. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi a avaliação dos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais através de radioimunoensaio em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva, contribuindo com informações importantes para a manutenção do bem-estar dos animais e para o sucesso de programas de reprodução da espécie.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura é apresentada a seguir.

1.1 O cachorro-vinagre

O cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (Figura 1) pertence à ordem Carnivora e à família Canidae, que possui 13 gêneros e 35 espécies. Embora apresentem um padrão anatômico relativamente uniforme, os animais dessa família variam significativamente quanto às dimensões e ao padrão de cor. Os canídeos apresentam a maior distribuição entre as famílias da Ordem Carnivora, estando distribuídos por todo o globo. Apenas nas ilhas oceânicas os canídeos não são encontrados. Na América do Sul, são encontrados cinco gêneros e nove espécies, sendo que seis ocorrem no Brasil: *Atelocynus microtis*, *Chrysocyon brachyurus*, *Speothos venaticus*, *Cerdocyon thous*, *Pseudalopex vetulus* e *Pseudalopex gymnocercus* (SILLERO-ZUBIRI; MACDONALD, 2004).

A espécie ocorre do oeste do Panamá ao leste dos Andes, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela e Guianas, até o leste da Bolívia e do Paraguai e extremo nordeste da Argentina. No Brasil, ocorre da região Amazônica, até o leste do Maranhão, e do Brasil Central até Santa Catarina (Figura 2). A abrangência da distribuição geográfica atual foi reduzida nas regiões Sul e Sudeste, assim como nas áreas mais densamente povoadas, de onde a espécie praticamente desapareceu. Nas demais áreas, a distribuição não é muito diferente da original (CABRERA; YEPPE, 1960; THORNBACK; JENKINS, 1982, ZUERCHER et al., 2009). A espécie é extremamente rara em sua área de distribuição (THORNBACK; JENKINS, 1982; COSTA, 1994; ZUERCHER et al., 2009).

É conhecido como *bush dog* em inglês e zorro vinagre em espanhol (CABRERA, 1960). O comprimento médio da cabeça e corpo é de 74,3 cm (57 a 76 cm), o da cauda é em média 12,3 cm e o peso fica entre 5 e 7 kg. A coloração varia entre o marrom claro e o escuro, tendo tonalidade mais clara na cabeça e no pescoço. Foram reconhecidas três subespécies até o momento: *S. v. panamensis*,

de porte pequeno e coloração clara, no noroeste da América do Sul; *S. v. venaticus*, de porte médio e coloração escura, na bacia do Rio Amazonas e *S. v. wingei*, de cor clara e porte semelhante a *S. v. venaticus*, encontrado no sudeste do Brasil (LINARES, 1967).



Fonte: Ricardo Zig Koch Cavalcanti, 2008.
Figura 1 - Cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*)



Fonte: IUCN, 2009.
Figura 2 - Distribuição geográfica do cachorro-vinagre

Habita florestas e savanas úmidas e vive geralmente próximo a água. O cachorro-vinagre é a espécie mais especializada dentre os canídeos sul-americanos adaptados a viver em florestas, com as características necessárias para este ambiente: pernas curtas e robustas, cauda e orelhas curtas e um padrão modificado de coloração de pelagem, sem as marcações encontradas no restante dos canídeos (LANGGUTH, 1975). Possui hábitos principalmente diurnos e utiliza um abrigo à noite, geralmente um buraco, podendo ser de tatu (*Dasybus spp* e *Priodontes maximus*) ou tronco de árvore. Considerado semi-aquático, inclusive por possuir membranas interdigitais, é um canídeo social que vive e caça em grupos, sendo que, dentre os pequenos canídeos é o único que realiza caça cooperativa (KLEIMAN, 1972; BEISIEGEL, 1999).

A dieta é altamente carnívora, tendo como itens principais animais de porte considerável para o tamanho da espécie, como roedores de grande porte, paca (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta spp.*), tatus e até mesmo pequenos veados (*Mazama sp.*). Inclui também pequenos roedores, aves, répteis e, esporadicamente, alguns frutos. No Mato Grosso, um estudo de carcaças de presas e fezes indica que a dieta é quase que exclusivamente à base de tatus-galinha (*Dasybus novemcinctus*). No Paraguai, pacas e cutias representaram 91% da biomassa consumida pela espécie, sendo o peso médio das presas consumidas de 2,2 kg, ou seja, 39% do peso do canídeo na região (ZUERCHER et al., 2005).

Estimativas preliminares de radiotelemetria sugerem que a área de vida de uma matilha seja de pelo menos 100 km², aparentemente não dividida com outras matilhas. Usando uma estimativa de área de vida de 20 km², calcula-se que pelo menos oito matilhas ocupavam uma área de 106.000 ha no Pantanal de Barão de Melgaço, no Mato Grosso (OLIVEIRA; DALPONTE, 2008).

Os grupos familiares são pequenos, de quatro a sete indivíduos, podendo chegar a 12. O tamanho médio dos grupos observados na Amazônia brasileira foi de 4,5 animais (variação de 2 a 8 indivíduos), enquanto na serra das Araras, Mato Grosso, a média foi de 2,6 indivíduos (variação de 1 a 3). No Pantanal de Barão de Melgaço, no Mato Grosso, foi estimado um tamanho médio de grupo de 2,75 indivíduos (variação de 1 a 5 indivíduos) (OLIVEIRA; DALPONTE, 2008). Também são encontrados indivíduos solitários (MACDONALD, 1996).

O cachorro-vinagre é extremamente sociável e seu comportamento envolve íntimo contato físico entre os membros da matilha. Quando estão dormindo, por

exemplo, não apenas deitam juntos, mas formam uma pilha com seus corpos. Outros comportamentos sociais são o deslocamento em fila indiana e a alimentação em conjunto com um mínimo de agressão (MACDONALD, 1996). Além disso, o cachorro-vinagre possui um amplo repertório de vocalizações e de comportamentos sociais que promovem a comunicação entre os membros do grupo (KLEIMAN, 1972; PORTON, 1983).

Em relação à dinâmica social, o centro da matilha é o par alfa, composto por um macho e uma fêmea. Esse casal recebe e inicia menos comportamentos agressivos e recebe mais demonstrações de submissão dos outros integrantes do grupo. Um exemplo de comportamento submisso da espécie é deitar de barriga para cima, com as orelhas voltadas para trás, abanando a cauda e empurrando o receptor da submissão ou o chão com a pata. O par alfa apresenta altas taxas de interação entre si e estão freqüentemente envolvidos em atividades de grupo. Em cativeiro, o estabelecimento da matilha é determinado pelo manejo, e não pelos animais, pois não existe a possibilidade de dispersão de indivíduos, o que normalmente ocorre em vida livre (MACDONALD, 1996).

De acordo com Porton et al. (1987) a reprodução do cachorro-vinagre em cativeiro não é sazonal e é influenciada por fatores sociais, ao contrário da maioria dos canídeos. Talvez isso ocorra devido à uniformidade artificial de pressões ecológicas, como temperatura ambiental e disponibilidade de alimento. Assim, a ausência de sazonalidade observada em animais mantidos em cativeiro indica provavelmente uma flexibilidade do ciclo reprodutivo que permite a influência de outros fatores. De fato, o ciclo reprodutivo do cachorro-vinagre sofre influências de fatores sociais: fêmeas criadas com um ou ambos os pais, sozinhas ou com irmãos, não entram em estro, começando a ciclar somente quando são separadas do grupo e pareadas com um macho. Portanto, nesta situação somente a fêmea alfa produz descendentes. A gestação dura aproximadamente 67 dias, após a qual nascem de um a seis filhotes.

O cachorro-vinagre é ainda pouco estudado, principalmente devido à dificuldade de localizar os animais para estudos de campo, existem poucos estudos em cativeiro e alguns relatos de avistamentos no campo. Praticamente nada se sabe sobre sua ecologia (BEISIEGEL, 1999).

1.2 Espécies ameaçadas: extinção versus conservação no Brasil

A biodiversidade brasileira está entre uma das mais ricas do mundo. Abrigando cinco importantes biomas e o maior sistema fluvial do mundo, o Brasil tem a mais rica biota continental do planeta. Junto à Colômbia e à Indonésia, é um dos países que fazem parte da lista das nações chamadas megadiversas, responsáveis por 70% da biodiversidade do planeta. A consideração de que o Brasil, segundo as estimativas mais conservadoras, abriga 13,2% da biota mundial, rendeu-lhe o título de país megadiverso (DRUMMOND, 2008).

Como medida da importância desta biodiversidade, no que tange à fauna, soma-se hoje, dentro do universo das espécies conhecidas no Brasil, cerca de 530 espécies de mamíferos, 1.800 de aves, 680 de répteis, 800 de anfíbios e 3.000 de peixes, além de uma riqueza ainda não mensurada de invertebrados, dado o elevado número de espécies estimado para o grupo. No Brasil, a concentração de mamíferos é a maior do globo; dos anfíbios encontrados no país mais da metade é endêmica. Além disso, é um dos quatro países, ao lado de Congo, Indonésia e Madagascar, que, juntos, possuem 75% de todas as espécies conhecidas de primatas (PAGLIA, 2005; DRUMMOND, 2008).

Entretanto, os números relativos à perda do patrimônio natural brasileiro chamam a atenção. Com um território que se estende por 8,5 milhões de km², é o quinto maior país do mundo e ocupa quase a metade de toda a América Latina, estando entre as nações mais populosas do mundo, com 50 milhões de famílias ou quase 184 milhões de habitantes em 2007, de origem e culturas variadas (DRUMMOND, 2008). Atender as necessidades desta população, aliada ao desenvolvimento econômico, leva a uma constante agressão ao meio ambiente.

A Mata Atlântica é o bioma mais alterado, do qual restam apenas 27% da sua cobertura original; o Cerrado cede, progressivamente, espaço para a soja e, mais recentemente, para a cana-de-açúcar, de modo que a história parece repetir o ciclo econômico que determinou a devastação da floresta atlântica; a Amazônia, outrora inacessível, perde a cada ano uma área de floresta que pode ser comparada a um estado de Sergipe. A Caatinga e o Pantanal, apesar de ter a sua ocupação dificultada pela dinâmica peculiar de seus ciclos hidrológicos, também dão sinais de profundas modificações em sua paisagem. A principal causa da perda de grandes

áreas e, por conseguinte, de espécies, muitas das quais exclusivas dos domínios biogeográficos brasileiros, deriva-se do modelo econômico e de ocupação territorial pela população humana (DRUMMOND, 2008).

As estatísticas mundiais de extinção de espécies estão entre centenas ou milhares de vezes acima do que é registrado na história dos processos naturais de extinção; e o Brasil contribui para esse ritmo (DRUMMOND, 2008). A exploração desordenada do território brasileiro, envolvendo desmatamento e degradação dos habitats, é uma das principais causas de extinção de espécies. O avanço da fronteira agrícola, a caça de subsistência e a caça predatória, o tráfico de animais silvestres e a introdução de espécies exóticas são fatores que geram riscos para a fauna brasileira. Os efeitos dessas ameaças podem ser medidos pelo crescente número de animais em risco de extinção incluídos na Lista Vermelha do IBAMA (PAGLIA, 2005), instrumento usado para se avaliar o estado de conservação da biodiversidade permitindo aos países a definição e a adoção de políticas de proteção legal à mesma (DRUMMOND, 2008).

A Constituição Brasileira, promulgada em 5 de outubro de 1988, remete a preocupação em assegurar a manutenção da biodiversidade. Em seu Capítulo VI, referente às questões ambientais, Art. 225, parágrafo 1º, inciso VII, determina como responsabilidade do Poder Público “proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção das espécies ou submetam os animais a crueldade” (DRUMMOND, 2008).

Baseando-se no princípio de que as espécies são as detentoras da diversidade genética e constituem a base dos ecossistemas, as informações sobre sua distribuição e status de conservação fornecem o fundamento para a tomada de decisões sobre a conservação da biodiversidade em níveis local e global (DRUMMOND, 2008).

A União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) vem, ao longo dos últimos 30 anos, elaborando listas vermelhas a partir da avaliação do status de conservação das espécies em escala global, com o objetivo de chamar a atenção para aquelas ameaçadas de extinção e, conseqüentemente, promover a sua conservação. No Brasil, a primeira lista oficial de espécies ameaçadas de extinção é datada de 1968. De acordo com a última lista publicada em 2005 um total de 627 espécies da fauna está ameaçado de extinção no Brasil, distribuídos entre os grupos de invertebrados e vertebrados. A lista

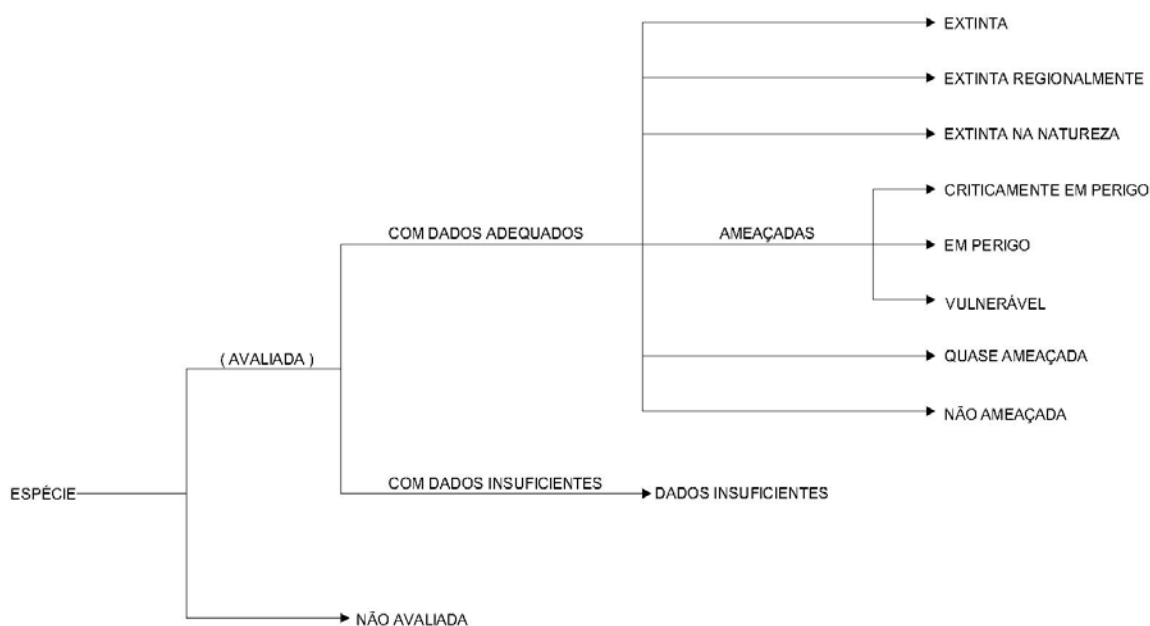
vermelha vigente até então no Brasil, promulgada pelo IBAMA, segundo as Portarias 1522/89; 45-N/92 e 62/97, continha 218 espécies (DRUMMOND, 2008), demonstrando o crescimento do número de espécies ameaçadas.

O conceito de extinção pode ser aplicado de acordo com a situação da espécie. Quando uma espécie não possui mais indivíduos na natureza, é considerada extinta, mesmo que ainda existam exemplares em cativeiro, até mesmo com a possibilidade de um dia voltarem à vida livre. A extinção representa a perda de uma unidade da biodiversidade que compunha um sistema que irá se adaptar a essa nova condição. Contudo, o processo progressivo e rápido de perda de biodiversidade provoca desajustes cada vez mais difíceis de serem reorganizados. Tal fenômeno muitas vezes não é percebido diretamente (ANDRIOLO, 2006).

De acordo com os critérios da IUCN (2001) foram definidos os seguintes níveis ou categorias de ameaça (Figura 3), considerando o uso dos critérios em escala regional, ou seja, em uma área geográfica tal como um continente, país, estado ou província:

- Extinta – Uma espécie é considerada extinta quando não há dúvidas de que o último indivíduo morreu.
- Extinta regionalmente - Uma espécie é considerada extinta regionalmente quando a mesma estiver extinta no país, mas existente em outras partes do mundo.
- Extinta na natureza - Uma espécie é considerada extinta na natureza quando é conhecida por sobreviver apenas em cativeiro, criação ou como uma população naturalizada fora de sua área original de ocorrência.
- Ameaçada - Enquadrada em três níveis de ameaça:
 - Criticamente em perigo - Espécie que corre um risco extremamente alto de extinção na natureza.
 - Em perigo - Espécie que corre um risco muito alto de extinção na natureza.
 - Vulnerável - Espécie que corre um risco alto de extinção na natureza.

- Quase ameaçada - Espécie que não atinge, mas está próxima de atingir os critérios de ameaça, ou provavelmente estará ameaçada em um futuro próximo.
- Não ameaçada - Espécie que foi avaliada quanto ao seu risco de extinção, mas não se enquadrou em nenhuma das categorias de ameaça da IUCN.
- Dados insuficientes - Sem dados suficientes para enquadramento em alguma das categorias acima.



Fonte: IUCN, 2001 (modificada).
 Figura 3 - Estrutura das categorias da IUCN

Os critérios para classificação segundo os níveis de ameaça de determinada espécie adotados pela IUCN baseiam-se em tamanho da população, distribuição geográfica, estimativas do número de indivíduos adultos e probabilidades de extinção e de declínio da população nos próximos anos (IUCN, 2001). Além da classificação da IUCN, que auxilia os países detentores da fauna ameaçada na tomada de decisões para a conservação das espécies foi realizada em 1973 a Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES), que estabelece proteção para animais e plantas, por meio da regulação e monitoramento do comércio internacional dessas espécies, particularmente aquelas ameaçadas de extinção, impedindo que atinjam

níveis insustentáveis. Atualmente a Convenção conta com 175 países. As espécies são listadas em três anexos (CITES, 2009):

- Anexo I: inclui espécies ameaçadas de extinção e que são ou podem ser afetadas pelo comércio. O comércio de indivíduos destas espécies é permitido apenas em circunstâncias excepcionais.
- Anexo II: inclui espécies não necessariamente ameaçadas de extinção, mas cuja comercialização deve ser controlada para evitar exploração incompatível com sua sobrevivência.
- Anexo III: inclui espécies protegidas em pelo menos um país signatário da Convenção que tenha solicitado às outras partes ajuda no controle de sua comercialização.

No Brasil, 82 espécies de mamíferos estão oficialmente ameaçadas, o que representa ao redor de 10% das espécies nativas de mamíferos que ocorrem no país, segundo a mais recente compilação disponível. A grande maioria das espécies ameaçadas (40 espécies) está incluída na categoria vulnerável, quase um terço (18 espécies) está na categoria criticamente em perigo e as 11 espécies restantes situam-se na categoria em perigo, segundo critérios de avaliação adotados para a elaboração da lista em 2002. Nenhuma espécie foi considerada extinta ou regionalmente extinta. As espécies ameaçadas estão distribuídas em 10 das 12 ordens com representantes no Brasil. Apenas as ordens Perissodactyla, cujo único representante no país é a anta (*Tapirus terrestris*) e Lagomorpha, representada pelo tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*), não possuem espécies ameaçadas (CHIARELLO et al., 2008).

Foram citados diversos tipos de ameaça como os principais causadores de declínio das espécies constantes da lista nacional. A maioria absoluta das espécies (88,4%) está ameaçada pela destruição de habitat e pelo desmatamento (73,9%), fatores que são mais intensos no Cerrado, na Mata Atlântica e na Caatinga. Caça e perseguição afetam 53,6% e 23,2% das espécies, respectivamente. Ou seja, mais da metade das espécies está ameaçada por uma atividade ilegal, já que a caça é proibida no país, exceto no Rio Grande do Sul, onde é controlada pelo IBAMA. Outro fator relacionado é a captura para comércio ilegal, representando ameaça para 7,2%

das espécies e o turismo, citado também para 7,2% das espécies (CHIARELLO et al., 2008).

As principais causas de ameaça para os carnívoros são o desmatamento, levando à degradação ou perda do habitat, e a caça predatória, seja para proteção de supostos ataques a animais domésticos como para a indústria de pele (SILLERO-ZUBIRI; MACDONALD, 2004). No Brasil, três canídeos são classificados como quase ameaçados pela IUCN, o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas (*Atelocynus microtis*) (IUCN, 2009).

As espécies que apresentam uma pequena população requerem mais atenção, tanto por esse ser um sinal da possibilidade de extinção, como pelas dificuldades impostas ao manejo. Nesse sentido a falta de conhecimento torna-se um entrave para, por exemplo, dimensionar o tamanho de uma população suficiente para sua perpetuação. A população viável mínima corresponde ao número de indivíduos necessário para assegurar a sobrevivência de uma espécie. Esse número é bastante discutível, sendo que alguns propõem um valor entre 500 e 1000, o que seria suficiente para preservar a variabilidade genética. A perda de variabilidade genética decorrente da redução do número de indivíduos pode levar a uma dificuldade de adaptação da espécie ao ambiente. A migração de indivíduos entre populações e a mutação regular de genes tendem a aumentar a variabilidade (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; ANDRIOLO, 2006).

A combinação de abordagens para a conservação pode ser a única forma para evitar a extinção e recuperar a população de espécies ameaçadas. Uma das abordagens é a conservação *in situ*, que se caracteriza pela manutenção dos animais no seu ambiente original e tem como foco estratégias de manutenção de áreas protegidas, fiscalização, possibilidade de ampliação e conexão de áreas fragmentadas, estudos de ecologia, demografia, comportamento alimentar, reprodutivo e de genética. Outra abordagem é a conservação *ex situ*, que corresponde à manutenção dos animais fora do seu ambiente natural, como zoológicos e criadouros, priorizando estudos com comportamento alimentar, reprodução orientada para manutenção da variabilidade genética no cativeiro, comportamento e treinamento para possíveis reintroduções (ANDRIOLO, 2006).

Mas, os indivíduos mantidos em cativeiro sofrem estímulos estressores ocasionados por alterações em seus hábitos, tais como proximidade forçada em

relação as suas presas e/ou predadores, superpopulação, dietas inadequadas, falta de privacidade, formação de grupos sociais impostos e grande proximidade com humanos (MORGAN; TROMBORG, 2007). Nesse contexto, estudos sobre aspectos endócrinos relacionados ao comportamento, reprodução e bem-estar vêm complementar as informações sobre a espécie em questão.

1.3 Situação atual da espécie

Atualmente a espécie é classificada como quase ameaçada pela IUCN e está no Anexo I do CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção) (CITES, 2000; IUCN, 2009). *Speothos venaticus* migrou da categoria de vulnerável (IUCN, 2006) para a de quase ameaçado em 2009. Isso significa que a espécie não cumpriu critérios da categoria de ameaçado, mas está próximo de cumprir ou é provável que transite para essa categoria em um futuro próximo. A justificativa para a recente alteração é de que embora a espécie ocorra em uma grande variedade de habitats e possua uma ampla área de distribuição, em nenhuma dessas áreas é abundante e ocorre em densidades muito baixas. Atualmente, a população é estimada em 15.000 indivíduos adultos e esta população provavelmente vai sofrer um declínio em torno de 10% durante a próxima década principalmente devido à perda e degradação de seu habitat. A espécie quase se classificou como ameaçada segundo o critério C1, definido pela estimativa de declínio populacional de no mínimo 10% em 10 anos ou em três gerações (IUCN, 2009).

Speothos venaticus é uma espécie naturalmente rara ao longo de toda a sua área de distribuição. As principais ameaças à espécie são o desmatamento, tanto das áreas florestadas quanto do Cerrado, e a fragmentação e alteração de habitats. Doenças transmitidas por animais domésticos também representam uma ameaça considerável a algumas populações, pois a espécie aparenta ser bastante sensível a uma série de doenças. Como sua dieta é altamente carnívora e concentrada em animais como pacas e cutias, que são espécies caçadas também pelos seres humanos, a caça das mesmas pode representar uma redução ou perda da fonte

alimentar, impactando negativamente este canídeo raro (OLIVEIRA; DALPONTE, 2008).

No Brasil, atualmente, existem apenas trinta e dois animais mantidos em cativeiro e 120 no exterior (informação verbal)¹. As instituições que desenvolvem trabalhos de conservação com o cachorro-vinagre contam com o Protocolo de Manejo do Cachorro-vinagre e com o seu *Studbook*, que concentra informações e recomendações para a manutenção da espécie em cativeiro (CHIEREGATTO et al., 2005).

O primeiro canídeo brasileiro a ter um Plano de Manejo foi o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). O Plano de Manejo para o Lobo Guará foi implantado em 1989. Em 1995 criou-se o Grupo de Trabalho de Canídeos (GTC), reconhecido oficialmente pelo IBAMA por meio da portaria nº 1883, de 25/09/1995. A partir desta data, o GTC passou a gerenciar as demais espécies de cães selvagens brasileiros, além do lobo-guará. O funcionamento de um plano de manejo se dá por meio da organização de um comitê que congrega sete especialistas (estando representados no comitê órgãos como zoológicos, ONGs e IBAMA). Esse comitê tem caráter consultivo, atuando junto às instituições mantenedoras, sugerindo a elas um manejo reprodutivo adequado, sempre levando em conta a integridade genética de cada espécie, dietas apropriadas, cuidados com filhotes, programas de imunização contra doenças, programas de educação ambiental, integração com pesquisadores em natureza, pesquisa, conservação, livro de registro genealógico, elaboração de protocolos de manejo entre outras atividades. Desde que foi iniciado o programa, as pesquisas, tanto em natureza quanto em cativeiro, tiveram um grande aumento, o que resultou na melhoria da qualidade de vida desses animais, principalmente em cativeiro (RAMOS JR. et al., 2003).

O *studbook* é o livro de registro da árvore genealógica de uma espécie e compreende o registro de todos os animais, vivos e mortos que descendem de um grupo de ancestrais selvagens (fundadores) nascidos na natureza. O primeiro livro de registro genealógico para uma espécie selvagem foi publicado nos anos 20 para o bisão europeu (*Bison bonasus*). Os *studbooks* são extensas bases de dados de linhagens de animais e desempenham um papel muito importante nos planos de manejo de espécies ameaçadas de extinção. Atualmente existem vários *studbooks*,

¹ Informação fornecida por Chieregatto, Protocolo de Manejo do Cachorro-vinagre, em 2009.

tanto regionais (compilação de informações de um dado país ou região), quanto internacionais (possuem informações em nível mundial). Dentre os canídeos brasileiros, duas espécies possuem *studbook* regional e internacional: o lobo-guará e o cachorro-vinagre (RAMOS JR. et al., 2003).

Em 1979 sob o gerenciamento do zoológico de Copenhagen foi publicado o primeiro *studbook* internacional para o cachorro-vinagre e em 2002 o zoológico de São Bernardo do Campo organizou o primeiro regional. De acordo com o *Studbook* Internacional Cachorro do Mato Vinagre 2001 existem 129 espécimes mantidos em 37 instituições no Brasil e no exterior (RAMOS JR. et al., 2003).

As medidas para a conservação da espécie implicam maior proteção aos seus habitats naturais, não apenas dentro de Unidades de Conservação. Dadas as características biológicas da espécie, ela necessita de áreas muito grandes (mega-reservas) para manter populações geneticamente viáveis. Dessa forma, a conectividade entre as áreas protegidas, incluindo reservas indígenas, é vital. Como os dados biológicos sobre *S. venaticus* são praticamente desconhecidos em vida livre, pesquisas científicas sobre a sua biologia e ecologia básica, assim como a sua distribuição geográfica, são também importantes. A fiscalização das áreas protegidas representa mais uma medida estratégica à sua conservação (OLIVEIRA; DALPONTE, 2008).

1.4 Glicocorticóides e estresse

Os glicocorticóides secretados pelas glândulas adrenais regulam uma série de processos metabólicos que permitem que os animais mantenham suas funções em um ambiente em constante mudança. Os principais efeitos dos corticosteróides são na regulação de processos metabólicos para a manutenção da nutrição celular, regulação dos níveis de sódio e potássio e controle do volume do fluido extracelular. Os glicocorticóides estão associados à adaptação às mudanças, que, em geral, ocorrem em minutos, dias, semanas ou até mesmo, em meses. São essenciais para o bem-estar animal e manutenção da vida (MARTIN; CRUMP, 2003).

O cortisol e a corticosterona são os principais glicocorticóides produzidos e secretados pelo córtex da adrenal. O cortisol predomina em humanos, cavalos,

porcos, ovelhas, cães e gatos, enquanto a corticosterona predomina em coelhos, ratos e camundongos (MARTIN; CRUMP, 2003).

Existe pouco consenso na definição do estresse. Uma definição comumente usada é a ruptura ou o risco de ruptura da homeostase, causados por influências do ambiente externo através dos estímulos que promovem a resposta do estresse, denominados como agentes estressores. Este processo desencadeia uma série de respostas do organismo na tentativa de recuperar o equilíbrio interno, a fim de superar as condições adversas (CLARKE et al., 1988; WASSER et al., 1993; MÖSTL; PALME, 2002).

O estresse não é necessariamente negativo e, inclusive pode possuir um efeito positivo na condição corporal tornando a energia disponível para o animal em situações críticas (MOBERG, 2000; BLAS et al., 2007). Quando mamíferos são submetidos a um nível baixo de estresse ou de curta duração, somente as reservas biológicas serão necessárias para lidar com o estresse, e essas reservas podem ser rapidamente recuperadas com o restabelecimento da homeostase sem que seja preciso um período de recuperação significativa (MOBERG, 2000). Já um estresse severo pode resultar em doenças, e altos níveis de estresse crônico causam efeitos deletérios no bem-estar e na saúde do animal (SAPOLSKY, 1987; JOHNSON et al., 1991). Sob efeito dos agentes estressores, o organismo reage ativando um complexo repertório de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais que, quando inadequadas, excessivas e/ou prolongadas, podem afetar o comportamento e ter conseqüências adversas nas funções fisiológicas, tais como crescimento, metabolismo, circulação, resposta imunológica e resposta inflamatória, conseqüentemente diminuindo a aptidão do indivíduo para a reprodução (YOUNG et al., 2001; MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004).

1.5 Estresse e reprodução

A atividade aumentada da adrenal, mensurada pela elevada concentração de glicocorticóides é comum em animais selvagens submetidos a estresse e pode influenciar negativamente as capacidades reprodutivas dos animais. Já se

demonstrou que o estresse causa efeitos deletérios na função gonadal em humanos e em uma grande variedade de animais domésticos (WILDT, 1996).

O estresse pode alterar a função gonadal, pois a secreção aumentada de glicocorticóides afeta a síntese e secreção de gonadotrofinas, podendo, além de causar alterações no ciclo reprodutivo normal, causar distúrbios de implantação e desenvolvimento fetal, diminuindo assim o sucesso reprodutivo (RIVIER; RIVEST, 1991). Em mamíferos expostos a altos níveis de estresse também ocorre a alteração do comportamento reprodutivo, uma das causas de infertilidade. Geralmente, o quadro é reversível com a eliminação do agente estressor e com a adequação de condições de alojamento e manejo à espécie (WILDT, 1996).

1.6 Dosagem de metabólitos de glicocorticóides fecais

A avaliação de metabólitos de glicocorticóides na urina ou nas fezes permite a realização de estudos de padrões endócrinos em indivíduos, populações ou espécies sem causar perturbações ao animal. Em meados da década de 80, técnicas não-invasivas de monitoramento endócrino foram adotadas para o estudo da reprodução em diversas espécies de primatas, ungulados e aves mantidos em cativeiro (MONFORT, 2003). Em 1979, Hodges e colaboradores foram pioneiros avaliando metabólitos de estrógeno e hormônio luteinizante a partir da urina de diversas espécies de primatas.

O monitoramento de metabólitos de esteróides em fezes foi primeiramente descrito em humanos por Adlercreutz e Martin (1976). Depois o método foi aplicado em éguas (BAMBERG et al., 1984) e vacas (MÖSTL et al., 1984), antes de ter sido utilizado em uma espécie de primata (RISLER et al., 1987). O primeiro estudo com monitoramento não-invasivo de hormônios da adrenal em uma espécie selvagem foi publicado em 1991 (MILLER et al., 1991).

A concentração de corticosteróides, ou de seus metabólitos, pode ser mensurada em fluidos corporais ou excreções, como sangue, urina, fezes e saliva. A análise hormonal em fluidos corporais ou produtos de excreção fornecem vasta informação sobre o estado endócrino do animal. A avaliação através do sangue geralmente é utilizada no momento de uma avaliação física geral (WILDT, 1996). A

dosagem de glicocorticóides no sangue apresenta resultados de difícil interpretação biológica, pois além das variações ao longo do dia, devido ao ciclo circadiano de liberação de ACTH, a coleta de sangue, em si, requer a manipulação do animal, evento potencialmente estressante (MOSTL; PALME, 2002). A secreção de esteróides é um processo dinâmico, as concentrações de hormônios circulantes e excretadas variam marcadamente em dias, horas ou até minutos (WILDT, 1996), portanto uma única amostra sanguínea representa a concentração de glicocorticóides naquele momento (MONFORT et al., 1993,1998), enquanto os níveis fecais representam metabólitos acumulados ao longo de um determinado período (MÖSTL; PALME, 2002). Deste modo, o monitoramento de metabólitos hormonais na urina ou nas fezes garante que a informação endocrinológica não seja comprometida pelo estresse momentâneo da contenção física ou anestesia (WILDT, 1996).

Essa abordagem, que tem sido amplamente utilizada em diversas espécies selvagens, como cachorros selvagens africanos (*Lycaon pictus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), urso (*Helarctos malayanus*), hienas (*Crocuta crocuta*), orangotango (*Pongo pygmaeus*), chimpanzé (*Pan troglodytes*) e diversas espécies de felídeos (MONFORT et al., 1993; BROWN et al., 1994, 1995, 1996; VELLOSO et al., 1998; BERBARE, 2004; MORATO et al., 2004; SCHWARZENBERGER et al., 2004; YOUNG et al., 2004; PIZZUTTO et al., 2008a,b; VAN METER et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2009), possui grande potencial para o estudo, principalmente por ser não invasiva, sendo a dosagem de metabólitos hormonais nas fezes o método de escolha para acessar a função endócrina em animais cativos e de vida livre (SCHWARZENBERGER et al., 1996; WILDT, 1996).

A dosagem de metabólitos de glicocorticóides fecais tem sido utilizada para avaliar o estresse associado à dominância, agressão ou ao impacto da interferência humana no bem-estar animal, integrando também aspectos comportamentais e genéticos, fornecendo dados importantes para a conservação e manejo de espécies selvagens (MONFORT, 2003) sendo utilizada em estudos de ecologia, biologia da conservação e bem-estar animal (GOYMANN et al., 1999).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são descritos a seguir.

3.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar os perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais através da técnica de radioimunoensaio em cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro e suas possíveis implicações na função reprodutiva.

Desta maneira, visou também contribuir para o manejo da espécie em cativeiro e oferecer bases para a realização de pesquisas complementares com a espécie.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar a validação fisiológica através do desafio com ACTH;
- 2) Analisar o perfil de metabólitos de glicocorticóides fecais em cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) mantidos em cativeiro;
- 3) Verificar possíveis diferenças no perfil de metabólitos de glicocorticóides fecais de machos e fêmeas;
- 4) Verificar possíveis diferenças no perfil de metabólitos de glicocorticóides fecais entre a fêmea alfa e os outros indivíduos.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho são descritos a seguir.

3.1 Animais

No criadouro onde foi realizada a pesquisa é mantida uma matilha composta por doze animais, sendo um casal alfa, quatro machos da primeira ninhada do casal, nascidos em 13 de dezembro de 2006 e três fêmeas e três machos nascidos em 19 de dezembro de 2007. Todos os animais possuem identificação por microchip. Com exceção da fêmea alfa (F1), os outros indivíduos não possuem peculiaridades na coloração da pelagem ou tamanho que permitam o reconhecimento individual. Destes foram escolhidos quatro machos adultos e duas fêmeas adultas, identificados como M1, M2, M3, M4, F1 e F2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Número do microchip, data de nascimento ou entrada no criadouro e sexo dos animais Campina Grande do Sul - 2008

| Nº do microchip | Data de nascimento | Sexo |
|-----------------|-----------------------|------------|
| 61959 | Entrada em 13/09/2006 | Fêmea (F1) |
| 79351 | Entrada em 03/06/2005 | Macho |
| 302775 | 13/12/2006 | Macho (M1) |
| 245730 | 13/12/2006 | Macho (M2) |
| 280608 | 13/12/2006 | Macho (M3) |
| 296851 | 13/12/2006 | Macho (M4) |
| 389325 | 19/12/2007 | Fêmea (F2) |
| 399629 | 19/12/2007 | Fêmea |
| 3959099 | 19/12/2007 | Fêmea |
| 402750 | 19/12/2007 | Macho |
| 404543 | 19/12/2007 | Macho |
| 411090 | 19/12/2007 | Macho |

4.1.1 Alojamento dos animais

A pesquisa foi realizada no Criadouro Onça-pintada, localizado em Campina Grande do Sul – Paraná/Brasil, no período entre 8 de setembro e 1 de novembro de 2008.

Os animais são mantidos em um recinto de 1.300 m², composto de uma área cimentada com quatro cambiamentos, onde é realizada a alimentação diária, e uma área de vegetação natural. O recinto possui vegetação abundante, um riacho, duas tocas e uma plataforma suspensa para observação (Figuras 4, 5, 6 e 7).



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 4 – Cambiamento



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 5 – Plataforma suspensa



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 6 – Toca



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 7 – Animal próximo ao riacho

4.1.2 Dieta

A alimentação oferecida diariamente para a matilha consiste em três quilos de carne bovina, moela ou pescoço de frango, 12 bananas, cerca de meio quilo de mamão e meio quilo de ração para cães. Ocasionalmente, são oferecidos ovos cozidos e frutas da estação, como manga. A dieta é suplementada com Aminomix® (suplemento vitamínico mineral) e carbonato de cálcio em dias alternados. E, segundo relato dos tratadores, os animais eventualmente caçam aves, como o jacu (*Penelope obscura*), que vem se alimentar dos restos de frutas dentro do recinto. O horário de alimentação é entre 14h00 e 16h00 de segunda a sexta-feira. Aos sábados e domingos a alimentação é fornecida entre 06h00 e 08h00. A água é oferecida *ad libitum*.

4.2 Condicionamento dos animais

A fim de possibilitar a administração direta do alimento com o marcador na boca de cada animal foi realizado condicionamento dos animais através da técnica de condicionamento operante. Segundo Skinner (2003) o condicionamento operante é um mecanismo que premia uma determinada resposta de um indivíduo até ele ficar condicionado a associar o prêmio à ação. O condicionamento operante é um mecanismo de aprendizagem de um novo comportamento, um processo que Skinner (2003) chamou de modelagem. O instrumento fundamental de modelagem é o reforço. Existem dois tipos de reforço: positivo e negativo. O reforço positivo é algo que, ocorrendo juntamente com uma ação, tende a aumentar a probabilidade de a ação acontecer novamente. Para o reforço positivo utiliza-se algo que o sujeito do condicionamento quer receber, como alimento, carinho ou elogios. O reforço negativo é algo que o sujeito evita, como por exemplo, um som desagradável. Através do reforço positivo comportamentos que já ocorrem, independente da frequência, podem ser intensificados (PRYOR, 1999).

Foi escolhida a carne bovina para o condicionamento dos animais por ser um dos itens da dieta, deste modo evitando alterações que poderiam ser fatores

estressantes. A administração da carne com marcador foi estabelecida em um horário diferente do horário habitual da alimentação já que o alimento deixa de ser um reforço positivo se o animal já se alimentou, conforme afirma Pryor (1999). Cabe relatar que o horário que precede a alimentação habitual é um momento em que se nota agitação entre os animais, podendo dificultar a execução das técnicas de condicionamento e a própria administração da carne marcada.

Durante uma semana foi realizado um processo de aproximação que consistia em permanecer sentada, sem realizar movimentos bruscos e em silêncio em frente à tela do câmbio durante uma hora entre 08h00 e 10h00. Além disso, durante esse processo é recomendado evitar perfumes e usar a mesma roupa todos os dias (informação verbal)². Inicialmente os animais não se aproximaram mais de dois metros de distância da tela, permaneceram olhando e farejando. No terceiro dia foram arremessados pedaços de carne sem marcador de cima da plataforma. A maioria dos animais se afastou com a movimentação da pesquisadora ou após a carne cair no chão. Apenas um animal não apresentou tal comportamento.

No quarto dia a carne foi oferecida através da tela do câmbio, tendo sido utilizado um apito ultra-sônico antes de a carne ser oferecida. O apito ultra-sônico é comumente utilizado no treinamento de cães domésticos para o chamado e poderia ser uma ferramenta a mais no condicionamento dos animais (informação verbal)². Tal processo foi repetido nos três dias seguintes. Porém, os animais entravam no câmbio independentemente do uso do apito, portanto tal instrumento deixou de ser utilizado durante a pesquisa.

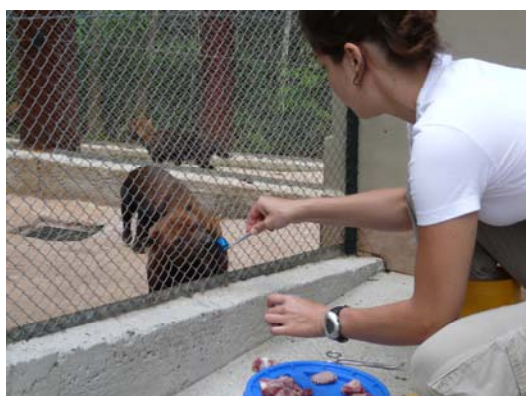
No sexto dia a fêmea F1 pegou a carne diretamente na tela e nos dias seguintes um macho e uma fêmea também se aproximaram da tela para receber a carne na boca, portanto a aplicação do condicionamento gerou o resultado esperado. Levando em consideração que os animais não estavam habituados a visita de pessoas estranhas rotineiramente, em pouco tempo foi possível administrar o marcador através dos pedaços de carne. O único animal que levou mais tempo para se adaptar foi um dos machos (M4).

Para os seis animais, durante o período de colheita de amostras, foi oferecida a carne com o marcador sempre através da tela do câmbio com o auxílio de uma pinça (Figura 8). Quando do preparo das carnes com os marcadores (corante e

² Informação fornecida por Bosso, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, em 2008.

miçangas) sempre havia pedaços de carne sem marcador algum. Estes pedaços eram utilizados para afastar os outros animais envolvidos daquele que estava recebendo o seu pedaço no momento (Figura 9).

É fundamental que seja levada em consideração a segurança do treinador e do animal. O condicionamento foi conduzido pelo lado de fora do recinto, utilizando-se o método chamado de contato protegido. O conceito de contato protegido foi desenvolvido para o manejo de elefantes em cativeiro com os objetivos de aumentar a segurança do tratador ou treinador e o bem-estar dos animais, já que o método utilizado anteriormente, onde havia livre contato entre homem e animal, envolvia punição física. No contato protegido existe uma barreira entre o treinador e o animal. Essa barreira impede que o treinador esteja dentro do território do animal assumindo uma posição de dominância social (DESMOND; LAULE, 1991), expondo-se a possíveis ataques do animal envolvido ou até mesmo dos outros membros do grupo.



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 8 – Administração da carne com corante azul para F1



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 9 – Administração da carne com e sem marcadores

4.3 Identificação dos animais

Foi realizada contenção física com o uso de puçá para leitura do microchip e identificação de cada animal com bastões marcadores de longa duração, designados para uso em bovinos e ovinos (Raidex®), nas cores verde, roxo e laranja. Cada cor foi utilizada em uma ou duas regiões do corpo, possibilitando assim a utilização de apenas três cores para identificar os seis animais.

A marcação realizada na pelagem dos animais foi progressivamente desaparecendo. Antes que não houvesse mais nenhum sinal da marcação foi

realizada nova contenção física e os animais foram identificados através de áreas tricotomizadas (Figura 10), nas regiões cervical dorsal, caudal dorsal e lateral dos membros anteriores e posteriores. O único animal que não recebeu a marcação foi a fêmea F1, por possuir uma marcação natural (pelagem mais clara na região cervical dorsal), facilmente identificável (Figura 11).



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 10 – Macho M3



Fonte: Suzana Bezzegh Hirata, 2008.
Figura 11 – Fêmea F1 (à frente)

4.4 Colheita das amostras

As colheitas das amostras fecais foram realizadas diariamente durante 45 dias consecutivos (período de estudo) pela manhã, entre 08h00 e 10h00. Nesse horário, muitas vezes os animais encontravam-se ainda dentro das tocas, portanto a probabilidade de contato entre a pesquisadora e a matilha dentro de seu território era diminuída.

O volume total de fezes colhidas de cada animal diariamente era homogeneizado manualmente e uma amostra acondicionada em um saco plástico vedado identificado e datado. As amostras foram mantidas a - 20°C até o momento da análise.

Após a colheita e armazenamento das amostras fecais eram fornecidos pedaços de carne bovina com os marcadores (corante e miçangas). Inicialmente os animais receberam corante alimentício, disponível no mercado para alimentação humana (Arcolor®) nas cores azul, verde, vermelho, roxo, prateado e dourado, misturado ao alimento habitual (carne) no dia anterior ao da colheita a fim de possibilitar a identificação das fezes. Não foi possível localizar as fezes coradas em

vermelho, roxo, prateado e dourado. As quantidades desses corantes foram aumentadas de meia colher de café para uma colher de sobremesa cheia, mas mesmo assim não foi possível identificar estes corantes nas fezes. Por este motivo, iniciou-se a administração de miçangas plásticas nas cores branca, vermelha, amarela, verde e rosa. As miçangas, esferas plásticas de aproximadamente 1,5mm de diâmetro, são facilmente encontradas em lojas de armarinho ou de materiais para artesanato. As miçangas mostraram-se eficazes para a identificação das amostras. Foi mantida a administração do corante alimentício azul para a fêmea F1, pois esta cor era possível de ser identificada nas fezes.

Diferentes métodos de identificação de amostras já foram utilizados em estudos com glicocorticóides fecais, como os corantes, em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VELLOSO et al., 1998) e primatas (STAVISKY et al., 2001) e grãos de centeio, em hienas (*Crocuta crocuta*) (GOYMANN et al., 1999). DeMatteo (2004) utilizou miçangas plásticas coloridas em cachorro-vinagre. A identificação individual das amostras é necessária para monitorar as mudanças nos níveis de glicocorticóides durante o período de colheita em cada animal devido às variações entre indivíduos de diferentes idades ou posição social (LYNCH et al., 2002).

O transporte das amostras até São Paulo foi realizado em uma caixa térmica com capacidade para 40 litros com seis quilos de gelo seco, conservando as amostras em temperatura adequada, conforme recomenda Keay et al. (2006).

4.5 Teste de desafio ao ACTH: validação fisiológica

O teste foi realizado em uma fêmea adulta (F2), com a colheita de amostras fecais desde um dia antes até três dias após aplicação única de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico).

O produto utilizado foi o Synacthen Depot™ (1mg/ml, Novartis Pharma), cujo princípio ativo é o tetracosactídio, um polipeptídeo sintético que contém os primeiros 24 ácidos aminados do ACTH natural. O produto possui atividade prolongada devido à adsorção do tetracosactídio em um complexo inorgânico de zinco, possibilitando a sua liberação gradual. O fármaco possui 100 UI de ACTH/mg. A dose utilizada foi de 0,2 ml/kg (2 UI de ACTH/kg de peso vivo). Essa dose foi estimada com base em

protocolos de estimulação da adrenal para outras espécies (GOYMANN, 1999; WASSER et al., 2000), uma vez que não se encontra tal protocolo para *Speothos venaticus*.

A fim de padronizar os estudos realizados na área e permitir que sejam comparados, Keay et al. (2006) recomenda que seja realizado o teste de desafio ao ACTH para a validação fisiológica do ensaio. O desafio simula uma real situação de estresse agudo no animal, o ACTH age na glândula adrenal ocasionando a liberação de glicocorticóides, elevando seus níveis plasmáticos, com posterior retorno aos níveis basais. O aumento seguido de queda é refletido nas fezes após a metabolização e excreção destes hormônios (WASSER et al., 2000), sendo um dos métodos mais utilizados para validação fisiológica da dosagem de corticosteróides fecais (MONFORT et al., 1998; GOYMANN et al., 1999; TERIO et al., 1999; MORROW et al., 2002).

Estudos em diferentes espécies de carnívoros apontaram que a excreção dos metabólitos de glicocorticóides nas fezes ocorre entre 24 e 72 horas após a administração do ACTH independente da forma de apresentação do fármaco, normal, concentrado ou de deposição (MONFORT et al., 1998; GOYMANN et al., 1999; DIAS, 2006).

O animal teve o peso estimado em 4 kg, portanto foi aplicado 0,8 ml do fármaco por via intramuscular no membro posterior. O animal foi submetido à contenção física com o uso de puçá para a realização do procedimento. A aplicação foi realizada por volta das 09h30.

4.6 Dosagens hormonais

As análises foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As concentrações de metabólitos de glicocorticóides foram mensuradas por radioimunoensaio utilizando-se conjunto diagnóstico comercial para dosagem de corticosterona em ratos com duplo anticorpo (*MP Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, USA*).

4.6.1 Processamento das amostras para extração hormonal

Encontram-se na literatura diversos protocolos de extração hormonal em fezes, sendo que os principais pontos testados nesses protocolos são: a utilização de amostras fecais úmidas ou liofilizadas, o tipo de solvente orgânico empregado e suas concentrações, número de agitações e centrifugações realizadas para separação dos hormônios presentes no material fecal. No Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH), têm-se estudado diferentes protocolos de extração de hormônios fecais em diversas espécies animais.

A metodologia empregada na extração dos metabólitos foi de acordo com a técnica descrita por Graham et al. (2001). A escolha dessa metodologia de extração hormonal está baseada nos resultados obtidos por Chelini (2006) que testou os três protocolos mais utilizados, sendo que a taxa de recuperação hormonal obtida para progesterona foi de 80,5%, indicando a eficiência desse protocolo, o que é também esperado para o cortisol.

No presente estudo, as amostras foram transferidas dos sacos plásticos para tubos de polipropileno devidamente identificados para o processo de liofilização e posterior pesagem. Após a liofilização, fragmentos de ossos não digeridos e materiais vegetais foram removidos. Então, conforme sugerido por Graham et al. (2001), alíquotas de 0,2g de fezes liofilizadas foram colocadas em tubos de 15ml e adicionados 5ml de metanol (Metanol, P.A. - Merck®) a 80% (80% metanol: 20% água destilada). Os tubos foram, em seguida, fechados e agitados suavemente em um homogeneizador de sangue (AP22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 15 horas. Em passo subsequente, as amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos e o sobrenadante resultante transferido para tubos de polipropileno e conservado a -20°C até a realização dos ensaios hormonais. Para esta etapa, as amostras foram diluídas em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0], na proporção de 1/10.

4.6.2 Validação laboratorial

A validação laboratorial foi realizada utilizando-se o método de paralelismo. O paralelismo utilizando matriz íntegra indica se o material utilizado está interferindo na ligação antígeno-anticorpo. Foi utilizado um *pool* de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva-padrão). Nesta amostra foram adicionados valores conhecidos dos hormônios estudados a fim de aproximá-los dos pontos da curva-padrão, visando posterior análise comparativa pelo método de regressão linear.

4.7 Análise estatística

Todas as variáveis foram primeiramente analisadas quanto a sua distribuição pelos testes de Kolmogorov-Smirnov (teste KS), para verificação de normalidade e o teste de Bartlett para verificação de homogeneidade de variâncias, tendo sido consideradas compatíveis com a normalidade.

Sendo assim, os dados encontram-se expressos em função de suas médias e respectivos desvios-padrões. As comparações estatísticas entre as médias foram determinadas pela análise de variância e o teste de Tukey com um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) (BERTOLDO et al., 2008). Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do programa *Stat View™* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Os picos individuais de glicocorticóides fecais foram obtidos a partir da exclusão seriada dos valores que excedessem a média total + 2,0 desvios-padrões conforme proposto por Brown, Terio e Graham (1996), tendo sido necessária uma única etapa de exclusão, ou seja, na segunda série já não havia mais valores a serem excluídos.

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir.

5.1 Controle de qualidade do ensaio hormonal

O controle de qualidade dos ensaios de RIE foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 5% e do inter-ensaio, inferior a 10%. A sensibilidade mínima detectada foi de 4,49 pg/ml (Tabela 2).

Tabela 2 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de corticosterona fecais - São Paulo – 2009

| Ensaio | Controle | | | | CPM | CPM | Cap | L.N.E | L.N.E | Sensibilidade | CV | CV |
|--------------------|----------|--------|---------|---------|------------|-------|--------------|--------|-------|---------------|----------------|---------------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | ponto 0 | total | Lig. B/B0 | CPM | (%) | % (dose) | Intra Baixo | Intra Alto |
| 1 | 112.25 | 622.85 | 127.45 | 670.45 | 18437 | 30695 | 60% | 382.00 | 1.24% | 91(4,49) | 8.97% | 5.21% |
| 2 | 122.45 | 678.37 | 107.64 | 689.92 | 17899 | 29864 | 60% | 316.00 | 1.06% | 91(3,39) | 9.10% | 1.19% |
| CV Inter ensaio | 117.35 | 650.61 | 117.545 | 680.185 | | | | | | | 0.12% | 3.14% |

Legenda: COM - contagem por minuto

L.N.E - ligação não específica

CV - coeficiente de variação

5.2 Validação laboratorial

Os valores das curvas obtidas a partir das diluições do hormônio marcado em um *pool* de amostras fecais para os metabólitos de glicocorticóides apresentaram alta e significativa correlação com as curvas padrões dos conjuntos diagnósticos (Gráfico 1). O valor de $r=R^2$ foi 0,95 para os metabólitos fecais de glicocorticóides.

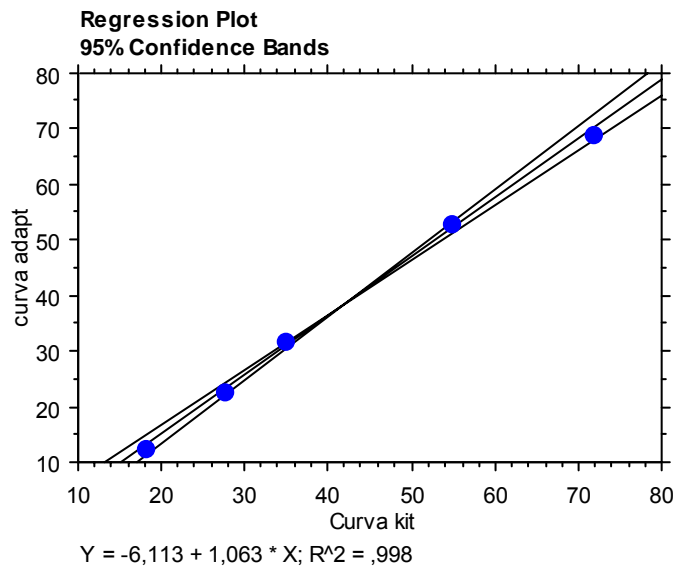


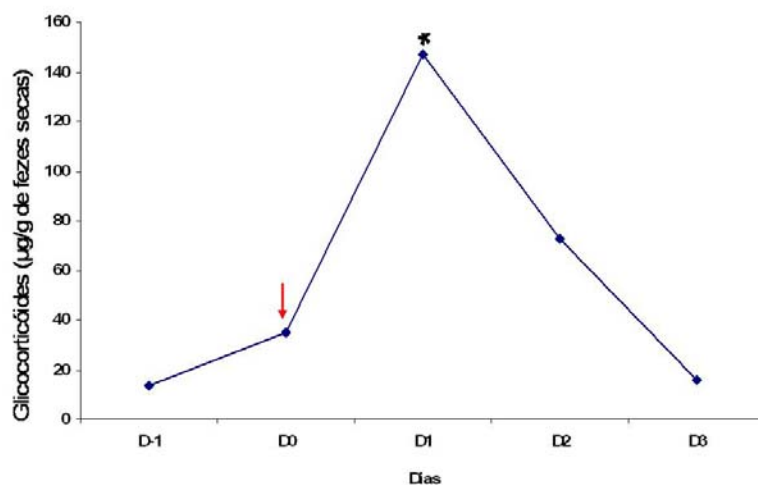
Gráfico 1 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para glicocorticóides fecais

5.3 Desafio com ACTH

O desafio com ACTH, para a validação fisiológica do estudo, foi realizado em uma fêmea adulta (F2). A média e o desvio-padrão dos valores de metabólitos de glicocorticóides fecais para a fêmea F2 durante o período de observação foram $16,95 \pm 11,70$ $\mu\text{g/g}$ de fezes secas. Um dia após a aplicação do ACTH (D1) observou-se um pico no valor de $147,14$ $\mu\text{g/g}$ de fezes secas, seguido de uma queda conforme o esperado, validando assim o estudo do ponto de vista fisiológico.

A dose utilizada, $0,2$ ml/kg (2 UI de ACTH/kg de peso vivo), havia sido estimada com base em protocolos de estimulação da adrenal para outras espécies. Constatou-se então, com a aplicação deste teste, a eficácia da dose utilizada para *Speothos venaticus*.

O gráfico 2 mostra as concentrações de metabólitos de glicocorticóides ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas) obtidas um dia antes e três dias após a aplicação do ACTH (D0).



Legenda: ↓ aplicação do ACTH, * pico

Gráfico 2 - Representação gráfica do perfil de metabólitos de glicocorticóides fecais (µg/g de fezes secas) para a fêmea F2, submetida ao desafio com ACTH

5.4 Metabólitos de glicocorticóides fecais

Foi obtido um total de 100 amostras, sendo 24 para F1, 17 para F2, 24 para M1, 11 para M2, 17 para M3 e sete para M4 (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de amostras, média das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais, desvio-padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais (µg/g de fezes secas) para os animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4 Campina Grande do Sul – 2008

| Animal | Nº de amostras | Média | Desvio-padrão | Mín./máx. |
|--------|----------------|-------|---------------|------------|
| F1 | 24 | 23,19 | 12,33 | 7,55/65,09 |
| F2 | 17 | 16,95 | 11,70 | 7,33/51,50 |
| M1 | 24 | 14,69 | 8,37 | 2,54/29,39 |
| M2 | 11 | 13,98 | 7,88 | 6,06/28,03 |
| M3 | 17 | 21,58 | 13,30 | 5,49/49,38 |
| M4 | 7 | 13,26 | 7,43 | 2,32/23,15 |

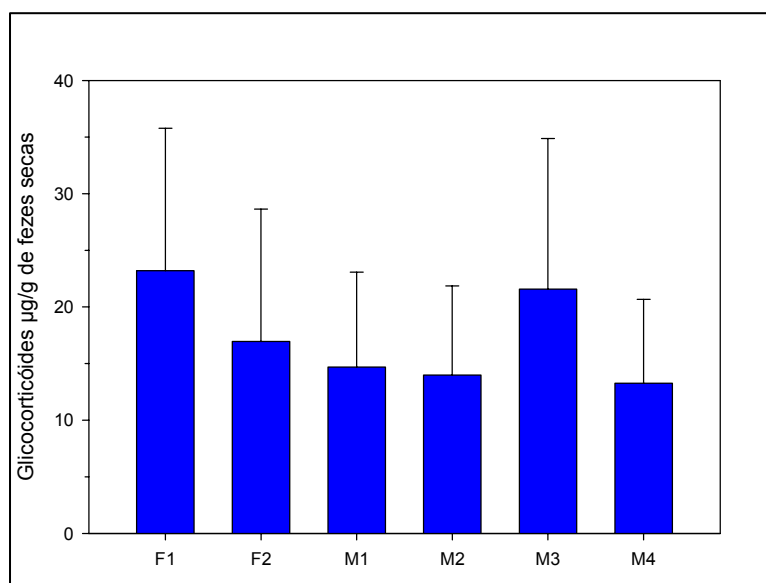


Gráfico 3 - Representação gráfica das médias e desvios-padrões das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em µg/g de fezes secas dos animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4, durante o período de estudo (não houve diferença significativa entre os animais, $\alpha = 0,05$)

O número de amostras obtido foi condicionado por uma série de fatores, como a ampla extensão do recinto, o pisoteio das fezes pelos próprios animais e a diluição pela água da chuva, o que, segundo Spercoski (2007) poderia levar a uma “lavagem” das amostras e desta forma reduzir as concentrações de metabólitos de glicocorticóides. Devido a esses fatores houve um menor aproveitamento das amostras e diminuição da frequência de localização das mesmas.

A exposição da amostra fecal a fatores ambientais como chuva e calor excessivo pode afetar as concentrações de metabólitos de glicocorticóides nas amostras fecais. Em condições controladas, amostras fecais de cervos da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) expostas à simulação de chuva tiveram suas concentrações de metabólitos de glicocorticóides aumentadas em relação às amostras fecais não expostas. O aumento da umidade nas fezes favoreceria o desenvolvimento de microorganismos que podem converter bioquimicamente glicocorticóides fecais em metabólitos com afinidade ao anticorpo utilizado na técnica de dosagem (radioimunoensaio de duplo anticorpo, anti-corticosterona). Outros processos bioquímicos, como a clivagem não microbiológica de grupos laterais conjugados na molécula de glicocorticóide ou a liberação de metabólitos de

glicocorticóides fecais de micelas lipídicas poderiam contribuir para o aumento nas concentrações de metabólitos de glicocorticóides nas amostras fecais (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2003). A média de umidade do ar, mensurada através de um termo-higrômetro digital (Incoterm®), foi de 87,3% durante o período de estudo, devido à alta frequência de chuvas. Apesar de as amostras excessivamente úmidas não terem sido colhidas, a obtenção de amostras em uma estação seca seria interessante para comparação, a fim de verificar se os resultados obtidos por Millsbaugh e Washburn (2003) podem ser observados em estudos a campo.

Segundo Terio et al. (1999) o calor excessivo leva a degradação das moléculas de metabólitos de glicocorticóides das amostras fecais expostas em relação às amostras não expostas ao calor. Durante o período do estudo as temperaturas mínimas e máximas mensuradas através de um termo-higrômetro digital (Incoterm®) permaneceram entre 10 e 21°C (média de 16°C), possivelmente não interferindo nas concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais.

As amostras foram colhidas diariamente pela manhã, como já explicitado anteriormente, portanto o tempo de exposição das fezes ao ambiente foi sempre inferior a 24 horas. Além disso, em muitas ocasiões as fezes foram colhidas imediatamente após a defecação, eliminando possíveis alterações causadas pela exposição a fatores ambientais.

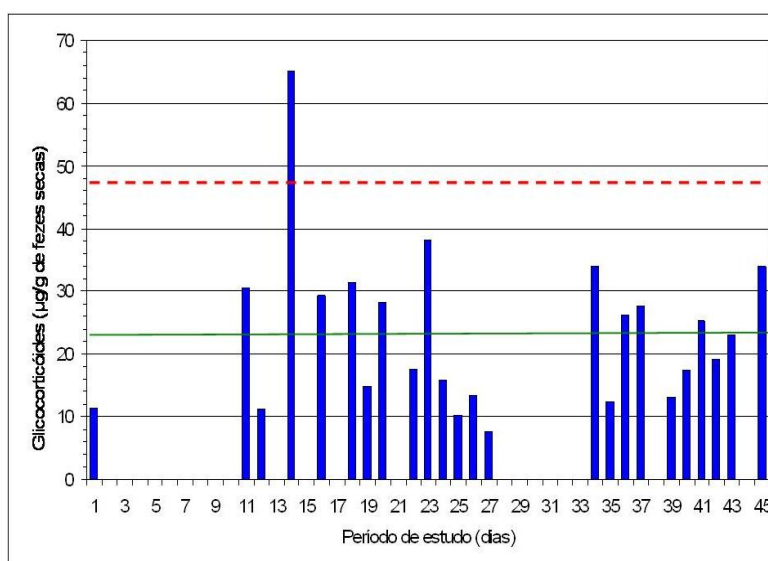
Todas as amostras foram devidamente homogeneizadas no momento da colheita, pois outro fator que pode interferir nas concentrações de metabólitos de glicocorticóides de uma amostra fecal é a distribuição destas substâncias na massa fecal. Estudos da distribuição de metabólitos de outros esteróides, como progestinas e estrógenos, na massa fecal de guepardo (*Acinonyx jubatus*), leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), leopardo das neves (*Panthera uncia*) (BROWN et al., 1994) e elefante africano (*Loxodonta africana*) (WASSER et al., 1996) indicaram que estas substâncias não estão distribuídas de forma uniforme no bolo fecal, sendo que a porção interna da massa fecal possui concentrações menores que a porção externa. Foi reportado, inclusive, que existem diferenças nas concentrações de metabólitos de glicocorticóides entre subamostras da mesma massa fecal (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2003).

No presente estudo os animais encontravam-se expostos aos mesmos fatores ambientais, sob iguais condições de manejo e apresentavam a mesma condição corporal, portanto as análises das concentrações de metabólitos de glicocorticóides

fecais não mostraram diferenças significativas nos perfis individuais. Houve picos em F1, F2, M1 e M3, porém quando aplicado o teste de comparação entre as médias das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais não se observaram diferenças significativas entre os animais. Possíveis variações entre os indivíduos poderiam estar associadas tanto a fatores biológicos como sexo, idade, condição corporal, estado reprodutivo e dieta, como a fatores ambientais e mesmo a possíveis artefatos da técnica de monitoramento (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004).

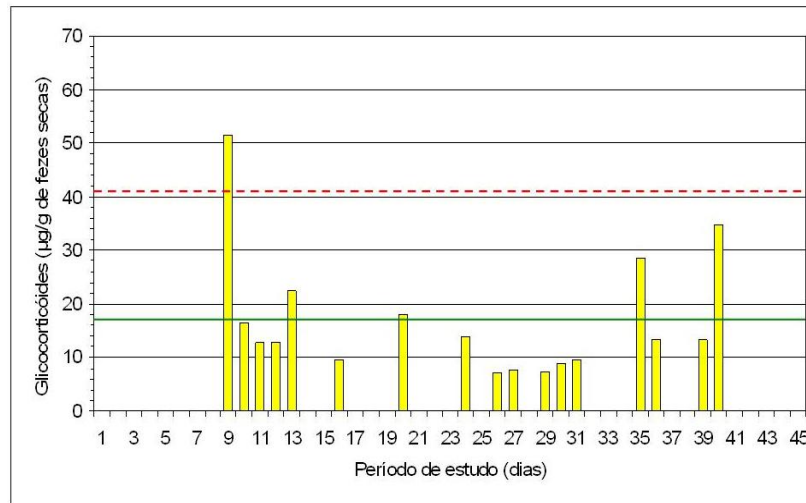
5.4.1 Perfis individuais dos animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4 durante o período de estudo

Os perfis individuais dos animais F1, F2, M1, M2, M3 e M4 são demonstrados a seguir (Gráficos 4 a 9).



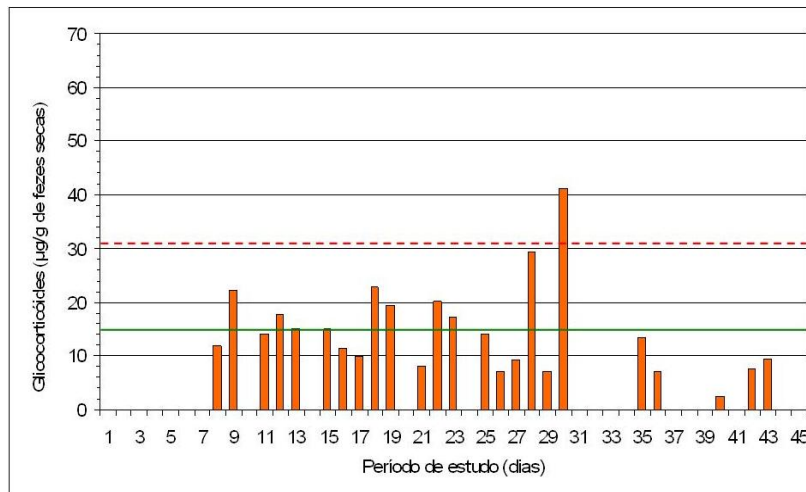
Legenda: --- linha de corte para o estudo dos picos
— média

Gráfico 4 - Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em µg/g de fezes secas do animal F1 durante o período de estudo



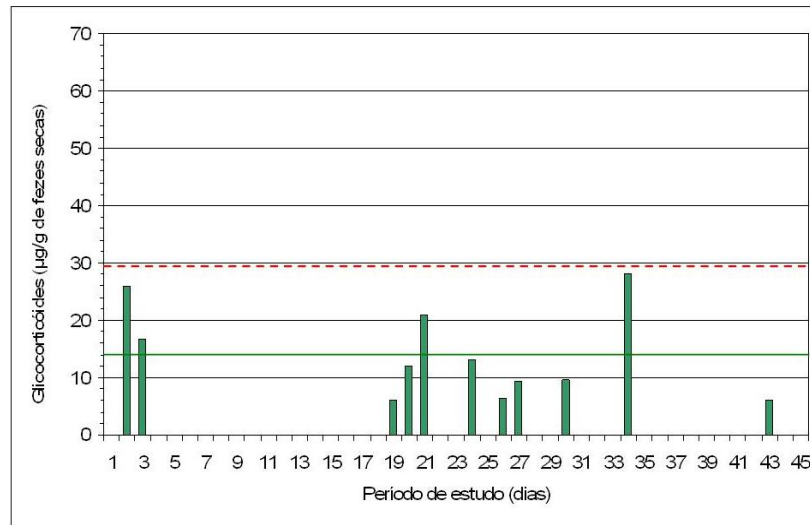
Legenda: --- linha de corte para o estudo dos picos
 — média

Gráfico 5 - Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal F2 durante o período de estudo



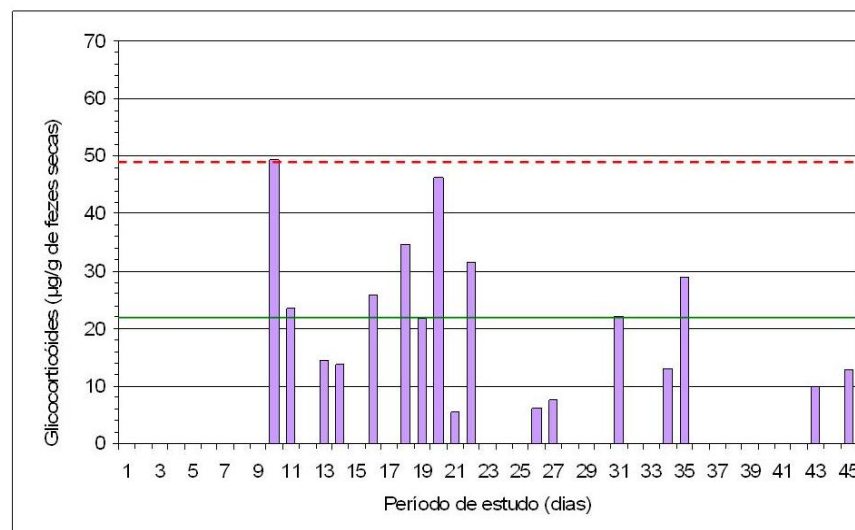
Legenda: --- linha de corte para o estudo dos picos
 — média

Gráfico 6 - Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em $\mu\text{g/g}$ de fezes secas do animal M1 durante o período de estudo



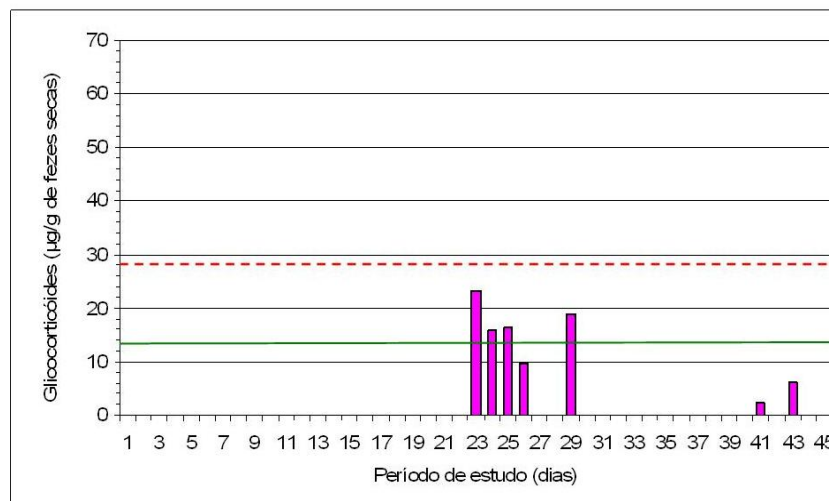
Legenda: --- linha de corte para o estudo dos picos
 — média

Gráfico 7 - Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em µg/g de fezes secas do animal M2 durante o período de estudo



Legenda: --- linha de corte para o estudo dos picos
 — média

Gráfico 8 - Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em µg/g de fezes secas do animal M3 durante o período de estudo



Legenda: --- linha de corte para o estudo dos picos
 — média

Gráfico 9 - Representação gráfica das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais em µg/g de fezes secas do animal M4 durante o período de estudo

Embora o macho M4 tenha apenas sete amostras sua média de concentração de metabólitos de glicocorticóides fecais comportou-se de modo semelhante a dos outros indivíduos.

Constatou-se a ocorrência de picos em quatro dos seis animais: F1, F2, M1 e M3. Esses picos poderiam estar relacionados a eventos estressantes para os animais, como a contenção física ou outras alterações na rotina da matilha. Os dias em que se notam os picos não refletem nenhum dos fatores possivelmente estressantes registrados durante o período de estudo. A partir disso, sugere-se que novos estudos baseados em protocolos de comportamento animal sejam desenvolvidos no sentido de se investigar as possíveis relações de causa e efeito entre eventuais fatores estressantes e seus respectivos reflexos na produção de glicocorticóides.

5.4.2 Comparação entre os perfis de machos e fêmeas

Não houve diferenças significativas entre machos e fêmeas (Gráfico 10). Em algumas espécies ocorrem diferenças entre os gêneros, como em leões-marinhos (*Eumetopias jubatus*), que apresentam diferenças não apenas entre os gêneros,

mas também conforme a faixa etária (MASHBURN et al., 2004), e sagüis-de-tufobranco (*Callithrix jacchus*) (RAMINELLI et al., 2001), mas não há relatos para a espécie em questão.

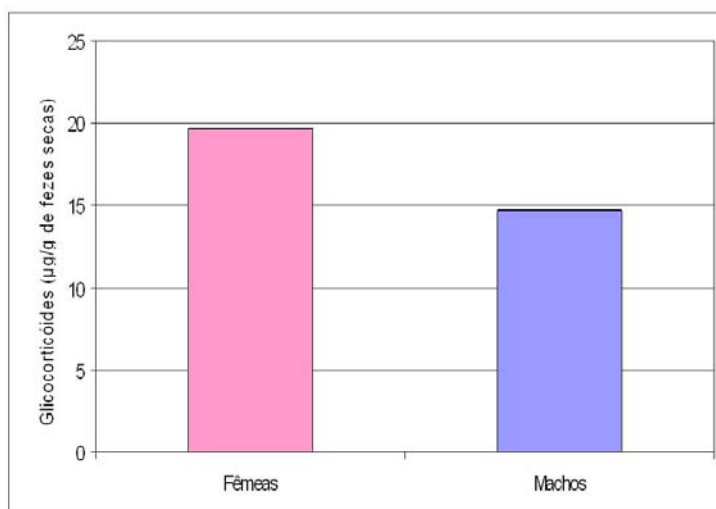


Gráfico 10 - Representação gráfica das médias das concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais ($\mu\text{g/g}$ de fezes secas) dos machos e fêmeas durante o período de estudo

5.4.3 Comparação entre os perfis da fêmea alfa e dos outros indivíduos

Não houve diferenças significativas entre as concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais entre a fêmea alfa e as dos outros indivíduos. Estudos com animais que vivem em grupo, organizados em uma sociedade hierárquica, mostram que os indivíduos subordinados estão submetidos a um maior ou igual nível de estresse do que os dominantes, em condições de cativeiro. Em lobos cativos encontraram-se níveis de cortisol, dosados na urina, similares nos indivíduos dominantes e nos subordinados, assim como os resultados obtidos no presente estudo. Já em pesquisas com populações selvagens de lobo cinzento e cachorro selvagem africano, demonstrou-se o contrário, animais dominantes apresentam níveis elevados de glicocorticóides em relação aos subordinados (CREEL et al., 1997; CREEL, 2005). Segundo Creel (2001) a disparidade entre as pesquisas deve-se ao fato de que em cativeiro os indivíduos subordinados não têm escolha a não ser ficar perto dos dominantes, enquanto em vida livre, os animais subordinados têm a possibilidade de se dispersarem. Portanto, estudos em cativeiro, comparando

indivíduos dominantes com subordinados não permitem estabelecer uma relação entre a posição social e níveis de glicocorticóides que represente o que ocorre em populações de vida livre.

Pode-se sugerir que todos os animais estão aparentemente sem estresse, ou que todos estariam em igual condição de estresse, o que é pouco provável, já que vem ocorrendo reprodução. Isso aliado ao fato de o criadouro oferecer condições de semi-cativeiro, ou seja, um recinto amplo, coberto por vegetação natural em sua maior parte, com um curso de água, permitindo aos animais desempenharem uma ampla variedade de comportamentos naturais da espécie, concordando com Moreira et al. (2007), que afirma que prover condições que alcancem as necessidades comportamentais pode melhorar a saúde e o bem-estar e inclusive otimizar o potencial reprodutivo.

Levando em consideração as dimensões e a qualidade do recinto do Criadouro Onça-pintada, além do manejo adequado, pode-se caracterizá-lo como um ambiente apropriado para a espécie.

Comprovar a condição de estresse do cachorro-vinagre, demonstrando se aspectos de manejo e fatores ambientais em cativeiro ou em áreas de vida livre interferem de modo importante ou não no bem-estar animal e no potencial reprodutivo, é de interesse para a manutenção e conservação da espécie.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. O desafio com ACTH mostrou o perfil reativo esperado, validando assim, do ponto de vista fisiológico, a técnica utilizada;

2. As concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais não mostraram diferenças significativas nos perfis individuais. Os animais F1, F2, M1 e M3 apresentaram um pico cada um durante o período de estudo, porém sem relação com nenhum evento estressante em particular;

3. Não se verificou diferença significativa nos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais entre machos e fêmeas;

4. Não se verificou diferença significativa nos perfis de metabólitos de glicocorticóides fecais entre a fêmea dominante e os outros indivíduos.

Referências

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, H.; MARTIN, F. Oestrogen in human pregnancy faeces. **Acta Endocrinologica**, n. 83, p. 410-419, 1976.

ANDRIOLO, A. Desafios para a conservação da fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens – Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. cap. 3, p. 19-25.

BAMBERG, E.; CHOI, H. S.; MÖSTL, E.; WURM, W.; LORIN, D.; ARBEITER, K. Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares. **Equine Veterinary Journal**, n. 16, p. 537-539, 1984.

BAUMAN, K. L.; ASA, C. S.; GRISHAM, J.; VERBERKMOES, W. Captive canid conservation. In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MACDONALD, D. W. **Canids: foxes, wolves, jackals and dogs**. Switzerland: IUCN/SSC Canid Specialist Group, 2004. p. 280-288.

BEISIEGEL, B. M. **Contribuição ao estudo da história natural do cachorro-domato (*Cerdocyon thous*) e do cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*)**. 1999. 100 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BERBARE, P. E. B. **Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809)**. 2004. 111 p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BERTOLDO, J. G.; COIMBRA, J. L. M.; GUIDOLIN, A. F.; MIQUELOTO, A.; TOALDO, D. Uso ou abuso em testes de comparações de média: conhecimento científico ou empírico? **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1145-1148, 2008.

BLAS, J.; BORTOLOTTI, G. R.; TELLA, J. L.; BAOS, R.; MARCHANT, T. A. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. **PNAS**, v. 104, n. 21, p. 8880-8884, 2007.

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

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**, n. 51, p. 776-786, 1994.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H.; BYERS, A. P.; COLLINS, I.; BARRET, S.; HOWARD, J. G. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, n. 53, p. 93-102, 1995.

CABRERA, A.; YEPPEES, J. **Mamíferos sud americanos**. 2. ed. Buenos Aires: Ediar Editores, 1960. v. 2, p. 123-134.

CHELINI, M. O. M. **Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides fecais em diferentes espécies de animais**. 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L. M. S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. F. Mamíferos Ameaçados de Extinção no Brasil. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 2 v, p. 681-702.

CHIEREGATTO, C. A. F. S.; PESSUTTI, C.; RAMOS, V. A.; ALMEIDA, M. A. **Protocolo de manejo do cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*)**. 2. ed. São Paulo: [s.n.], 2005. p. 25-28.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Disponível em <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>>. Acesso em: 17 jul. 2009.

CLARKE, A.; MASON, W. A.; MOBERG, G. P. Differential, behavioral and adrenocortical responses to stress among three macaque species. **American Journal of Primatology**, n. 14, p. 37-52, 1988.

COSTA, C. M. R. Cachorro-do-mato-vinagre. In: FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; COSTA, C. M. R.; MACHADO, R. B.; LEITE, Y. L. R. **Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1994. p. 289-294.

CREEL, S.; CREEL, N. M.; MILLS, G. M. N.; MONFORT, S. L. Rank and reproduction in cooperatively breeding African wild dogs: behavioral and endocrine correlates. **Behavior Ecology**, v. 8, p. 298-306, 1997.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, p. 491-497, 2001.

CREEL, S. Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. **Journal of Mammalogy**, v. 86, p. 255-264, 2005.

DEMATTEO, K. **An examination of the reproductive physiology of the bush dog (*Speothos venaticus*)**. 2004, 82 p. Tese (Ph.D.). Saint Louis University, Missouri, 2004.

DESMOND, T. J.; LAULE, G. Protected contact elephant training. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOOLOGICAL PARKS AND AQUARIUMS 1991. Silver Spring. Proceedings... Bethesda: American Association of Zoological Parks and Aquariums, 1991. p. 606-613.

DIAS, E. A. **Avaliação do perfil de progestinas e metabólitos de glicocorticóides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas ao desafio com ACTH**. 2006. 72 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DRUMMOND, G. M. Introdução. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção** 1. ed. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 2 v., p. 39-42.

GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; VAN'T HOF, T.; EAST, M. L.; HOFER, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, n. 114, p. 340-348, 1999.

GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, p. 227-136, 2001.

HODGES, J. K.; CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. Estrogen and luteinizing hormone secretion in diverse primate species from simplified urinary analysis. **Journal of Medical Primatology**, n. 8, p. 349-364, 1979.

IUCN. IUCN Red List Categories and Criteria: *Version 3.1*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 2001. 30 p. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/documents/redlist_cats_crit_en_v1223290226.pdf>. Acesso em: 17 jul 2009.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 20 nov 2006.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 17 jul 2009.

JOHNSON, E. O.; KAMILARIS, T. C.; CARTER, S.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Environmental-stress and reproductive success in the common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*) **American Journal of Primatology**, n. 25, p. 191-201, 1991.

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**, n. 37, v. 3, p. 234-244, 2006.

KLEIMAN, D. G. Social behaviour of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dog (*Speothos venaticus*): a study in contrast. **Journal of Mammalogy**, v. 53, n. 4, p. 791-806, 1972.

LANGGUTH, A. Ecology and evolution in the South American canids. In: FOX, M. W. **The wild canids: their systematics, behavioral ecology and evolution**. New York: Van Nostrand Company, 1975. p. 192-206.

LINARES, O. J. El perro de monte, *Speothos venaticus* (Lund), en el norte de Venezuela. **Memorias de la Sociedad de Ciencias Naturales "LaSalle"**. Caracas, v. 27, p. 83-86, 1967.

LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E.; STRIER, K. B. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigrinus*. **Hormones Behavior**, n. 41, p. 275-287, 2002.

MACDONALD, D. W. Social behaviour of captive bush dogs (*Speothos venaticus*). **Journal of Zoology, London**, v. 239, p. 525-543, 1996.

MARTIN, P. A.; CRUMP, M. H. The adrenal gland. In: PINEDA, M. H. **McDonald's veterinary endocrinology and reproduction**. 5. ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 165-200.

MASHBURN, K. L.; ATKINSON, S. Evaluation of adrenal function in serum and feces of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*): influences of molt, gender, sample storage, and age on glucocorticoid metabolism. **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, p. 371-381, 2004.

MILLER, M. W.; HOBBS, N. T.; SOUSA, M. C. Detecting stress responses in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): reliability of cortisol concentrations in urine and feces. **Canadian Journal of Zoology**, n. 69, p. 15-24, 1991.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 189-199, 2004.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Within-sample variation of fecal glucocorticoids measurements. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, p. 21-26, 2003.

MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p. 1-22.

MONFORT, S. L. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: University Press, 2003. p.145-165.

MONFORT, S. L.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). **Journal of Endocrinology**, n. 138, p. 41-49, 1993.

MONFORT, S. L.; MASHBURN, K. L.; BREWER, B. A.; CREEL, S. R. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n. 29, p. 129-133, 1998.

MORATO, R. G.; VERRESCHI, I. T. N.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R. C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 61, p. 1273-1281, 2004.

MOREIRA, N.; BROWN, J. L.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v. 26, p.1-20, 2007.

MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 262-302, 2007.

MORROW, C. J.; KOLVER, E. S.; VERKERK, G. A.; MATTHEWS, L. R. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. **General and Comparative Endocrinology**, n. 126, p. 229-241, 2002.

MÖSTL, E.; CHOI, H. S.; WURM, W.; ISMAIL, N.; BAMBERG, E. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 α in faeces. **British Veterinary Journal**, n. 140, p. 287-291, 1984.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, n. 23, p. 67-74, 2002.

OLIVEIRA, T. G.; DALPONTE, J. C. *Speothos venaticus*. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. 2 v., p. 783-784.

PAGLIA, A. Fauna. In: CAMPANILI, M. **Almanaque Brasil socioambiental 2005**. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2005. p. 198-202.

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

PIZZUTTO, C. S.; SGAI, M. G. F. G.; VIAU, P.; CHELINI, M. O. M.; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARAES, M. A. B. V. Validação laboratorial e fisiológica de conjunto comercial para a quantificação de corticóides fecais em chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*), cativos e submetidos a enriquecimentos

ambientais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 104-110, 2008.

PORTON, I. J. Bush dog urine marking: its role in pair formation and maintenance. **Animal Behaviour**, v. 31, p. 1061-1069, 1983.

PORTON, I. J.; KLEIMAN, D. G.; RODDEN, M. Aseasonality of bush dog reproduction and the influence of social factors on the estrous cycle. **Journal of Mammalogy**, v. 68, n. 4, p. 867-871, 1987.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Vida, 2001. 327 p.

PRYOR, K. Reinforcement: better than rewards. In: PRYOR, K. **Don't shoot the dog! The new art of teaching and training**. New York: Bantam Books, 1999. p. 1-6.

RAMINELLI, J. L. F.; SOUSA, M. B. C.; CUNHA, M. S.; BARBOSA, M. F. V. Morning and afternoon patterns of fecal cortisol excretion among reproductive and non-reproductive male and female common marmosets, *Callithrix jacchus*. **Biological Rhythm Research**, v. 32, p. 159-167, 2001.

RAMOS JR., V. A.; PESSUTTI, C.; CHIEREGATTO, C. A. F. S. **Guia de identificação dos canídeos silvestres brasileiros**. Sorocaba: JoyJoy Studio Ltda, 2003. 35 p. (Comunicação Ambiental).

RISLER, L.; WASSER, S. K.; SACKETT, G. P. Measurement of excreted steroids in *Macaca nemestrina*. **American Journal of Primatology**, n. 12, p. 91-100, 1987.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

SAPOLSKY, R. M. Stress, social status and reproductive physiology in free-living baboons. In: CREWS, D. **Psychobiology of reproduction: an evolutionary perspective**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1987. p. 291-322.

SCHWARZENBERGER, F.; FREDRIKSSON, G.; SCHALLER, K.; KOLTER, L. Fecal steroid analysis for monitoring reproduction in the sun bear (*Helarctos malayanus*) **Theriogenology**, v. 62, n. 9, p. 1677-1692, 2004.

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

SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D. W. Introduction. In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MACDONALD, D. W. **Canids**: foxes, wolves, jackals and dogs. Switzerland: IUCN/SSC Canid Specialist Group, 2004. p. 22-25.

SKINNER, B. F. **Ciência e comportamento humano**. 11. ed. São Paulo: Martins Fontes, 2003. 489 p.

SPERCOSKI, K. M. **Monitoramento a longo prazo da excreção de corticóides fecais em lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) de cativeiro e vida livre**: uma contribuição para o manejo e a conservação da espécie. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

STAVISKY, R. C.; WHITTEN, P. L.; HAMMETT, D. H.; KAPLAN, J. R. Lake pigments facilitate analysis of fecal cortisol and behavior in group-housed macaques. **American Journal of Physiology and Anthropology**, n. 116, p. 51-58, 2001.

TERIO, K. A.; CITINO, S. B.; BROWN, J. L. Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*) **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 4, n. 30, p. 484-491, 1999.

THORNBACK, J.; JENKINS, M. The IUCN mammal red data book. Part 1: threatened mammalian taxa of the Americas and the Australasian zoogeographic region (excluding Cetacea). Gland, Switzerland: IUCN, 1982.

VAN METER, P. E.; FRENCH, J. A.; DLONIAK, S. M.; WATTS, H. E.; KOLOWSKI, J. M.; HOLEKAMP, K. E. Fecal glucocorticoids reflect socio-ecological and anthropogenic stressors in the lives of wild spotted hyenas. **Hormones and Behavior**, n. 55, p. 329-337, 2009.

VASCONCELLOS, A. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; PIZZUTTO, C. S.; ADES, C. Environmental enrichment for maned wolves: group and individual effects. **Animal Welfare**, v. 18, p. 289-300, 2009.

VELLOSO, A. L.; WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; DIETZ, J. M. Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 96-107, 1998.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U.; MILLSPAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 260-275, 2000.

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, p. 255-262, 1996.

WASSER, S. K.; SEWALL, G.; SOULES, M. R. Psychosocial stress as a cause of infertility. **Fertility and Sterility**, v. 3, n. 59, p. 685-689, 1993.

WILDT, D. E. Male reproduction: assessment, management, and control of fertility. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M.; THOMPSON, K.; LUMPKIN, S. **Wild mammals in captivity: principles and techniques**. Chicago: The University of Chicago Press, 1996. p. 429-450.

YOUNG, K. M.; BROWN, J. L.; GOODROWE, K. L. Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) by fecal hormone analysis. **Zoo Biology**, v. 20, n. 6, p. 517-536, 2001.

YOUNG, K. M.; WALKER, S. L.; LANTHIER, C.; WADDELL, W. T.; MONFORT, S. BROWN, J. L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, p.148–165, 2004.

ZUERCHER, G. L.; GIPSON, P. S.; CARILLO, O. Diet and habitat associations of bush dogs *Speothos venaticus* in the Interior Atlantic Forest of eastern Paraguay. **Oryx**, v. 39, n. 1, p. 86-89, 2005.

ZUERCHER, G. L.; SWARNER, M.; SILVEIRA, L.; CARRILLO, O. *Speothos venaticus*. In: IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 17 jul 2009.