

JULIANA ANAYA SINHORINI



**Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas,
Guaruba guarouba (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro**



São Paulo
2013

JULIANA ANAYA SINHORINI

**Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas,
Guaruba guarouba (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz
Guimarães

São Paulo

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2798
FMVZ

Sinhorini, Juliana Anaya
Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro / Juliana Anaya Sinhorini. -- 2013.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Guaruba guarouba. 2. Reprodução. 3. Metabólitos hormonais. 4. Esteroides. 5. Método não invasivo. I. Título.

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação das dosagens de metabólitos de esteroides em excretas de ararajubas (Guaruba guarouba) dentro e fora da estação reprodutiva.", protocolado sob o nº 2823/2012, utilizando 24 (vinte e quatro) aves, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Assessment of steroid metabolites doses in Golden conure (Guaruba guarouba) excreta inside and outside the breeding season", protocol number 2823/2012, utilizing 24 (twenty four) birds, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SINHORINI, Juliana Anaya

Título: Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.
Ó Mestre, fazei que eu procure mais
Consolar, que ser consolado;
Compreender, que ser compreendido;
Amar, que ser amado.
Pois, é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive para a vida eterna.”

Aos **animais** que um dia já fizeram parte da minha vida, em especial às aves que
participaram deste estudo.

À minha mãe,

Não foi fácil passar por tudo o que passou
durante a realização deste trabalho.

Jamais vou conseguir agradecer.

Você é um grande exemplo!

À minha família,

Este trabalho é dedicado a vocês,
pois sem a presença de cada um em minha vida,
ele não existiria.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, agradeço por continuar aqui e conseguir terminar este trabalho! Agradeço pelas pessoas que colocou em meu caminho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, agradeço pelo contato, paciência e humanidade com que orienta. Você é uma lição de vida!

Ao **Sr. William Wittkoff** e **Sra. Linda Wittkoff**, por todos os anos de convivência, pelo apoio, torcida e confiança.

Ao **Prof. Dr. Rupert Palme** e toda sua família que me receberam tão gentilmente. Agradeço por toda ajuda e carinho.

A amiga **Cristiane Schilbach Pizzuto**, minha admiração por você só aumenta! Obrigada por toda ajuda, ideias e suporte.

A amiga **Manuela Gonçalves Fraga Geronimo Sgai**, minha companheira de longa data. Agradeço por estar sempre ao meu lado, pela ajuda e agradeço também ao Mateus e Clarinha!

A amiga **Cíntia Germano da Rocha**, presença cada vez mais constante, por sua ajuda e apoio sempre.

A amiga **Marta Brito Guimarães** que se fez presente em todas as etapas da realização deste trabalho, sempre com muita disposição para ajudar!

Ao **André Saidenberg** pela ajuda nas coletas e companhia durante a parte experimental.

Ao **Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira**, pelo apoio, disposição em ajudar e dar ideias e pelas brilhantes sugestões na qualificação.

A **Prof. Dra. Eliana Reiko Matushima**, agradeço pela torcida incondicional, pela inspiração, ética e amor. Agradeço também pela participação e sugestões na qualificação.

A **Edith Klobetz Rassam** e todos os funcionários do Departamento de Ciências Biomédicas / Bioquímicas, da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, que mostraram o que é trabalho em equipe!

Ao **Carlos, Nanci e Pedro** da Fundação Lymington, que ajudaram tanto na reforma dos viveiros, coletas, alimentação das aves. Por todo seu amor pelo que fazem.

A **Maria Amélia**, pelo auxílio com as amostras durante e após as liofilizações, pelas conversas e apoio.

A **Priscila Viau e Prof. Dr. Claudio Alvarenga**, pelo auxílio no laboratório com as extrações.

Aos colegas do **CCZ**, pelo apoio e paciência que tiveram comigo principalmente na parte final.

Ao **Alexander Lee**, que cedeu gentilmente a foto de capa.

A todos os amigos que se disponibilizaram a ajudar durante as horas difíceis e demonstraram um carinho que eu não tinha noção que existia.

RESUMO

SINHORINI, J. A. **Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro.** [Endocrine-reproductive non-invasive study in golden conures, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), kept in captivity]. 2013. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O estudo endócrino-reprodutivo com o uso da extração e dosagem de metabólitos de esteroides em excretas tem sido proposta como uma ferramenta extremamente útil por não ser invasiva e permitir estudos longitudinais com grande número de coletas de amostras sem produzir estresse, além de ser viável em psitacídeos. Assim, este estudo objetivou descrever e comparar as concentrações de metabólitos de glicocorticoides, testosterona, estrógeno e progesterona em excretas de ararajubas em diferentes categorias reprodutivas, com o uso de técnicas não invasivas, além de validar fisiologicamente os ensaios para dosagens desses metabólitos em excretas da espécie. Para isso, foram utilizadas 24 (vinte e quatro) ararajubas, das quais foram coletadas excretas durante diferentes fases reprodutivas, sendo: sem atividade reprodutiva, em atividade de incubação de ovos e em atividade de postura de ovos. Além disso, foram feitos desafios com aplicação de ACTH e GnRH, para validação dos ensaios. Como resultados, obtivemos picos de concentração de metabólitos de glicocorticoides após aplicação de ACTH e picos de concentração de metabólitos de testosterona nos machos após aplicação do GnRH, validando fisiologicamente os ensaios para mensurar estes metabólitos hormonais; os ensaios para mensurar metabólitos de estrógeno e progesterona foram validados biologicamente. Foram observados valores semelhantes de metabólitos de glicocorticoides entre as diferentes categorias reprodutivas, porém diferentes nos metabólitos de testosterona, estrógeno e progesterona, com valores maiores durante postura (testosterona e estrógeno), e maiores na postura com relação aos animais sem atividade reprodutiva (progesterona).

Palavras-chave: *Guaruba guarouba*. Reprodução. Metabólitos hormonais. Esteroides. Método não invasivo.

ABSTRACT

SINHORINI, J. A. **Endocrine-reproductive non-invasive study in golden conures, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), kept in captivity.** [Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro]. 2013. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The endocrine and reproductive study using the extraction and quantification of metabolites of steroids in excreta has been proposed as an extremely useful tool for being non-invasive and allow longitudinal studies with large numbers of samples collected without producing stress, and is feasible in parrots. Thus, this study aimed to describe and compare the concentrations of metabolites of glucocorticoids, testosterone, estrogen and progesterone in the excreted golden conures in different reproductive categories, with the use of non-invasive techniques, and validate physiologically assays for determination of these metabolites in the excreta species. For this, we used 24 (twenty four) golden conures, which excreta were collected during different reproductive phases, as follows: no reproductive activity, activity in the incubation of eggs and egg-laying activity. Additionally, challenges were performed with application of ACTH and GnRH for validation tests. We observed peak concentrations of glucocorticoid metabolites after administration of ACTH and peak concentrations of metabolites of testosterone in males after application of GnRH, physiologically validating assays to measure these hormone metabolites; tests to measure metabolites of estrogen and progesterone were biologically validated. Values of glucocorticoid metabolites were similar between different reproductive categories, but between metabolites of testosterone, estrogen and progesterone were different, with higher values during posture (testosterone and estrogen), and higher in posture toward animals without reproductive activity (progesterone) .

Key words: *Guaruba guarouba*. Reproduction. Hormone metabolites. Steroids. Non invasive method

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área de ocorrência da ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>) – São Paulo – 2013.....	28
Figura 2 - Índio do Parque Indígena do Xingu, usando cocar com penas de Ararajuba – São Paulo – 2012.....	29
Figura 3 - Casal de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>) na Fundação Lymington – Juquitiba/SP – 2012.....	31
Figura 4 - Padrões de excretas de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>) – Juquitiba/SP – 2012.....	42
Figura 5 - Viveiros de reprodução de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>) pertencentes ao Criadouro Fundação Lymington – Juquitiba/SP – 2012.....	44
Figura 6 - Gaiolas de manutenção de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>) durante o período experimental, pertencentes ao Criadouro Fundação Lymington – Juquitiba/SP – 2012.....	44
Figura 7 - Fotografia mostrando macho (cauda cortada) e fêmea de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), separados para coleta de amostras – Juquitiba/SP – 2012.....	45
Figura 8 - Viveiros de reprodução de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>) preparado para coleta de amostras, no criadouro Fundação Lymington – Juquitiba/SP – 2012.....	46
Figura 9 - Delineamento do experimento da validação fisiológica dos ensaios para mensurar metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>) – Desafio de ACTH – São Paulo – 2013.....	47
Figura 10 - Tubos plásticos contendo amostras de excretas de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), devidamente identificados – Juquitiba/SP – 2012.....	47
Figura 11 - Delineamento do experimento da validação fisiológica dos ensaios para mensurar metabólitos de testosterona, estrógeno e progesterona em excretas de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>) – Desafio de GnRH – São Paulo – 2013.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Varição das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2013.....	56
Gráfico 2 -	Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>), coletados durante 24 horas, agrupados nos períodos manhã, tarde e noite – São Paulo/SP – 2013.....	57
Gráfico 3 -	Varição das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>), coletados durante 24 horas, agrupados nos períodos de 2 horas – São Paulo/SP – 2013.....	57
Gráfico 4 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea A1, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	60
Gráfico 5 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea A2, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	60
Gráfico 6 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea A3, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	61
Gráfico 7 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho A4, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	61
Gráfico 8 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho A5, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	62
Gráfico 9 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho A6, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	62

Gráfico 10 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea B1, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	63
Gráfico 11 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea B3, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	63
Gráfico 12 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho B4, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	64
Gráfico 13 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho B6, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	64
Gráfico 14 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C1, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	65
Gráfico 15 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C2, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	65
Gráfico 16 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C3, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	66
Gráfico 17 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho C4, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	66
Gráfico 18 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho C5, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	67
Gráfico 19 -	Varição das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho C6, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013.....	67

Gráfico 20 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em 8 machos e 8 fêmeas de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2013.....	68
Gráfico 21 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de fêmeas de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013.....	69
Gráfico 22 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de machos de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013.....	70
Gráfico 23 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de fêmeas e machos de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013.....	71
Gráfico 24 - Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de macho e fêmea de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), com e sem ovos no ninho – São Paulo – 2013.....	73
Gráfico 25 - Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C2 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo – 2013.....	74
Gráfico 26 - Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C4 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo – 2013.....	75
Gráfico 27 - Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C1 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo – 2013.....	75
Gráfico 28 - Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C3 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo – 2013.....	76
Gráfico 29 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de testosterona em excretas de machos de Ararajubas (<i>Guaruba guarouba</i>), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013.....	77

Gráfico 30 -	Variação das concentrações de metabólitos de testosterona em excretas de macho de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), com e sem ovos no ninho – São Paulo - 2013.....	78
Gráfico 31 -	Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C2 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo – 2013.....	81
Gráfico 32 -	Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C2 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo – 2013....	81
Gráfico 33 -	Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C4 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo – 2013.....	82
Gráfico 34 -	Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C4 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo – 2013....	82
Gráfico 35 -	Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C1 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo – 2013.....	83
Gráfico 36 -	Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C1 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo – 2013..	83
Gráfico 37 -	Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C3 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo – 2013.....	84
Gráfico 38 -	Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C3 de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo – 2013..	84
Gráfico 39 -	Variação das concentrações de metabólitos de estrógeno em excretas de fêmea de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013.....	86
Gráfico 40 -	Variação das concentrações de metabólitos de progesterona em excretas de fêmeas de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013.....	87

Gráfico 41 -	Varição das concentrações de metabólitos de estrógeno e progesterona em excretas de fêmea de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), com e sem ovos – São Paulo – 2013.....	88
Gráfico 42 -	Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de estrógeno em excretas de fêmea de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>) antes e após retirada de ovos do ninho - São Paulo – 2013.....	88
Gráfico 43 -	Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de progesterona em excretas de fêmea de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), antes e após retirada de ovos do ninho – São Paulo – 2013.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de coleta de amostras em casal de ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>), durante postura fora da época reprodutiva – São Paulo – 2013.....	55
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 CONSERVAÇÃO.....	24
2.2 ARARAJUBA.....	28
2.3 ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DE AVES.....	32
2.4 MÉTODOS NÃO INVASIVOS.....	38
2.5 EXCRETAS.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 AVES.....	43
3.2 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM EXCRETAS DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>) – DESAFIO DE ACTH.....	46
3.3 DESCRIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES, TESTOSTERONA, ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE MACHOS E FÊMEAS DE ARARAJUBAS (<i>Guaruba guarouba</i>), EM DIFERENTES CATEGORIAS REPRODUTIVAS.....	48
3.4 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE TESTOSTERONA, ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>) – DESAFIO DE GNRH.....	49
3.5 EXTRAÇÃO FECAL E DOSAGEM DOS METABÓLITOS.....	50
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) EM EXCRETAS DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>) – DESAFIO DE ACTH.....	55
4.2 DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) EM EXCRETAS DE MACHOS E FÊMEAS DE ARARAJUBAS (<i>Guaruba guarouba</i>), ENTRE AS DIFERENTES CATEGORIAS DE ATIVIDADES REPRODUTIVAS	69

4.2.1	DESCRIÇÃO DAS VARIAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM EXCRETAS DE MACHO E FÊMEA DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>), COM E SEM OVOS NO NINHO.....	72
4.3	VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE TESTOSTERONA EM EXCRETAS DE MACHOS DE ARARAJUBAS (<i>Guaruba guarouba</i>) – DESAFIO DE GNRH, E DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) DURANTE ESTE EXPERIMENTO.....	73
4.4	DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE TESTOSTERONA EM EXCRETAS DE MACHOS DE ARARAJUBAS (<i>Guaruba guarouba</i>), ENTRE AS DIFERENTES CATEGORIAS DE ATIVIDADES REPRODUTIVAS.....	76
4.4.1	DESCRIÇÃO DAS VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE TESTOSTERONA EM EXCRETAS DE MACHO DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>), COM E SEM OVOS NO NINHO.....	78
4.5	VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE FÊMEAS DE ARARAJUBAS (<i>Guaruba guarouba</i>) – DESAFIO DE GNRH, E DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES DURANTE ESTE EXPERIMENTO.....	79
4.6	DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE FÊMEAS DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>) ENTRE AS DIFERENTES CATEGORIAS DE ATIVIDADES REPRODUTIVAS.....	85
4.6.1	DESCRIÇÃO DAS VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE FÊMEA DE ARARAJUBA (<i>Guaruba guarouba</i>), COM E SEM OVOS NO NINHO	87
5	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	ANEXO A.....	101
	APÊNDICE A.....	102
	APÊNDICE B.....	103



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Aves são únicas entre os vertebrados na medida em que são altamente adaptadas ao voo em sua anatomia, fisiologia e comportamento. Além disso, devido a seus hábitos, na maioria das vezes diurnos, e suas particularidades (colorido, vocalização, entre outros) elas são possivelmente as espécies de vertebrados mais facilmente visíveis para os seres humanos em seus habitats naturais. Consequentemente, as aves têm sido o alvo favorito de interessados em estudar as relações entre hormônios, fatores ambientais naturais e reprodução em vertebrados selvagens em cativeiro, pois a fisiologia reprodutiva e comportamento podem ser estudados de forma relativamente fácil (NORRIS; LOPEZ, 2011). Apesar dessas qualificações práticas para o estudo e as questões biológicas que elas representam (JAMIESON, 2007), o conhecimento científico acerca de algumas espécies é muito recente. Antes dos anos 70, por exemplo, não se considerava sequer a hipótese de que algumas das aves mais raras do mundo atualmente, estivessem em perigo de extinção (COLLAR, 1995).

A reprodução é uma importante questão em animais ameaçados, em vida livre ou cativeiro, e o elemento chave que dispara a reprodução em aves é o ambiente. Cada espécie é única, e na maior parte das vezes não é tão óbvio perceber qual sinalização ambiental é mais importante para cada espécie. Isto pode levar a dificuldades de manejo em cativeiro de espécies ameaçadas, assim como levar a disfunções reprodutivas. Apesar dessas diferenças, o conhecimento aplicado sobre reprodução de aves está crescendo (OTTINGER et al., 2007).

A compreensão das características endócrinas de uma ave pode trazer informações sobre seu status reprodutivo e físico, possibilitando alterações de manejo que propiciem sucesso reprodutivo. São necessários estudos básicos sobre endocrinologia nas diferentes espécies para viabilizar a aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de melhorar o desempenho nas espécies ameaçadas.

A ararajuba, *Guaruba guarouba*, é uma ave da família Psittacidae que se encontra ameaçada de extinção. Pouco se conhece sobre o comportamento reprodutivo e hábitos desta espécie (ICMBIO, 2012), apesar de ser muito popular.

Este estudo aborda aspectos reprodutivos da ararajuba em cativeiro. Para isso, o uso de técnicas não invasivas para mensuração de metabólitos de esteroides nos excretas foi empregado, permitindo uma análise de maior quantidade de amostras, livre do estresse causado pela contenção e coleta de sangue.

Por verificar a escassez de artigos publicados em literatura científica e, a fim de aprimorar os conhecimentos da endocrinologia reprodutiva da ararajuba, este trabalho teve como objetivos:

- ✧ Descrever e comparar as concentrações de metabólitos de glicocorticoides, testosterona, estrógeno e progesterona em excretas de ararajubas em diferentes categorias reprodutivas, com o uso de técnicas não invasivas;
- ✧ Validar fisiologicamente ensaios para dosagens de metabólitos de glicocorticoides, testosterona, estrógeno e progesterona em excretas de ararajubas;



2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A maior parte dos eventos fisiológicos e comportamentais que ocorrem no corpo (seja humano, seja de qualquer outra espécie animal), são regulados diretamente por hormônios ou modificados pela ação destes, como pode ser exemplificado pelos papéis essenciais e diversificados dos hormônios nos processos reprodutivos (NORRIS; LOPEZ, 2011) e uma importante estratégia para conservação de muitas espécies que estão em perigo de extinção é o estudo da endocrinologia, também conhecido como endocrinologia da conservação (COCKREM et al., 2004).

2.1 CONSERVAÇÃO

Até um século atrás, a Terra ainda continha grandes áreas isoladas onde os animais tinham pouco ou nenhum contato com o homem. Desde então, a população humana tem crescido rapidamente, assim como, o uso de energia e recursos naturais e, atualmente há muito poucas partes do planeta além do alcance humano. Habitats naturais estão desaparecendo e a biodiversidade está em rápido declínio. Isto é potencialmente perigoso para o ser humano porque faz do planeta um lugar menos estável e anula recursos que um dia podem vir a ser necessários. Para os animais os resultados podem ser desastrosos. As espécies mais afetadas atingiram o ponto onde, ironicamente, dependem da ajuda humana para sobreviver (BURNIE; WILSON, 2001).

Os motivos para a conservação da biodiversidade são muitos, incluindo motivos ecológicos, econômicos, estéticos e éticos (FERNANDEZ et al., 2003) . As comunidades naturais são sistemas integrados, o que significa que a extinção de uma simples espécie pode ter efeitos danosos sobre o funcionamento de todo um ecossistema (SMA, 1998).

A diversidade observada nas comunidades biológicas é resultante de um processo dinâmico de equilíbrio entre a extinção e o surgimento de novas espécies (especiação) na biosfera (ACCACIO et al., 2003), conhecido como evolução biológica (GASTAL; SARAGOUSSE, 2008). Nesse contexto, a extinção é o desaparecimento de todos os indivíduos de uma determinada espécie (SMA, 1998), e deve ser encarada como um fenômeno natural e corriqueiro (ACCACIO et al., 2003). Porém, a interferência humana justificada pelo desenvolvimento, acaba causando demanda excessiva por recursos naturais e a magnitude das modificações impostas aos ecossistemas aceleram as taxas de extinção, pois geram perturbações em escala incompatível com a sobrevivência de grande quantidade de espécies, em particular nos ambientes mais complexos (BENSUSAN, 2008). Assim, a conservação se faz necessária para permitir a continuidade da evolução biológica, independente das perturbações geradas pela atividade humana. Tal necessidade é premente para impedir maiores perdas de diversidade biológica e seus efeitos ainda incertos sobre a própria existência humana (ACCACIO, 2003).

Compreender os padrões de extinção diferencial e prever os riscos relativos de extinção entre as espécies existentes estão entre os problemas mais importantes em biologia da conservação (REED, 1999). Os hábitos e o comportamento de uma espécie podem afetar a persistência da população ou sua extinção (p.ex. agregação, dispersão, seleção de habitat, entre outros) (ACCACIO, 2003). O estudo de comportamentos específicos e a ampliação no conhecimento biológico de cada espécie devem melhorar as previsões de riscos e auxiliar a impedir o desaparecimento de espécies (FERNANDEZ et al., 2003).

As aves são o grupo melhor pesquisado dos animais. Calcula-se que mais de 99% das espécies sejam conhecidas (SICK, 2001). Um total de 130 espécies está documentado como tendo sido extintas desde 1500. Embora as extinções tenham sido melhor fundamentadas em aves do que qualquer outro grupo de organismos, esses totais são provavelmente subestimados porque a extinção é de difícil documentação (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012).

De acordo com a última avaliação realizada pela BirdLife International (2012), 1.313 espécies de aves podem ser consideradas ameaçadas de extinção. Isso representa 13% do total de 9.934 espécies de aves existentes no mundo. Um

adicional de 880 espécies são consideradas “quase ameaçadas” e quatro estão extintas na natureza (sobrevivem apenas em cativeiro), resultando num total de 2.193 espécies que são prioridades urgentes para ações de conservação.

As aves foram chamadas de “répteis glorificados” por T. H. Huxley¹, na segunda metade do século XIX, e representam os sobreviventes da extinta linhagem dos dinossauros, que dominou a Terra durante todo o período Mesozoico (SICK, 2001). Toda a morfologia e a fisiologia das aves foi moldada pelo desenvolvimento da capacidade de voar, que pode ser simbolizada pelas penas. O grupo apresenta uma uniformidade estrutural notável, e sua diversificação ocorreu no sentido do desenvolvimento de diferentes hábitos alimentares, o que pode ser comprovado pela imensa variação no formato do bico e das patas. Seu sistema respiratório é bastante especializado, permitindo que o oxigênio seja retirado do ar tanto durante a inspiração como durante a expiração, permitindo que algumas aves voem a grandes altitudes, onde o ar é muito rarefeito (algumas aves migratórias voam por cima dos Himalaias, a mais de 9.000 metros de altitude) (VUILLEUMIER; DOVE, 2005). Algumas aves perderam a capacidade de voar, sendo corredoras (avestruz [*Struthio camelus*], ema [*Rhea americana*]) ou nadadoras (pinguins [*Aptenodytes patagonicus*, p.ex.]). Existem atualmente cerca de 9.000 espécies, e o grupo apresenta uma distribuição cosmopolita (SMA, 1998).

A América do Sul é considerada o continente das aves, possuindo aproximadamente 2.645 espécies, sendo que no Brasil, habitam 1.590 espécies, significando 55,3% das aves residentes no continente. Mais de 10% dessas espécies são endêmicas ao Brasil, fazendo deste país um dos mais importantes para investimentos em conservação (SICK, 2001). A distribuição das espécies residentes ao longo do Brasil é desigual, estando a maior diversidade e a maior taxa de endemismo concentradas na Amazônia, seguida pela Mata Atlântica (MITTERMEIER et al., 2003; MARINI; GARCIA, 2005), dois biomas que originalmente, eram cobertos por florestas úmidas (SICK, 2001).

¹ Huxley, Adrian Desmond: From Devil’s Disciple to Evolution’s High Priest.

A biodiversidade brasileira foi e continua sendo afetada, significativamente, pelas atividades humanas em áreas críticas, e isso inclui algumas espécies de aves que aqui habitavam e ainda habitam. A resposta das aves a essas alterações varia desde aquelas que se beneficiaram com as alterações do habitat e aumentaram suas populações (p. ex., bem-te-vi [*Pitangus sulphuratus*]), até aquelas que foram extintas da natureza (p. ex., mutum-do-nordeste [*Mitu mitu*] e arara-azul-pequena [*Anodorhynchus glaucus*]) (MARINI; GARCIA 2005). Atualmente, o Brasil encontra-se em primeiro lugar no número de espécies de aves ameaçadas, na região neotropical (COLLAR et al., 1997), totalizando 193 espécies (IUCN, 2011).

Entre essas espécies, se destacam as da família Psittacidae, e isso se deve à peculiar vulnerabilidade dos papagaios que sofrem com a contínua destruição de habitat, captura de exemplares na natureza para o tráfico ilegal, confecção de artesanatos com suas penas, introdução de espécies exóticas invasoras, endogamia e outros fatores relacionados ao tamanho populacional reduzido (GODOY, 2006).

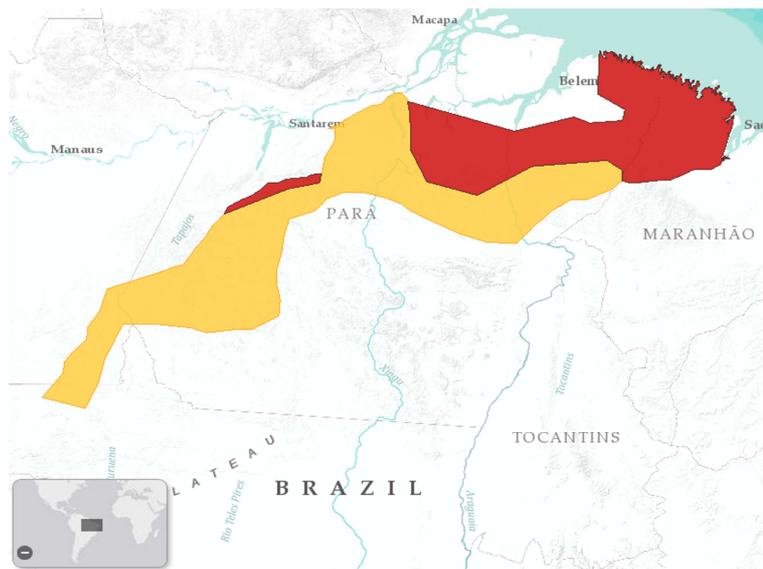
A carência de informações sobre a biologia básica das espécies raras e do crescente número de espécies ameaçadas é o maior desafio enfrentado pelos ornitólogos brasileiros (MARINI; GARCIA 2005). Os novos desafios impostos pelo século XXI incluem a definição e aplicação de estratégias conservacionistas, em caráter de urgência, e a comunidade ornitológica e conservacionista promoveu os meios para estudar, planejar e tomar uma atitude ativa para conservar a rica e crescentemente ameaçada avifauna brasileira. Sabem-se quais são as espécies ameaçadas, quais as suas principais ameaças e onde elas devem ser preservadas. Contudo, o conhecimento acerca das novas espécies e sobre a biologia das espécies descritas, tanto recentemente quanto anteriormente, é escasso. As pesquisas e as medidas de conservação ainda estão desigualmente distribuídas entre as regiões e espécies, e as ameaças são crescentes (MURPHY, 1997; MARINI; GARCIA 2005).

2.2 ARARAJUBA

O Brasil é o país mais rico do mundo em Psittacidae, sendo a Amazônia, a região mais rica quer em indivíduos quer em espécies da família, vivendo aqui inclusive seus maiores representantes, as araras (SICK, 2001).

A ararajuba (*Guaruba guarouba*) é uma espécie endêmica do Brasil e sua área de ocorrência compreende a floresta Amazônica brasileira, sendo encontrada do extremo oeste do Maranhão ao Norte de Rondônia; ao Sul do Rio Amazonas. A distribuição da espécie sobrepõe parcialmente o "arco do desmatamento" da Amazônia, e nos últimos anos a espécie perdeu pelo menos 35% da sua área de ocorrência (LARANJEIRAS e COHN-HAFT, 2009) (Figura 1).

Figura 1 – Área de ocorrência da ararajuba (*Guaruba guarouba*) – São Paulo - 2013



Área vermelha – ave extinta; área amarela – ave residente

Fonte: BirdLife International 2012.

O nome guaruba deriva do tupi – Guará = pássaro, yuba = amarelo (SICK, 2001). O psitacídeo com um dos endemismos mais interessantes da avifauna brasileira, único em seu colorido amarelo-dourado com penas de voo verdes (ICMBIO, 2012), foi indicado como a melhor alternativa para ave nacional, por possuir as cores da bandeira do país, sendo capa do livro “Ornitologia Brasileira”

(SICK, 2001) e também ave símbolo da Sociedade Brasileira de Ornitologia (YAMASHITA, 2003).

Foi mencionado por Fernão Cardim² na Bahia em fins do século XVI como “ave preciosíssima trazida do Maranhão, de valor comercial correspondendo a dois escravos”. A ararajuba constou também na coleção de Alexandre Rodrigues Ferreira³.

A população é estimada em 1.000 a 2.500 indivíduos na natureza. Por ocorrer em uma região economicamente carente, sua captura é utilizada pela população local, composta por comunidades indígenas, como fonte de renda, como moeda de troca e ainda para ornamentação (Figura 2) devido a sua bela e única coloração (YAMASHITA, 2003; IUCN, 2011).

Figura 2 – Índio do Parque Indígena do Xingu, usando cocar com penas de Ararajuba – São Paulo - 2012



Fonte: <http://www.flickr.com/photos/rodrigo_ono/2442086670/>. Acessado em 17/06/2012.

² CARDIM, Fernão Cardim. *Tratados da terra e gente do Brasil*. Introdução e notas de Ana Maria de Azevedo. Lisboa: Comissão Nacional para as Comemorações dos Descobrimentos Portugueses, 1997.

³ FERREIRA, Alexandre Rodrigues. *Viagem Filosófica pelas Capitâneas do Grão Pará, Rio Negro, Mato Grosso e Cuiabá: 1783-1792 (2 vols.)*. Rio de Janeiro: Conselho Federal de Cultura, 1971.

Está na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas, na categoria Em Perigo de Extinção, e com tendência a redução devido à destruição e fragmentação de seu habitat como resultado da exploração de sua região de ocorrência (extração ilegal de madeira) e ainda é considerada uma espécie muito desejada pelo tráfico de animais silvestres (IUCN, 2011). Atualmente é parte integrante de dois Planos de Ação do Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente, que identificam e orientam ações de preservação, o Plano de Ação Nacional para Conservação do Xingu e o Plano de Ação Nacional para a Conservação das Aves da Amazônia (ICMBIO, 2012).

A espécie foi descrita por Stotz et al. (1996), como altamente sensível a perturbações ambientais tendo prioridade em ações de conservação e necessidade de pesquisa. Laranjeiras (2011) encontrou ninhos da espécie em árvores localizadas em áreas abertas nas proximidades da mata contínua, e expostas a perturbação antrópica.

Segundo Silveira e Belmont (2005) a derrubada das árvores, utilizadas como dormitório ou ninho pelos indivíduos da espécie, é o meio mais usual para obtenção de ararajubas na região, causando prejuízos para todas as outras espécies que também dependem de cavidades naturais.

A ararajuba é um psitacídeo do tamanho de um papagaio, mas com cauda comprida (SICK, 2001). São aves que vivem comumente em grupos de 2 a 7 indivíduos (famílias onde os filhotes – facilmente identificados pela coloração esverdeada de suas penas - de até 1 ano acompanham os pais), sendo que já foram observados até trinta indivíduos no mesmo grupo, alojando-se e reproduzindo-se em árvores altas e apresentam atitudes territorialistas quando da presença de outras aves. Alimentam-se de frutos inteiros, sementes, polpa, flores, broto, néctar e casca de Murici (*Byrsonima* spp.) e Cróton (*Croton matourensis*), principalmente (YAMASHITA, 2003; LARANJEIRAS, 2011). Sua reprodução geralmente ocorre entre dezembro e abril, mas já foi observada em outubro. Nos ninhos, é comum observar várias fêmeas contribuindo com cuidados de dois ou três ovos. Já houve registro de até nove jovens em um ninho na natureza, e até quatorze em cativeiro (IUCN, 2011).

Em populações ameaçadas, o manejo reprodutivo *ex situ* é uma importante ferramenta de conservação, uma vez que garante manutenção de diversas populações de animais, o que preserva a variabilidade genética das espécies.

Em cativeiro, a reprodução da espécie não parece ser uma tarefa complicada, e, aparentemente, vem sendo obtida desde 1939, quando um casal se reproduziu em um criadouro particular no Sri Lanka (HILL⁴, 1939 apud SILVEIRA; BELMONTE, 2005, P. 93). Atualmente, há alguns criadores no Brasil trabalhando com a espécie – no estado de São Paulo, criadores têm 13% de nascimento e 6% de óbitos (porcentagens em relação ao total de animais em cativeiro) (LEITE et al., 2012). Infelizmente, inexitem estatísticas populacionais mais precisas.

Figura 3 – Casal de ararajubas (*Guaruba guarouba*) na Fundação Lymington – Juquitiba/SP - 2012



Fonte: Juliana A SInhorini.

⁴ Hill, W. C. O. Breeding of the Queen of Bavaria's Conure in captivity. **Avicultural Magazine**, p. 387 – 389, 1939.

2.3 ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DE AVES

A sobrevivência em ambientes sazonais requer que os indivíduos não apenas ajustem processos homeostáticos às condições ambientais, como também garantam que a reprodução ocorra em uma época do ano favorável à sobrevivência dos filhotes (WINGFIELD, 1980).

Segundo Pollock e Orosz (2002) fotoperíodo é a sinalização ambiental mais importante para atividade reprodutiva na maioria das aves, sendo especialmente vital nas espécies que demonstram atividade reprodutiva sazonal (Assenmacher; Boissin, 1972; DUNN et al., 2009). Outros fatores importantes são temperatura, precipitação, vocalizações, a presença de material de nidificação e/ou a presença de um companheiro (LAUGHLIN, 2009). Alguns psitacídeos (periquito-australiano, calopsita, cacatuas) parecem especialmente sensíveis à fotoestimulação (MYERS et al., 1989; CONSTANTINI et al., 2009).

O ciclo reprodutivo das aves pode ser dividido em três estágios fisiológicos distintos: sensibilidade, estimulação e refratariedade (MORAIS et al., 2012). Durante a primeira fase, o cérebro é capaz de responder a estímulos ambientais desencadeando comportamentos reprodutivos e, em seguida entra em uma fase de fotorefratariedade, onde se torna incapaz de responder a estímulos. Esse é o mecanismo pelo qual a reprodução é limitada a uma época do ano. (LEWIS, 2009).

Assim como os mamíferos, as aves possuem órgãos que regulam o sistema endócrino. Estes são dirigidos pelo hipotálamo, que atua de forma coordenada com a glândula hipófise, compreendendo o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (UBUKA; BENTLEY, 2011). Este eixo harmoniza o sistema endócrino e afeta todas as fases do ciclo de vida. A organização do eixo ocorre durante os períodos embrionários e perinatal, ativa-se durante a maturação sexual, coordena o pico da função reprodutiva no adulto, e declínio da função reprodutiva durante o envelhecimento. Em cada uma destas fases, o eixo responde de uma forma específica para cada idade e espécie, por exemplo, aves territoriais podem apresentar comportamento mais agressivo para proteger sua prole, enquanto outras se comportam escondendo seus filhotes. Da mesma forma, filhotes de aves precoces têm um período curto de cuidado parental. Estas disparidades são importantes ao considerar diferentes

tratamentos para incrementar a reprodução das diversas espécies (OTTINGER et al., 2007).

O hipotálamo integra sinais a partir do ambiente, gônadas e corpo sincronizando o desenvolvimento e maturação do sistema reprodutivo através da ativação adequada e liberação do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que atua na hipófise (DUNN et al., 2009). Esta, por sua vez, libera LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) que atuam sobre as gônadas promovendo atividade reprodutiva. Nas aves não se conhece ao certo a influencia do GnRH na liberação do FSH, portanto alguns autores não consideram o termo GnRH correto, usando o nome LHRH (hormônio liberador de hormônio luteinizante) (GOLDSMITH; FOLLETT, 1980; POLLOCK; OROSZ, 2002).

As galinhas possuem duas formas de GnRH (ou LHRH): GnRH-I e GnRH-II. O GnRH-II não parece ter ação direta sobre a glândula hipófise em aves, e pode não estar envolvido na reprodução (JOHNSON, 2000). Em outras espécies já foi relatada a presença das duas formas de GnRH (CROSTA et al., 2003).

Além do GnRH, as hipófise das aves também produz GnIH (hormônio inibidor de gonadotrofinas). Este hormônio, isolado do cérebro de codornas (TSUTSUI et al., 2000) já foi descrito também em algumas espécies de passeriformes e galinha, parece inibir a hipófise apenas durante certos períodos antes da maturação sexual ou em resposta a estímulos estressores (DUNN et al., 2009; UBUKA; BENTLEY, 2011).

Outro hormônio hipotalâmico importante em aves é o VIP (peptídeo intestinal vasoativo) – inicialmente descoberto no intestino. O VIP atua na liberação de prolactina pela hipófise anterior (UBUKA; BENTLEY, 2011).

A hipófise (ou pituitária) está intimamente conectada ao hipotálamo, e localizada na base do cérebro. Possui duas partes: adenohipófise (lobo anterior) e neurohipófise (lobo posterior). A primeira responsável por secretar hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), tireotrofina (TSH), prolactina, hormônio de crescimento (GH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A neurohipófise produz os hormônios mesotocina e arginina vasopressina nos corpos

celulares posicionados no hipotálamo e transportados por axônios modificados à hipófise posterior (STURKIE, 1965).

O LH estimula a esteroidogênese (POLLOCK; OROSZ, 2002), mas seu principal papel é na indução da ovulação nas fêmeas. Ele, junto com a prolactina são os principais reguladores na atividade reprodutiva das aves (MORAIS et al., 2012).

A prolactina atua inibindo sistematicamente a liberação de gonadotrofinas, porém, também desempenha um papel estimulatório no desenvolvimento final dos folículos ovarianos e na postura de ovos (SHARP et al., 1998). Este hormônio também está associado à regressão gonadal induzida pelo desenvolvimento de fotorefratariedade (LEWIS, 2009).

O FSH pode estimular a produção de hormônios esteroides pelas células do folículo em desenvolvimento, particularmente dos folículos menores (SCANES, 2000). Também promove maturação gonadal, desenvolvimento e seleção folicular e controla a taxa de atresia folicular e a secreção de esteroides sexuais, principalmente a progesterona pelas células da granulosa de folículos pré-hierárquicos (JOHNSON, 2000). Nas fêmeas, o pico de FSH ocorre 15 horas antes da ovulação (JOHNSON, 2007).

O folículo aviário difere do de mamíferos na medida em que contém a gema com o oócito flutuando sob as membranas de vitelo (POLLOCK; OROSZ, 2002). As células da granulosa são as principais fontes de progesterona e de pequenas quantidades de androgênios, enquanto que as células da teca produzem androgênios e estradiol. É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, porque não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, uma estrutura associada à prenhez (BAHR; JOHNSON, 1991).

Nas fêmeas, de quatro a seis horas antes da ovulação ocorre um pico na concentração plasmática de LH e de progesterona. LH e progesterona têm uma estreita relação e interação. Enquanto a progesterona aumenta naturalmente durante a ovulação, uma injeção de progesterona pode induzir um aumento pré-ovulatório de LH e promover ovulação prematura. Vários estudos indicam que a progesterona induz o pico de LH pré-ovulatório, através de um feedback positivo no

hipotálamo. Este pico de LH pré-ovulatório provavelmente fornece um estímulo para a vesícula germinal romper e para a ovulação subsequente (CROSTA et al., 2003). A progesterona exerce um papel estimulando a produção de avidina, contração do miométrio, e formação da casca do ovo (JOHNSON, 2000).

A testosterona e o estrógeno parecem não estar diretamente relacionados com a indução da secreção de LH e da ovulação, porém o estrógeno, junto com a progesterona, é necessário para estimular o hipotálamo e a hipófise. Os estrógenos têm uma variedade de funções, que incluem a regulação do metabolismo de cálcio para formação da casca do ovo, indução da expressão de receptores para progesterona, síntese de proteínas, e controle de desenvolvimento de características sexuais secundárias. Nos machos, a testosterona é responsável pela maturação sexual e, junto com estrógeno, induz ossificação de ossos medulares, este também está envolvido com a espermatogênese (EL HALAWANI et al., 1986; JOHNSON, 2000).

Nos machos, LH e FSH promovem crescimento testicular e espermatogênese (POLLOCK; OROSZ, 2002). A função testicular completa se deve a uma ação combinada do FSH e da testosterona que é o principal regulador da secreção do LH, atuando por meio de retroalimentação negativa, quando os níveis séricos de andrógenos estão elevados. O FSH atua estimulando as células de Sertoli, ao passo que o LH estimula as células de Leydig a produzirem testosterona. O efeito do FSH sobre as células de Sertoli é potencializado pela testosterona produzida pelas células de Leydig sob o estímulo do LH (JOHNSON, 2000; DEVICHE et al., 2011).

Os hormônios esteroides sexuais estão envolvidos com o desenvolvimento e a função reprodutiva dos testículos ao longo da vida do macho, sendo que a expressão de receptores para esses hormônios no testículo é variável de acordo com a idade do animal (GONZÁLEZ-MORÁN et al., 2008).

Após o período de reprodução, as aves entram no período de refratariedade, quando as gônadas regridem. A regressão do ovário inicia durante os dias que precedem a postura do último ovo, devido à diminuição da secreção da progesterona e aumento da secreção de prolactina (FRENCH, 2009; VLECK; VLECK, 2011). Esta em alta na circulação, determina redução do GnRH

hipotalâmico e LH hipofisário através de feedback negativo, iniciando a época de incubação de ovos (UBUKA; BENTLEY, 2011).

O hipotálamo também é responsável pelo controle de respostas fisiológicas ao estresse. Estressores físicos e psicológicos têm o potencial de ativar o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (RETTENBACHER; PALME, 2009). Frente a esses estímulos, o hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que atua na hipófise. Esta, por sua vez, libera hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea que vai atuar na córtex da glândula adrenal desencadeando secreção de hormônios glicocorticoides ligados ao estresse. Em aves, o principal glicocorticoide produzido pela glândula adrenal é a corticosterona (CARSLIA; HARVEY, 2000).

Poucos estudos abordam os efeitos dos glicocorticoides sobre a reprodução nas aves. Sabe-se que entre populações, níveis maiores de estresse ambiental causam menor taxa de fertilidade, porém dentro de uma mesma população, a análise dos indivíduos frente a diferentes estímulos em variadas épocas reprodutivas são necessários (BREUNER, 2011).

De acordo com a visão tradicional dos papéis da corticosterona nas aves, deve existir um conflito durante a reprodução, porque o aumento dos níveis desse hormônio se correlaciona com o aumento da demanda de criação de filhotes, mas também tem sido associada ao abandono do ninho (LOVE et al., 2004). Romero (2002) realizou um levantamento de artigos publicados envolvendo diferenças sazonais nas concentrações de glicocorticoides em diferentes vertebrados e, dentre os trabalhos avaliados em aves, 72% mostraram diferenças com valores maiores de glicocorticoides dentro da época reprodutiva.

O papel dos glicocorticoides durante a ovulação e oviposição não é claro, já tendo sido relatados aumento da corticosterona plasmática em espécies durante a postura ou incubação e queda em outras espécies na mesma época (JOHNSON, 2000).

As aves são extremamente diversificadas em suas organizações sociais e estratégias reprodutivas, incluindo aspectos relativos à época reprodutiva, formas de acasalamento e variação dos níveis hormonais (SCANES, 2000). O levantamento de

trabalhos publicados trás informações das inúmeras diferenças entre as espécies e sexos (ROMERO, 2002), ou ainda dentro da mesma espécie e sexo, variações entre as épocas do ano (ASTHEIMER et al., 1994).

Por exemplo, Wikelski et al. (2003) descreveram em seu estudo com passeriformes neotropicais diferenças hormonais e em tamanho de gônadas em diferentes épocas do ano e em aves com diferentes sistemas de acasalamento (testículos maiores nas espécies poligâmicas). Sockman e Schwabl (1999) relataram níveis diferentes de progesterona em canários (*Serinus canarius*) em épocas do ano distintas. Nesta mesma espécie, foi descrito por Hurley et al. (2008) maiores níveis de GnRH em aves expostas a maior quantidade de luz. Hirchenhauser et al. (1999) relataram que em gansos (*Anser anser*), as concentrações de andrógenos, progesterona e estrógenos variaram nas diferentes condições sociais (pareado ou não pareado e com ou sem sucesso reprodutivo) dentro da mesma estação. Bluhm et al. (1983) descreveram que os níveis séricos de hormônio luteinizante (LH), prolactina, estradiol e progesterona foram significativamente menores em pato-real (*Anas platyrhynchos*) estressados sem filhotes comparados aos com filhotes. Foi sugerido por Duyse et al. (2003) que em machos de chapim-real (*Parus major*) os níveis de testosterona apresentam pico anual mais relacionado à territorialidade do que à fertilidade do companheiro ou canto. Popp (2006) observou menor excreção de corticóides durante o outono, com níveis igualmente elevados nas demais estações para machos e fêmeas de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona braziliensis*).

Há diferenças ainda, nas respostas adrenais a estímulos nas diferentes espécies (DUSSEAU; MEIER, 1971; JOSEPH; MEIER, 1973; CARERE et al, 2003; BÁLTIC, 2005; MORMÈDE et al., 2007). Por exemplo, em galinhas a aplicação de ACTH estimula resposta em 5 minutos, enquanto em perus há um atraso de 30 minutos no aumento das concentrações de glicocorticoides na corrente sanguínea (CARSIA; HARVEY, 2000). Wasser et al. (2000) descreveram diferenças na resposta a estímulo adrenal em desafio de ACTH, entre machos e fêmeas, destacando a época reprodutiva com valores maiores.

Devido a essa diversidade, muitas vezes é difícil determinar os fatores ambientais que regulam a reprodução nas aves. Comparadas com outros vertebrados, a complexidade do ciclo reprodutivo, as diferenças em habitats onde se

reproduzem indicam grande flexibilidade no controle endócrino da reprodução (BENTLEY et al., 2007). Esta é uma questão crítica para aves em cativeiro que se reproduzem em épocas determinadas do ano e desenvolvem condições patológicas associadas à inadequada ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (OTTINGER et al., 2002).

Na ordem Psittaciformes, as informações disponíveis a respeito de endocrinologia reprodutiva são escassas (LEE et al., 1999; MANS e TAYLOR, 2008), sendo que não foram encontrados na literatura informações sobre a endocrinologia reprodutiva da ararajuba.

2.4 MÉTODOS NÃO INVASIVOS

A quantificação de hormônios via plasmática fornece informações valiosas sobre as condições endócrinas de um animal, porém podem ocorrer variações uma vez que estas concentrações também estão sujeitas aos ritmos diário e anual. Além disso, a colheita de sangue é uma situação estressante e pode, por si só, causar alterações hormonais (MÖSTL et al., 2005).

O monitoramento pela mensuração das concentrações de metabólitos urofecais de esteróides oferece uma alternativa para o estudo da atividade endócrina de aves uma vez que é um método não invasivo e não estressante (STALEY et al., 2007). Além disso, esta técnica apresenta outras vantagens como, facilidade na obtenção das amostras, possibilidade de colheitas subsequentes por um longo período de tempo sem afetar o comportamento do animal estudado, e também consolida as flutuações hormonais periódicas que ocorrem no sangue (TOUMA; PALME, 2005).

Estudos demonstraram, em algumas espécies de aves, que a determinação de metabólitos hormonais via análise de excretas é viável para sexagem (BISHOP; HALL, 1991; LEE et al., 1999; DIAS; OLIVEIRA, 2006), mensuração da intensidade do estresse (RETTENBACHER; PALME, 2009; HIEBERT et al., 2000) e também na

avaliação da atividade gonadal (HIRSCHENHAUSER et al., 2000; STALEY et al., 2007; COSTANTINI et al., 2009; PEREIRA, 2010).

Popp (2006) concluiu em seu trabalho com papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) que a quantificação de glicocorticoides urofecais, pode ser utilizada como ferramenta auxiliar na formação de casais para reprodução em cativeiro, com base no perfil sazonal de excreção de glicocorticoides, definindo manejos e alterações com o plantel.

A metabolização hormonal ocorre em diferentes órgãos, com maior ênfase no fígado e rins. Nas aves, fezes e urina são eliminadas juntas na forma de excretas e a proporção de cada um não é constante nas amostras. Isto pode aumentar a variação entre amostras, portanto é importante manter um protocolo de homogeneização dos excretas (PALME, 2005).

Alguns autores preconizam a liofilização dos excretas como forma de padronização das amostras, uma vez que a concentração hormonal pode variar conforme a presença de água e, no caso de excretas de aves, onde a proporção entre fezes e urina não é estável, elimina-se mais uma variável que pode alterar os resultados. (HIEBERT et al., 2000).

A dieta também é um fator importante a ser considerado. Segundo Klassing (2005), a mensuração de hormônios em fezes requer uma apreciação da estratégia nutricional de um animal, a fim de aperfeiçoar protocolos de coleta, validar técnicas, interpretar os resultados e minimizar a variabilidade de artefatos. Aves que se alimentam de carne, néctar ou sementes, levam mais tempo para digerir os alimentos aumentando a concentração de metabólitos hormonais nas fezes (que também são em menor quantidade), enquanto nas aves frugívoras, o tempo de digestão é menor e as fezes apresentam-se mais volumosas.

A escolha por métodos de mensuração não invasiva para monitoração de hormonal em mamíferos e aves tem crescido substancialmente (DEHNHARD et al., 2003). Mediante as diferenças consideráveis no metabolismo de esteroides, é impossível determinar qual metabólito urofecal predomina e qual anticorpo utilizar nas diferentes espécies (PALME et al., 1998), devido a isso as validações devem ocorrer em cada espécie estudada (PALME et al., 2005; TOUMA; PALME, 2005).

Os metabólitos excretados podem se apresentar na forma livre ou conjugada (sulfatos ou glucoronidos), com maior ou menor possibilidade de detecção pelo anticorpo, sendo que em alguns casos será necessário o tratamento prévio das amostras efetuando-se solvólise e/ou hidrólise. Cada hormônio gera uma série de metabólitos com diferentes estruturas químicas e com diferentes epítomos para serem reconhecidos pelo anticorpo (PALME, 2005). Os imunoensaios para dosagens têm que levar em conta a capacidade de um determinado anticorpo em reconhecer estes metabólitos em uma matriz urofecal (RETTENBACHER et al., 2004). Touma e Palme (2005) também recomendam com ênfase que sejam feitas validações fisiológicas e biológicas, para cada espécie e até mesmo entre os sexos, antes de qualquer tentativa de mensurar metabólitos urofecais.

2.5 EXCRETAS

Na cloaca das aves há a mistura das fezes e urina e sua eliminação dá-se simultaneamente, sob a forma de excretas, tornando-se muito difícil distinguir as duas frações (GOYMANN, 2005). Em estudos envolvendo metabólitos hormonais em excretas, devem-se levar em conta as diferenças entre as duas porções ou fazer a separação.

De acordo com Rettenbacher et al. (2004), realizar a separação total das duas frações é impossível, pois sempre haverá alguma contaminação das fezes pela urina. Além de o processo tomar muito tempo, apenas uma pequena porção de urina pode ser obtida.

Fujihara (2012) comparou dois grupos de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). Em um, realizou a separação dos excretas (somente fezes); e no segundo grupo, utilizou excretas totais (fezes + urina) para mensurar a concentração de metabólitos de glicocorticoides. Como resultado, não observou assincronia entre os perfis de excreção fecal e urofecal nos animais, e atribuiu o resultado ao fato das fezes de psitacídeos serem muitas vezes pastosas, tornando-se difícil a separação das duas porções.



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi autorizado pelo SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, sob número 344191-1.

Os experimentos foram conduzidos entre os meses de fevereiro e agosto de 2012, no Criadouro Científico para fins de Conservação Fundação Lymington, localizado em Juquitiba/SP, Brasil (Anexo A).

Este período experimental teve o intuito de abranger as épocas com e sem atividade reprodutiva no criadouro. Para determinar a época reprodutiva no local do experimento, foi realizada uma análise de dados da série histórica da Fundação Lymington, onde se averiguou que a época de postura de ovos da espécie ocorre entre os meses de janeiro a março, determinando o período de reprodução da espécie na Fundação.

Quanto à opção por trabalhar com excretas, na figura 4 estão demonstrados três padrões de excretas de ararajuba, coletadas para esse estudo. Em todos, nota-se que a separação entre fezes e urina seria impraticável. No primeiro padrão, devido ao caráter pastoso; no segundo, nota-se moderada quantidade de urina, porém as fezes estão contaminadas; no terceiro, quase não há urina, somente algum urato é visto junto com as fezes.

Figura 4 – Padrões de excretas de ararajuba (*Guaruba guarouba*) – Juquitiba/SP – 2012



Fonte: Juliana A. Sinhorini

3.1 AVES

Foram utilizadas 24 (vinte e quatro) ararajubas (*Guaruba guarouba*) adultas e clinicamente saudáveis, pertencentes ao plantel do criadouro (Apêndice A).

O grupo experimental era formado por três casais com histórico reprodutivo bem sucedido (C1, C2 e C4) (o histórico reprodutivo de ararajubas na Fundação Lymington encontra-se no Apêndice B), um casal (C3) formado por uma fêmea reprodutora e um macho adulto jovem, e 16 aves que nunca haviam sido pareadas, portanto, sem histórico de reprodução.

Ao final de um dos experimentos utilizando as aves não pareadas, um novo casal (C5) foi formado e transferido para um dos viveiros de reprodução. Este casal realizou postura de ovos, e também teve amostras coletadas após pareamento.

Os casais foram mantidos em viveiros de reprodução com 2,5 metros de altura e área de 1,5 m², com caixa ninho de madeira suspensa (Figura 5). As outras dezesseis aves, sendo oito machos e oito fêmeas, foram mantidas em gaiolas de aço inox com 1 metro de altura e 1 m² de área, sem caixa ninho (Figura 6), sendo que as gaiolas foram divididas pela metade havendo 1 indivíduo de cada sexo ocupando cada metade.

Tanto os aviários de reprodução, como as gaiolas, tiveram o manejo diário de limpeza/desinfecção e troca de alimentos/água duas vezes ao dia (manhã e entardecer). Todas as aves possuíam água *ad libitum*. A alimentação fornecida pela manhã era composta de ração comercial extrusada (Nutrópica[®], Indaiatuba, SP), semente de girassol pequena germinada, frutas, verduras e legumes variados e uma fatia de espiga de milho verde (2 cm) para cada ave de três a quatro vezes por semana. Uma vez por semana eram adicionados mais alguns itens, descritos a seguir: ovo cozido, gérmen de trigo e complexo proteico/vitamínico (Aminomix pet[®], Vetnil, Louveira, SP). À tarde as aves recebiam a mesma ração comercial extrusada, mistura de sementes para psitacídeos (alpiste, painço, níger, colza, arroz e aveia) e frutas variadas.

Figura 5 – Viveiros de reprodução de ararajubas (*Guaruba guarouba*) pertencentes ao Criadouro Fundação Lymington – Juquitiba/SP - 2012



Fonte: arquivos Fundação Lymington.

Figuras 6 – Gaiolas de manutenção de ararajubas (*Guaruba guarouba*) durante o período experimental, pertencentes ao Criadouro Fundação Lymington – Juquitiba/SP – 2013



Fonte: André Saidenberg.

Durante o mês de Fevereiro, os casais pareados foram acostumados ao manejo necessário para a coleta das amostras. Os machos tiveram a ponta das caudas cortadas para melhor identificação (Figura 7) e, os viveiros de reprodução foram preparados para os experimentos, através da colocação de uma porta interna de tela, que dividia o viveiro pela metade, para possibilitar a identificação da procedência das amostras (machos ou fêmeas). Esta ficava aberta, e era fechada somente durante o período de coleta de amostras, deixando uma ave em cada metade. Além disso, foi feita colocação de lona branca embaixo da grade do viveiro para a coleta das fezes (Figura 8). Os animais não pareados, que foram mantidos nas gaiolas individuais, fizeram o período de adaptação ao ambiente experimental durante os meses de fevereiro e março. As coletas das amostras nas gaiolas eram feitas através da colocação de jornal no fundo, este era trocado após cada intervalo de coleta.

Figura 7 – Fotografia mostrando macho (cauda cortada) e fêmea de ararajuba (*Guaruba guarouba*), separados para coleta de amostras – Juquitiba/SP – 2012



Fonte: Juliana A. Sinhorini.

Figura 8 – Viveiros de reprodução de ararajubas (*Guaruba guarouba*) preparado para coleta de amostras, no criadouro Fundação Lymington – Juquitiba/SP – 2012



Fonte: Juliana A. Sinhorini.

O presente estudo foi dividido em 3 experimentos, a saber:

3.2 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM EXCRETAS DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*) – DESAFIO DE ACTH

Este experimento foi realizado com 16 ararajubas, sendo oito machos e oito fêmeas, mantidos em gaiolas individuais, divididos em dois grupos (GI – 3 casais e GII – 5 casais), a saber: GI recebeu tratamento com ACTH (Tetracosactídeo, Synacthen depót[®], Novartis Pharma, Bruxelas) por via IM, na dose de 0,5 mg/kg (HARVEY et al., 1980) e GII foi grupo controle, sendo que não passou por tratamento algum e não teve contato visual ou auditivo com o GI, durante a aplicação do ACTH. Com intervalo de 15 dias (descanso), os grupos foram invertidos sendo que GI foi controle e GII recebeu tratamento com ACTH.

Durante este experimento, foram coletados excretas das aves um dia antes da aplicação do ACTH (-24h). No dia da aplicação foi realizada uma colheita no período entre 7 e 10 horas da manhã (-2h), sendo então realizada a contenção física das aves e aplicação do ACTH e a partir deste momento, todas as amostras produzidas no período de 24 horas foram coletadas, agrupadas em períodos de 2 horas (amostras +2h a +24h). Um dia após o teste foi feita mais uma coleta no período entre 7 e 10 da manhã (+48h). (Figura 9).

Todos os excretas deste experimento foram colhidos em tubos plásticos, identificados (Figura 10) e armazenados no freezer até o momento das extrações.

Figura 9 – Delineamento do experimento da validação fisiológica dos ensaios para mensurar metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajuba (*Guaruba guarouba*) – Desafio de ACTH – São Paulo - 2013

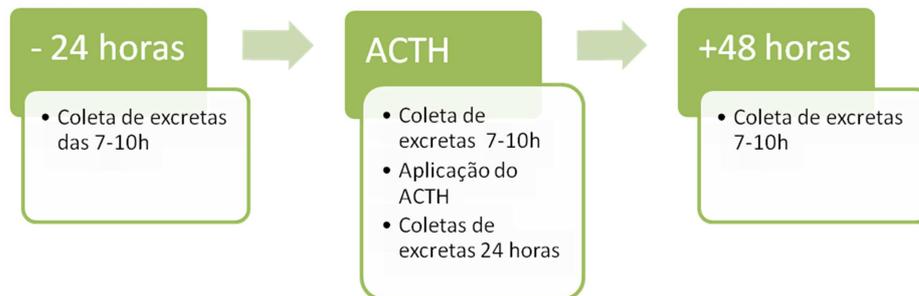


Figura 10 – Tubos plásticos contendo amostras de excretas de ararajuba (*Guaruba guarouba*), devidamente identificados – Juquitiba/SP - 2012



Fonte: André Saidenberg

3.3 DESCRIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES, TESTOSTERONA, ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE MACHOS E FÊMEAS DE ARARAJUBAS (*Guaruba guarouba*), EM DIFERENTES CATEGORIAS REPRODUTIVAS

Este experimento foi realizado com as aves pareadas com histórico de sucesso reprodutivo (4 casais – C1, C2, C3 e C4) e apresentou duas etapas, a primeira durante os meses de fevereiro e março e a segunda durante os meses de julho e agosto, no ano de 2012.

Na primeira fase, o casal C4 estava realizando incubação de ovos.

Foram coletadas amostras de excretas diariamente, totalizando 30 dias, em cada uma das etapas. Pela manhã, os casais eram separados durante o período de 3 horas (7-10 horas) e todos os excretas deste período foram colhidos em tubos plásticos, identificados (Figura 10) e armazenados no freezer até o momento das extrações.

Ao final do experimento do desafio de ACTH, um novo casal de ararajubas (C5) foi formado e colocado em um viveiro de reprodução. Durante a segunda fase do período experimental, este casal começou a apresentar comportamento reprodutivo, com postura de cinco ovos.

Foi realizada coleta de amostras de excretas deste casal em dias aleatórios, durante os quais ocorreram três posturas. Devido ao fato de o viveiro onde estava esse casal não estar preparado para as coletas, estas eram feitas sempre pela manhã.

No dia anterior, o ninho era fechado e, pela manhã, após a abertura do mesmo, as coletas eram feitas no momento da defecação das primeiras fezes da manhã, através da observação do casal (o reconhecimento do macho e da fêmea era feito através da visualização de características individuais).

3.4 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE TESTOSTERONA, ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*) – DESAFIO DE GNRH

Neste experimento, realizado fora da época reprodutiva, 4 casais (C1, C2, C3 e C4) de ararajuba foram divididos em dois grupos (GI – 2 casais e GII – 2 casais), a saber: GI recebeu tratamento com análogo de GnRH (Acetato de Buserelina, Sincroforte[®], Ourofino, Brasil) na dose de 10µg/kg (CONSTANTINI et al., 2009), por via subcutânea, e o grupo GII foi considerado controle, recebendo solução salina, no mesmo volume ao GI por via subcutânea.

Durante este experimento, foram coletados amostras 2 horas antes da aplicação do GnRH / Sol. Salina, no período entre 7 e 10 da manhã, sendo então feita a aplicação e a partir deste momento, todas as amostras produzidas no período de 24 horas foram coletadas. Pelo fato de as aves terem costume de dormir dentro do ninho, a partir das 17 horas não houve coletas noturnas sendo que o ninho foi mantido fechado durante a noite e reaberto às 5:00 da manhã, quando então eram retomadas as coletas até completar as 24 horas (Figura 11).

Todos os excretas deste experimento foram colhidos em tubos plásticos, identificados (Figura 10) e armazenados no freezer até o momento das extrações.

Figura 11 – Delineamento do experimento da validação fisiológica dos ensaios para mensurar metabólitos de testosterona, estrógeno e progesterona em excretas de ararajuba (*Guaruba guarouba*) – Desafio de GnRH – São Paulo - 2013



3.5 EXTRAÇÃO FECAL E DOSAGEM DOS METABÓLITOS

Os excretas homogeneizados foram liofilizados, pesados na quantidade de 0,2 gramas e transferidos para tubos de ensaio devidamente identificados.

A extração dos metabólitos hormonais presentes nos excretas foi realizada segundo técnica descrita em Palme (2005), através da homogeneização de 0,2 gramas da amostra em 5 ml de solução de metanol 80%, seguida de centrifugação e colheita de 1 ml do sobrenadante em tubos plásticos para evaporação. Estes, depois de realizada a evaporação em câmara com fluxo de ar comprimido, continham o extrato dos esteroides presentes na amostra.

A opção por esta técnica se deu em decorrência da necessidade de que o processo de extração fosse o mais simples possível, já que como afirmado no mesmo trabalho, etapas adicionais no processo aumentam a variação das concentrações determinadas; além de este método ter alta taxa de recuperação.

Após a extração, os tubos secos contendo os metabólitos foram enviados para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biomédicas/Bioquímica da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, Áustria, onde foram mensurados sob a supervisão do Prof. Dr. Rupert Palme.

As concentrações dos metabólitos hormonais foram quantificadas pela metodologia de enzimaensaio baseando-se nos procedimentos descritos por Palme; Mostl (1994); Palme; Mostl (1997); Mostl; Palme (2002); e Mostl et al. (2005).

O ensaio imunoenzimático é um ensaio competitivo que tem como princípio, de forma resumida, a detecção dos metabólitos dos esteróides através da sua ligação com anticorpos grupo-específicos previamente aderidos à microplacas de polietireno. Foram utilizadas microplacas com 96 poços (MaxiSorp, Nunc, Rochester, NY, EUA).

Utilizamos os anticorpos 4-pregnene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione-21- hs:BSA para mensurar metabólitos de corticosterona (RETTENBACHER et al., 2004); 5 β -pregnane-3 α -ol-20-one 3HS: BSA para mensurar metabólitos de progesterona

(SCHWARZENBERGER et al., 1996); 17β -oestradiol-17-HS: BSA para mensurar metabólitos de estrógeno e 5α -androstane- 3α -ol-17-one-HS:BSA para mensurar metabólitos de testosterona (PALME; MOSTL, 1993).

As microplacas foram preparadas com uma solução de 50 μ g de proteína A (Sigma P-7837) dissolvidas em 25 ml de solução tampão (Na_2CO_3 :1,59g/L; NaHCO_3 : 2,93g/l;pH 9,6) marcadas com o anticorpo diluído em solução de marcação (Na_2CO_3 :1,59g/L; NaHCO_3 : 2,93g/l;pH 9,6) e incubadas a 4°C por 16 horas. Após este período, as placas foram submetidas a um ciclo de três lavagens com solução de lavagem (NaCl : 87,66g/L; Tween – 20:0,5 %).

Os extratos secos, após resuspensão, foram conjugados com enzima (HRP: horseradishperoxidase) e diluídos em solução tampão ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,421 g/L; Na_2HPO_4 : 8,662 g/L; NaCl : 8,7 g/L; Albumina sérica bovina: 1,0 g/L; pH 7,0). Posteriormente foram pipetadas, sendo as placas seladas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas, secas e receberam o substrato cromógeno. A reação cromógena será parada com solução Stop (H_2SO_4 96%: 10%). A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro MultiPROBE® (Packard), sendo que todas as amostras foram dosadas em duplicatas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas as análises estatísticas descritivas com o cálculo de média e desvio-padrão, para as concentrações encontradas de todos os metabólitos hormonais de cada animal.

Foram considerados validados os ensaios onde foi possível caracterizar a existência de um pico após aplicação do hormônio GnRH (picos de estrógeno, testosterona e progesterona) ou ACTH (picos de corticosterona).

Foram considerados picos, os valores que ultrapassaram a média das concentrações de cada hormônio obtidas de todas as amostras, acrescidas de um e meio desvios padrão.

Também foram comparadas as médias obtidas para cada variável hormonal em todas as categorias reprodutivas. Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias através do teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Barlett.

Caso os dados fossem considerados normais e homogêneos, era utilizado o teste *One Way ANOVA*, seguido do pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

Caso não houvesse normalidade e homogeneidade de variâncias, os dados eram transformados (logaritmo na base 10 ou raiz quadrada de X) e, se a transformação não fosse suficiente, eram utilizadas análises não paramétricas, como o Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) seguido de teste de Dunn ($p < 0,05$) ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

Para avaliar a existência de correlação entre as concentrações de estrógeno, progesterona e corticosterona; e testosterona e corticosterona, no desafio de GnRH, foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad InStat versão 3.01, 32bit para Windows® 95.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de coleta de amostras dentro da época reprodutiva, nenhum dos casais realizou postura, ou seja, não houve atividade reprodutiva esperada no delineamento experimental.

Quinze dias antes do início das coletas dentro da época reprodutiva, houve postura de três ovos pelo casal C4, que os incubou até o 12º dia do período experimental. Os filhotes foram retirados do ninho no dia do nascimento, pois este casal apresentava histórico de perda de filhotes.

Fora da época reprodutiva, um casal de ararajubas (C5) que não fazia parte do grupo experimental, por ser formado por indivíduos jovens sem histórico de sucesso reprodutivo, apresentou postura de cinco ovos. Amostras de excretas deste casal foram coletadas em dias aleatórios fora da época reprodutiva, durante os quais, ocorreram posturas. As variações das concentrações de metabólitos de glicocorticoides, testosterona, estrógeno e progesterona deste casal durante postura não puderam ser determinados, pois as coletas foram realizadas sem sequência de dias, como mostra a tabela 1. Além disso, não houve coletas antes das posturas e não há dados exatos das duas últimas posturas. Devido a isso, foi feita análise apenas das médias das concentrações.

Em função dos eventos acima mencionados optou-se por discutir os resultados de cada metabólito nas diferentes abordagens, a saber: metabólitos de glicocorticoides, metabólitos de testosterona, metabólitos de estrógeno e metabólitos de progesterona. agrupados por categorias de atividade reprodutiva (Sem atividade reprodutiva - SR, Atividade de Incubação - I e Atividade de Postura - P).

Os resultados das variações das concentrações de metabólitos de glicocorticoides, testosterona, estrógeno e progesterona no casal C4, antes e após a retirada dos ovos do ninho também são apresentados, separadamente.

Tabela 1 – Sequência de coleta de amostras em casal de ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante postura fora da época reprodutiva – São Paulo – 2013

Data	Evento casal C5
30/jul	Ovo 1
09/ago	Ovo 2
11/ago	Ovo 3 + amostras
12/ago	Amostras
13/ago	Amostras
17/ago	Ovo 4*
18/ago	Amostras
19/ago	Amostras
20/ago	Amostras
24/ago	Ovo 5*
25/ago	Amostras
26/ago	Amostras

*Data da visualização de ovos no ninho.

4.1 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) EM EXCRETAS DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*) – DESAFIO DE ACTH

Neste experimento foram coletadas 387 (trezentas e oitenta e sete) amostras de excretas de 16 ararajubas (8 machos e 8 fêmeas).

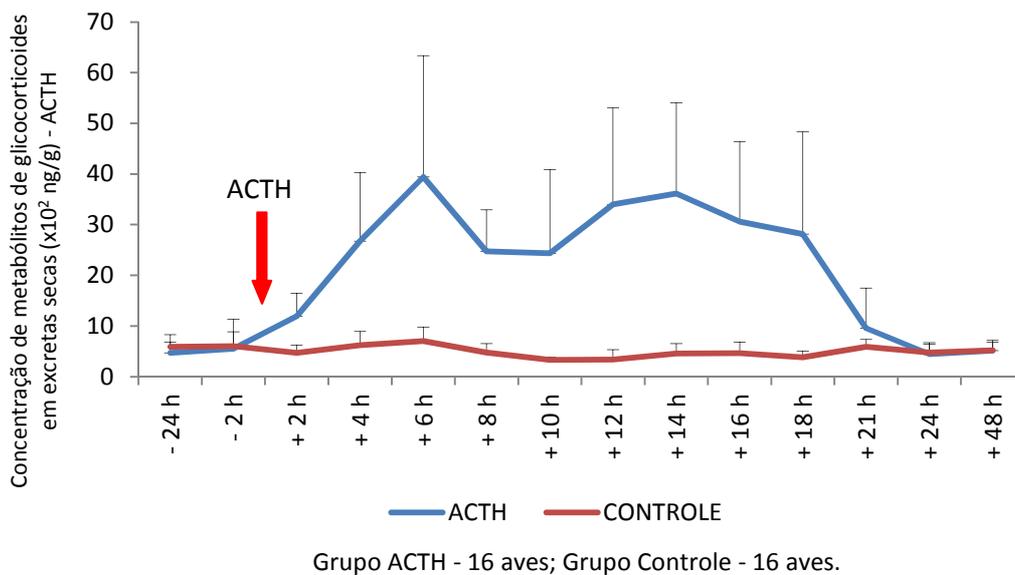
Foi observado poliúria e arrancamento de penas em todas as aves no grupo tratado, após a aplicação do ACTH. A normalização da poliúria e o fim do arrancamento de penas foram observados respectivamente entre 15 a 20 horas e dois dias após a aplicação. Três aves (LYM 043, LYM 059, e LYM 037) apresentaram fezes enegrecidas entre 6 a 20 horas após aplicação do ACTH.

O estimulador mais eficaz da secreção de GC em aves é o ACTH (CARSIA; HARVEY, 2000). Em vertebrados, a administração de ACTH simula a resposta natural da adrenal a estímulos estressores, causando um rápido aumento na concentração de GC (cortisol ou corticosterona) circulantes em poucas horas (WASSER et al., 2000). O mesmo padrão ocorre nas fezes, com o início dos

aumentos ocorrendo um pouco atrasados, de acordo com o padrão de excreção dos metabólitos em cada espécie (PALME et al., 1998).

O método não invasivo de mensuração de metabólitos de GC pôde ser considerado validado fisiologicamente na espécie ararajuba (*Guaruba guarouba*), pois a aplicação de ACTH foi capaz de induzir a ocorrência de picos de concentração de metabólitos de GC, com valores até vinte vezes maiores do que as concentrações basais (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Variação das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajubas (*Guaruba guarouba*), durante desafio de ACTH – São Paulo/SP - 2013



Ao avaliar o perfil das concentrações de metabólitos de GC nos excretas dos animais do grupo controle, observa-se que não houve picos e sugere-se variações circadianas, com diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os períodos manhã (7-13 hs), tarde (13-17 hs) e noite (17-6 hs) (Gráfico 2). O período da tarde foi o que apresentou excretas com maiores concentrações de metabólitos de GC, sendo que o pico de excreção ocorreu entre 15 e 17 horas (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajubas (*Guaruba guarouba*), coletados durante 24 horas, agrupados nos períodos manhã, tarde e noite – São Paulo/SP - 2013

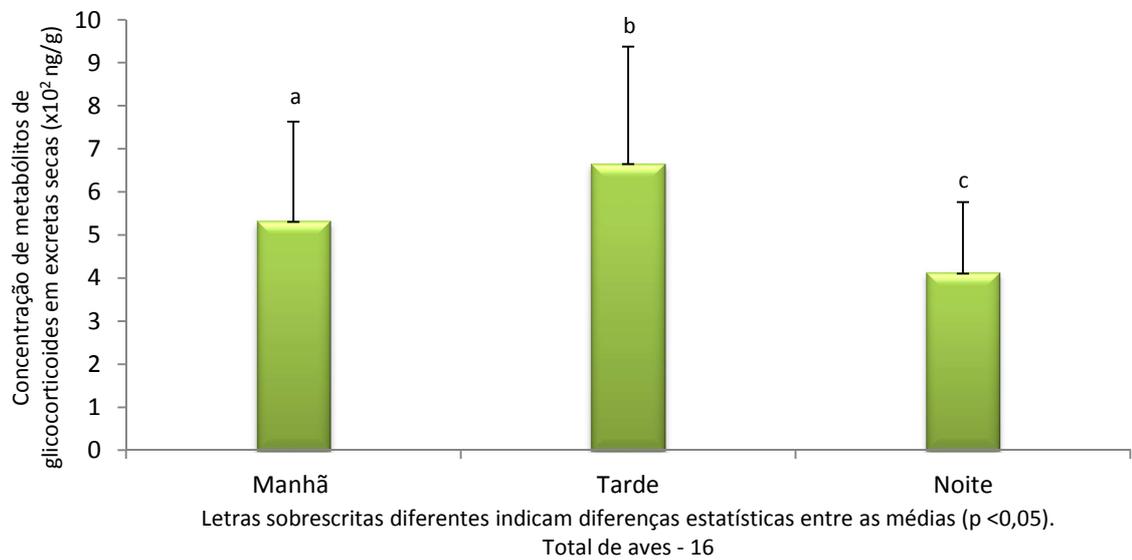
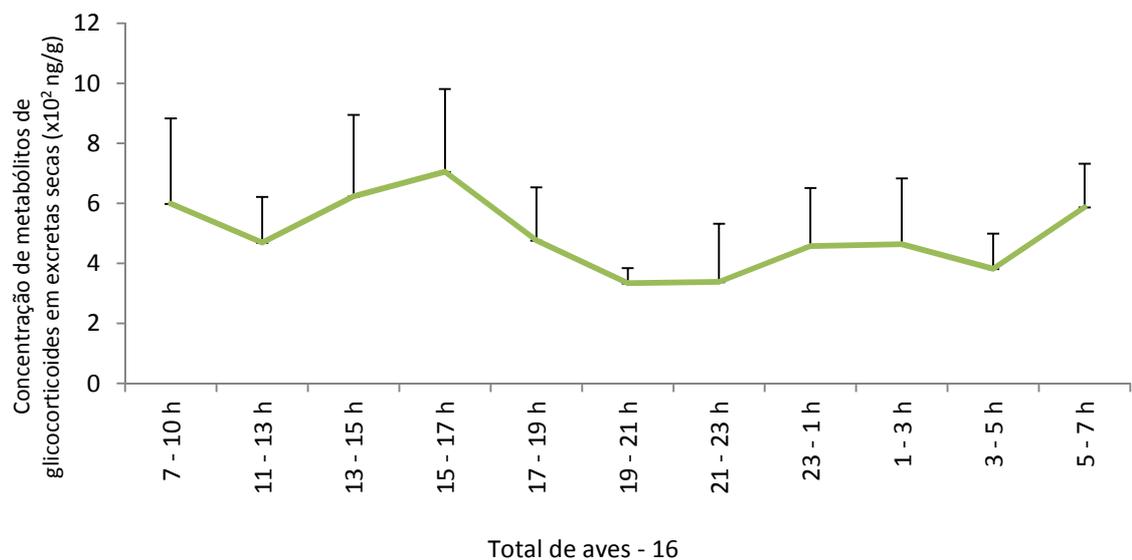


Gráfico 3 – Variação das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de ararajubas (*Guaruba guarouba*), coletados durante 24 horas, agrupados nos períodos de 2 horas – São Paulo/SP – 2013



Ao analisar estes resultados, deve-se atentar para o fato de que há um atraso no aparecimento do aumento das concentrações nos excretas, em relação aos valores plasmáticos, lembrando que houve uma diferença de 6 horas entre a aplicação e o pico de ACTH.

Estes resultados diferem daqueles encontrados por Fujihara (2012), que observou maiores concentrações de GC em excretas de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), pela manhã. Porém, em outros estudos realizados em diferentes espécies de pássaros, pombos e aves domésticas (galinha e codorna) (DUSSEAU; MEIER, 1971; JOSEPH; MEIER, 1973; CARERE et al, 2003; MORMÈDE et al., 2007) os autores encontraram maiores concentrações durante as horas do dia com menor intensidade de luz (entardecer, noite e amanhecer).

Essas diferenças podem ter relação com fatores externos, como por exemplo, fotoperíodo (MORMÈDE et al., 2007). Já, Assenmacher e Boissin (1972) relataram que apesar de o fotoperíodo ser o fator predominante na regulação endócrina, o padrão circadiano de circulação de corticosterona em aves permaneceu inalterado em diferentes fotoperíodos.

Quando se estuda excreção de GC, deve-se levar em conta a forma de obtenção das amostras. Em quase totalidade dos estudos, as amostras foram coletadas através de punção venosa, causando estresse nos animais (HARVEY et al., 1980) e dando informações pontuais do perfil endócrino (PALME et al., 2005). É importante ressaltar que neste experimento, os animais não foram contidos ou sofreram qualquer tipo de alteração de manejo durante as coletas das amostras, e ele foi realizado durante os meses de abril e maio. Sugere-se realização de mais estudos com a espécie durante as diferentes épocas do ano, mantendo o mesmo padrão de coletas de amostras a fim de verificar se há influências sazonais na liberação de metabólitos de GC na ararajuba, como o encontrado por Astheimer et al. (1994), em pardal-branco-coroado (*Zonotrichia leucophrys*).

Apesar deste estudo não incluir observações comportamentais, o arrancamento de penas foi um comportamento evidente em todas as aves do grupo tratado. Owen e Lane (2011) verificaram em seu estudo comparando papagaios-cinza-africanos (*Psittacus erithacus*), que os níveis de corticosterona em animais que

apresentavam automutilação eram quatro vezes maiores, comparados com aves que não apresentavam o comportamento de automutilação.

A ararajuba é uma das espécies que mais comumente apresenta alterações comportamentais ligadas à automutilação (LENNOX; HARRISSON, 2006), sugerindo que a aplicação do ACTH, e o conseqüente estímulo adrenal causado por esta deve ter sido suficiente para desencadear uma reação do tipo estresse nas aves, responsável pelo comportamento de automutilação, cessado após o estímulo e retorno dos valores de metabólitos de GC aos níveis basais, “apesar de este comportamento estar relacionado com estresse crônico” (PIZZUTO⁵, 2013).

No grupo ACTH, foram detectados aumentos nas concentrações de metabólitos de GC entre uma a três horas, com picos individuais de excreção entre 4 a 8 horas e 11 a 15 horas após aplicação do ACTH. Baseados no critério de média mais um e meio desvios-padrão, quando se analisa os gráficos individuais, fica evidente, apesar de encontrarmos na maioria deles apenas um pico, a existência de dois aumentos de concentração de metabólitos de GC significativos, em alguns casos de até 12 vezes as concentrações basais. Tanto é que quando observamos o gráfico 1, com as médias das concentrações do grupo, ficou claramente evidenciada a existência de dois picos.

A presença de dois picos após desafio com ACTH também foi verificado por Wasser et al. (2000), em corujas. Em mamíferos, que excretam urina e fezes separadamente, o aumento nas concentrações de metabólitos de GC aparece primeiro na urina (RETTENBACHER et al., 2004). Nas aves, devido à excreção de fezes e urina acontecer simultaneamente, é esperado encontrar dois picos de metabólitos de GC, o primeiro refletindo predominantemente os valores urinários e o segundo refletindo em maior proporção os valores fecais (MÖSTL et al., 2005) mais tardios em relação ao primeiro devido ao tempo de passagem intestinal (RETTENBACHER et al., 2004;).

⁵ Informação fornecida por Cristiane Schilbach Pizzuto, em 2013.

Foi observado declínio das concentrações, com normalização dos valores após 23 horas, demonstrados nos gráficos 4 a 19.

Gráfico 4 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea A1, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

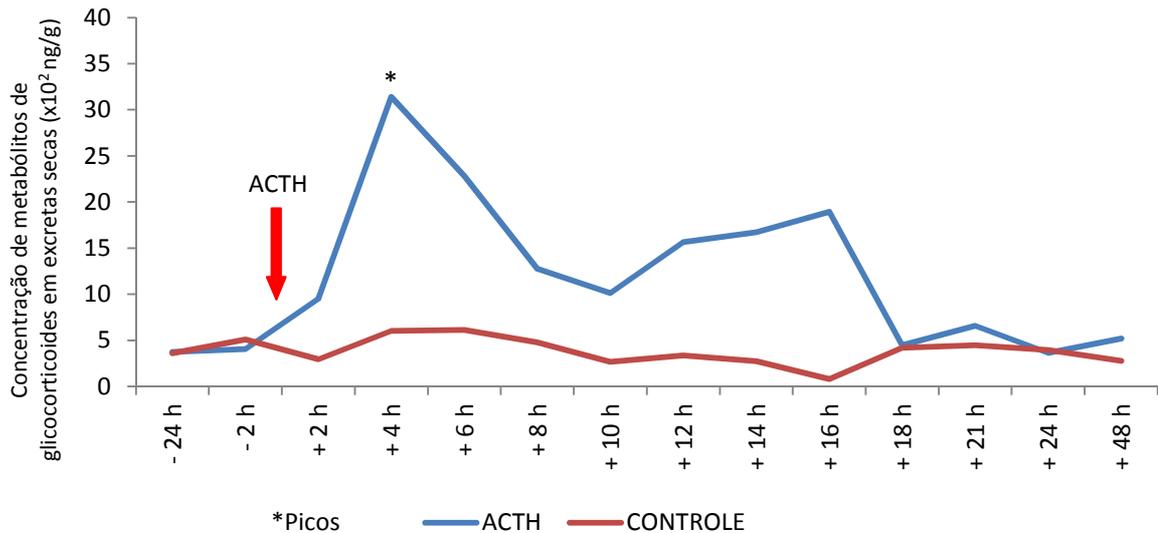


Gráfico 5 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea A2, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

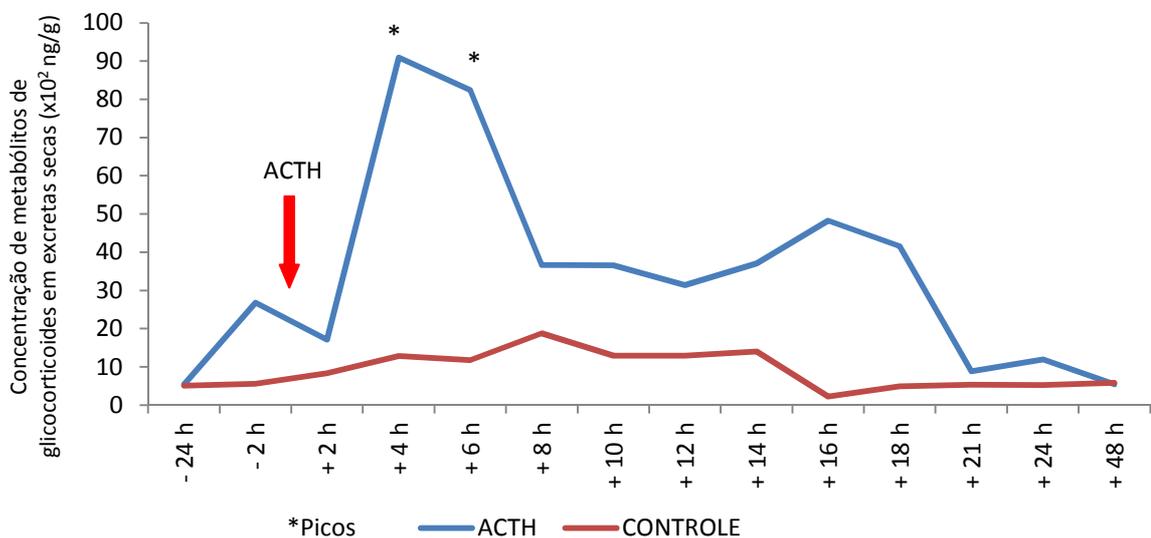


Gráfico 6 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea A3, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP – 2013

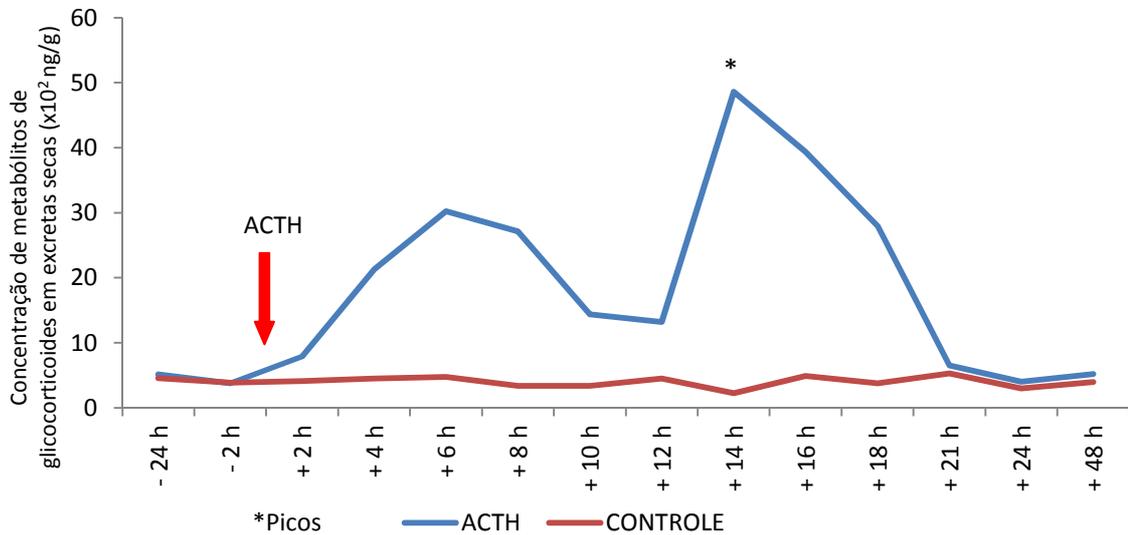


Gráfico 7 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho A4, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

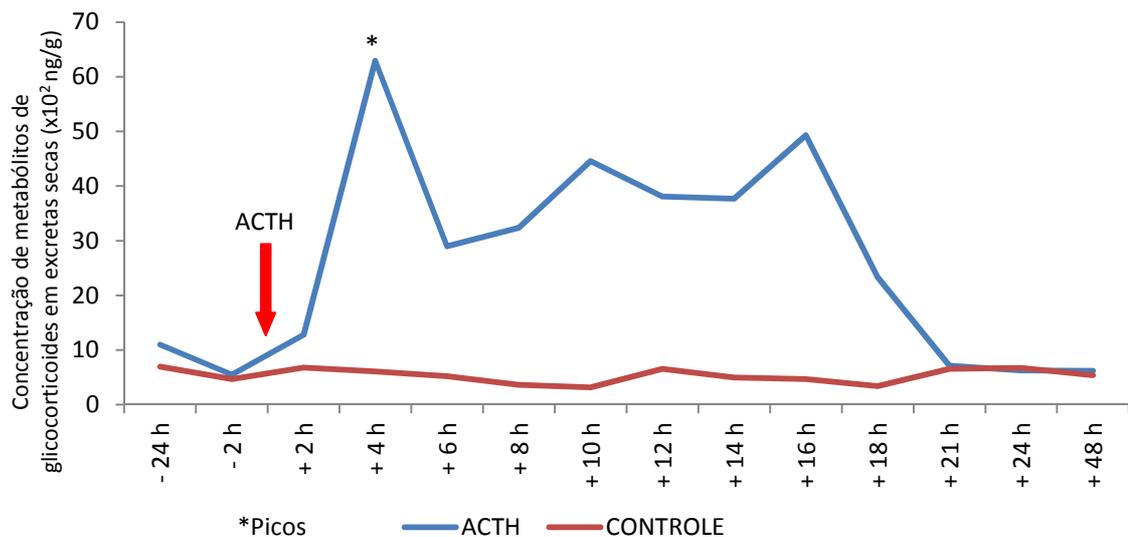


Gráfico 8 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho A5, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

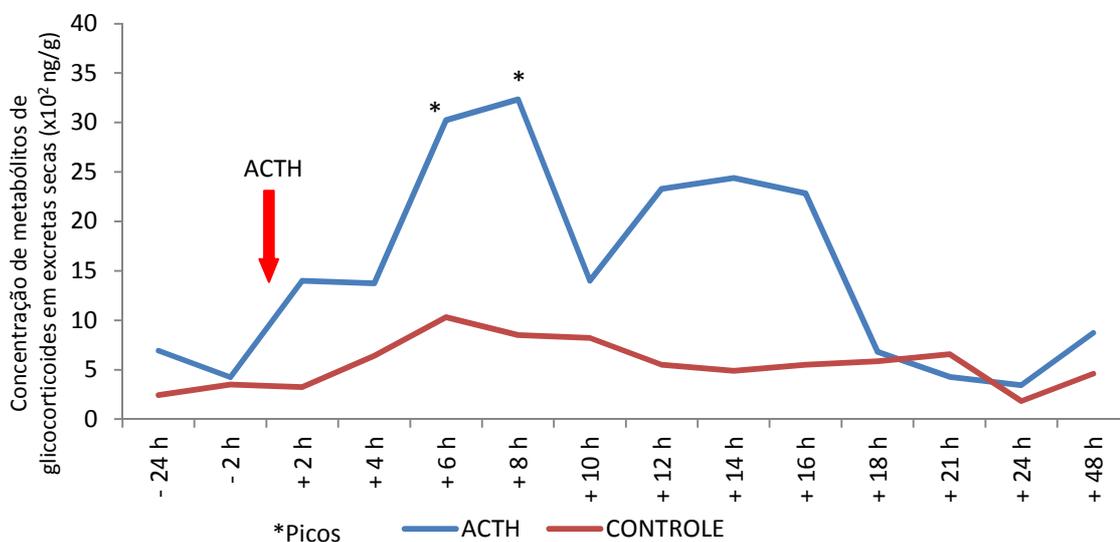


Gráfico 9 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho A6, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

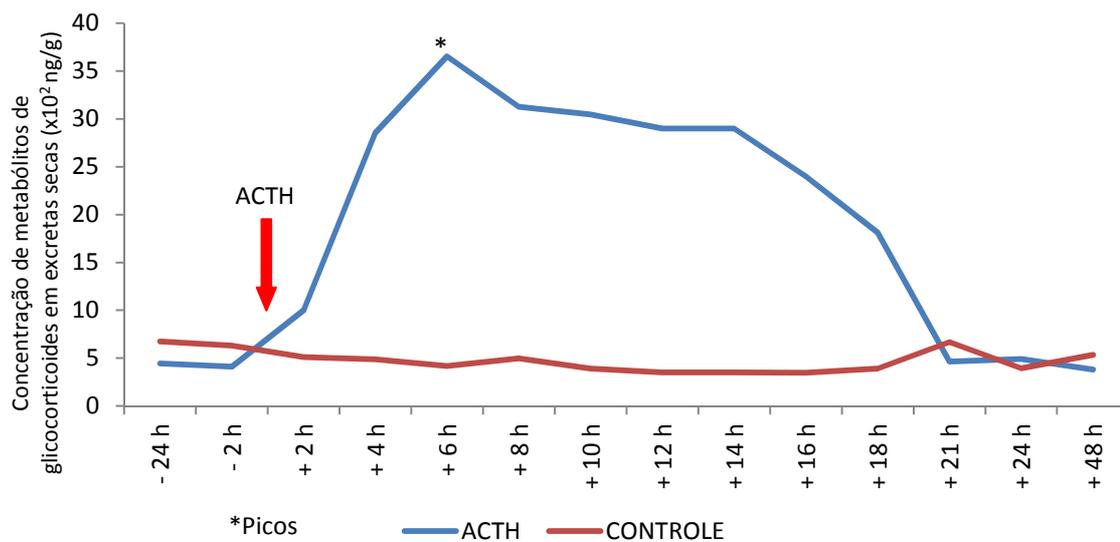


Gráfico 10 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea B1, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

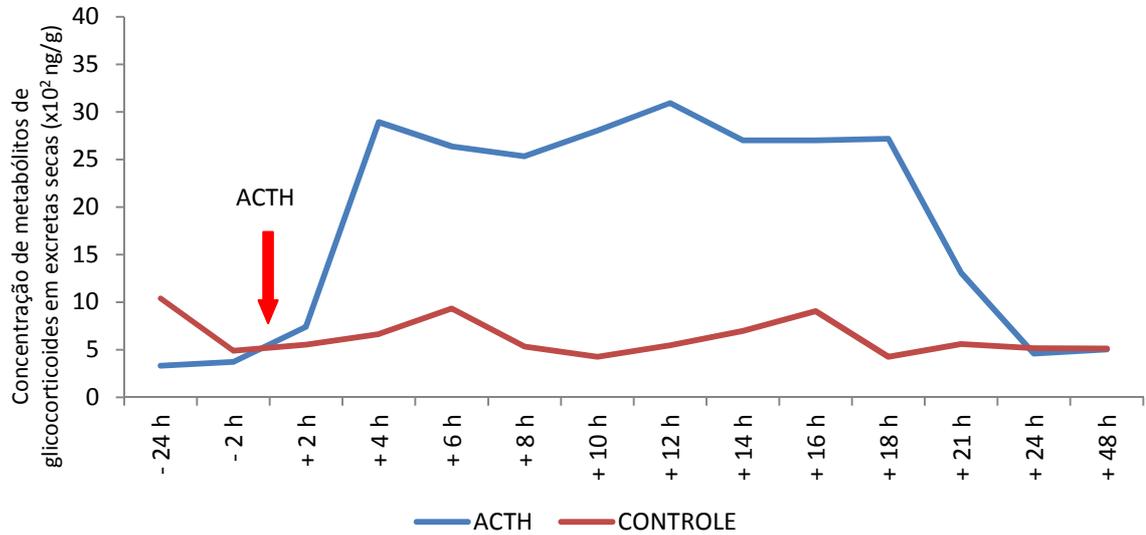


Gráfico 11 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea B3, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

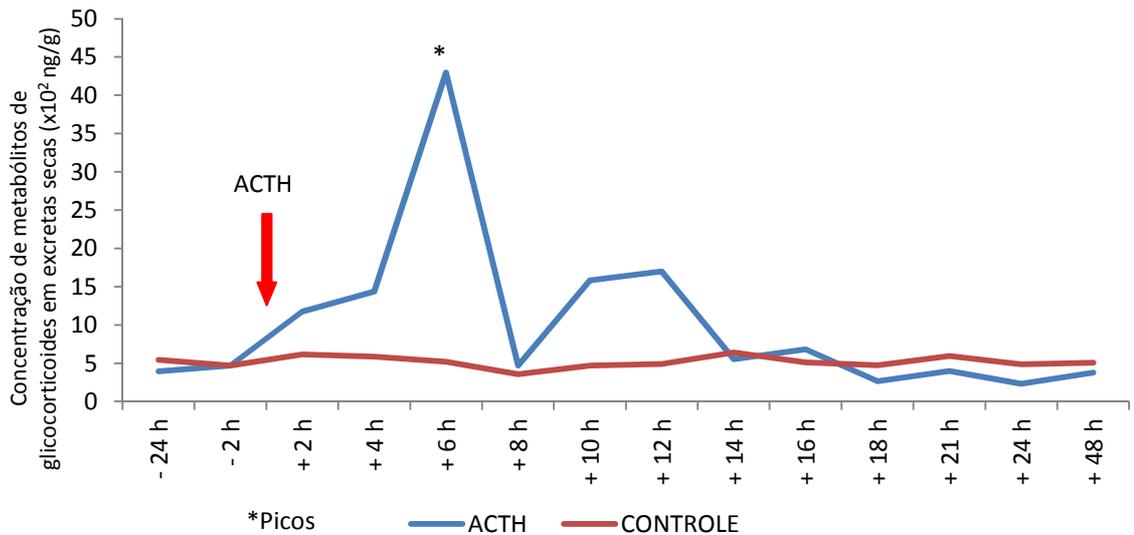


Gráfico 12 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho B4, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

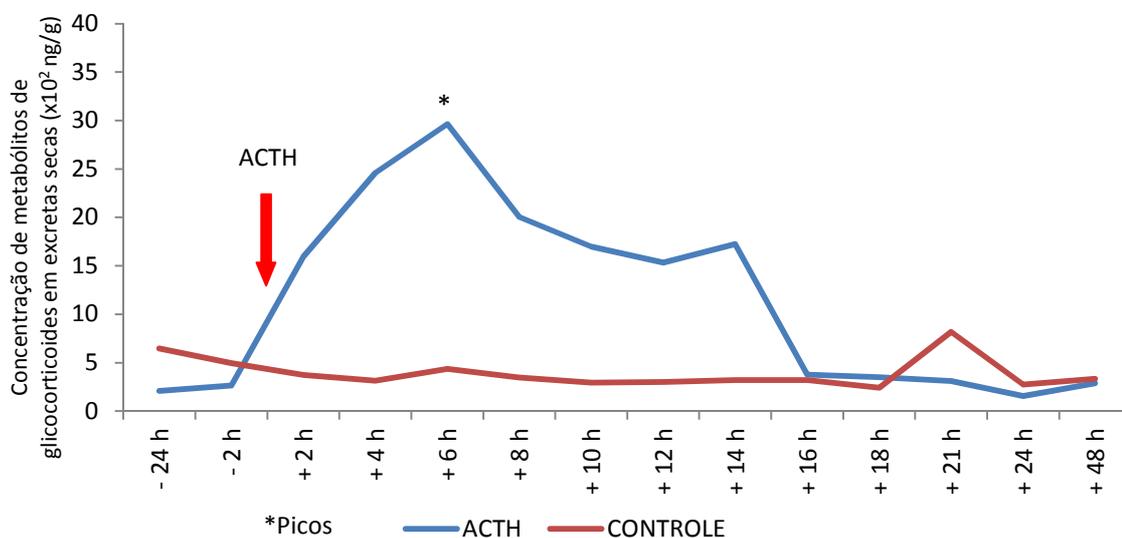


Gráfico 13 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho B6, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

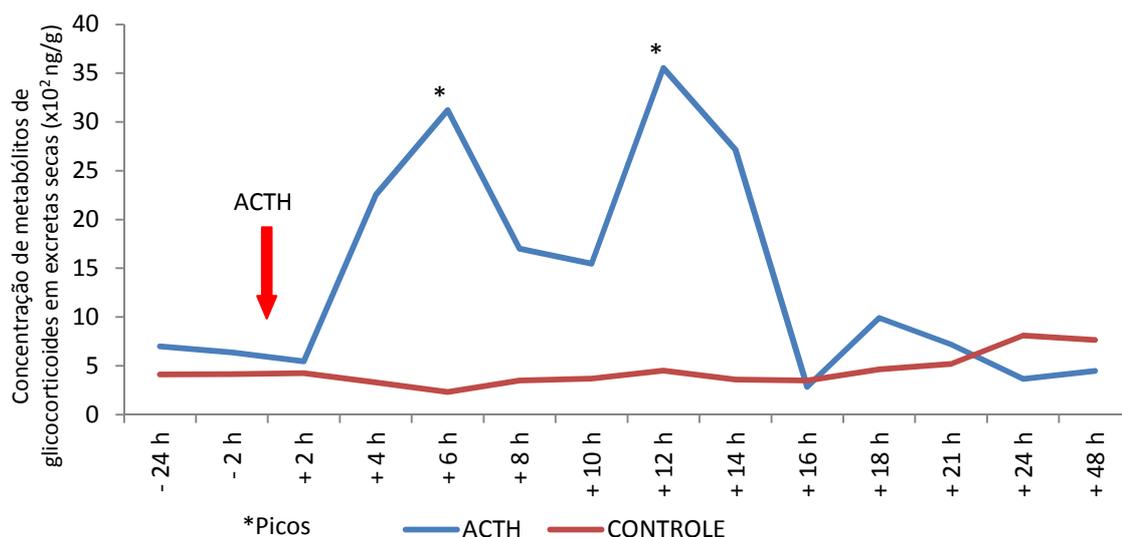


Gráfico 14 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C1, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

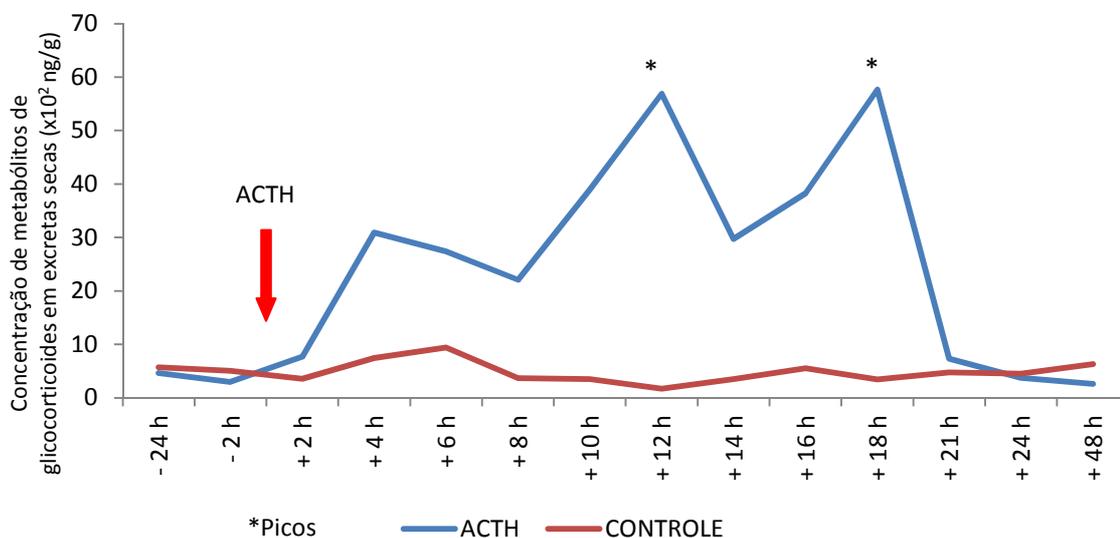


Gráfico 15 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C2, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

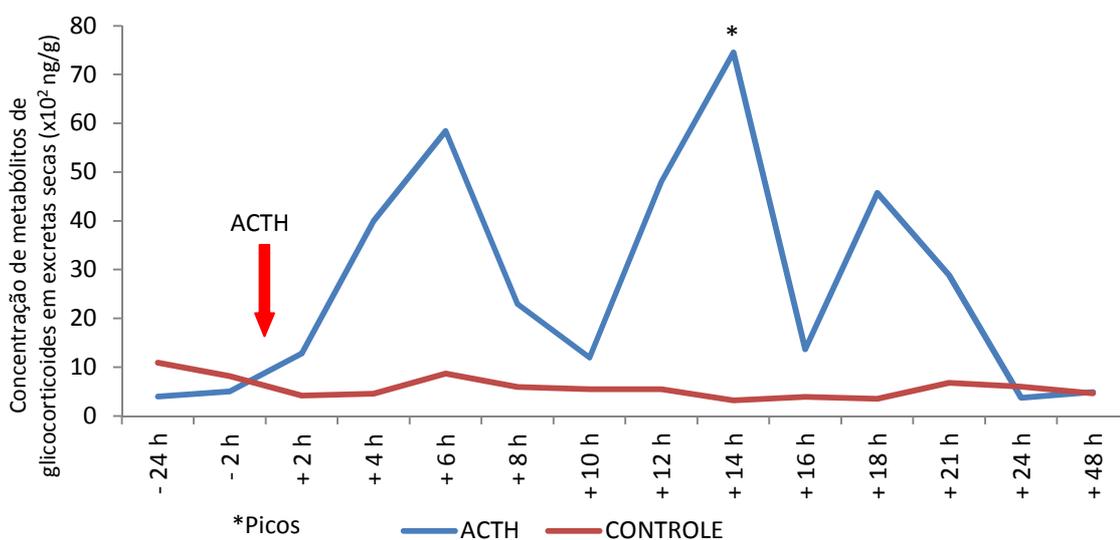


Gráfico 16 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C3, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

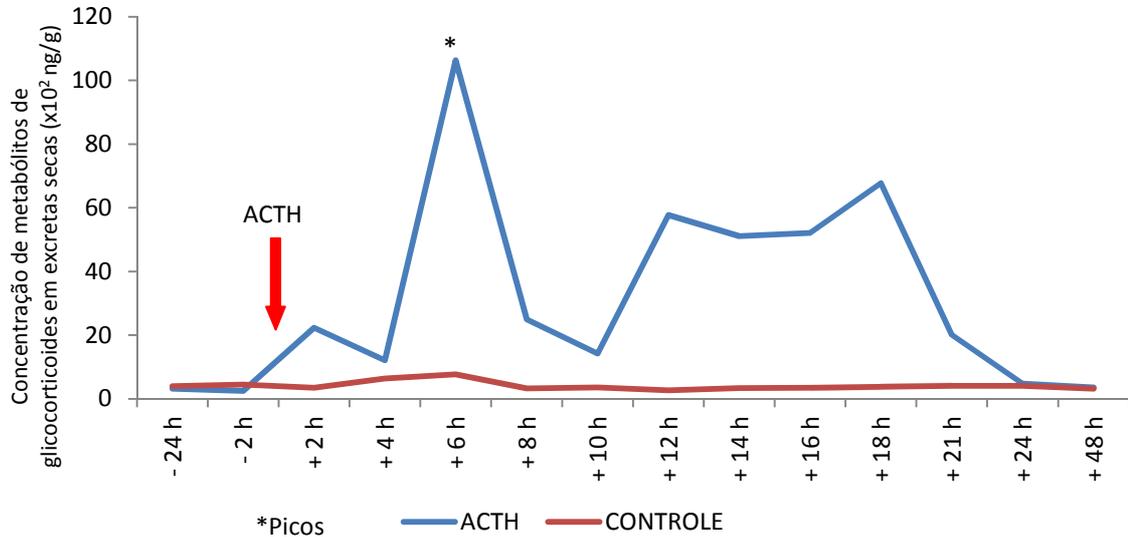


Gráfico 17 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho C4, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

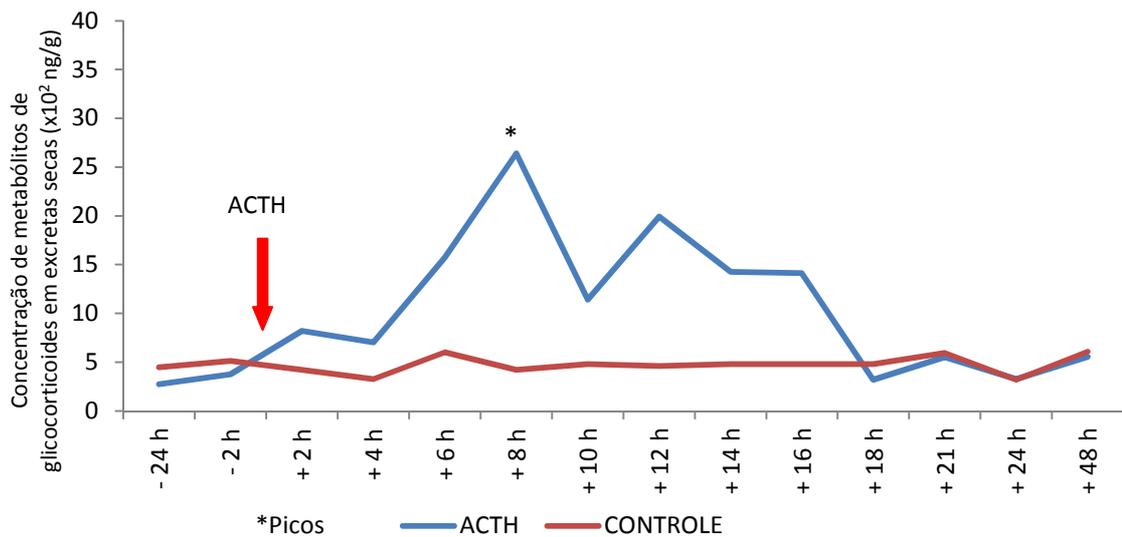


Gráfico 18 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho C5, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013

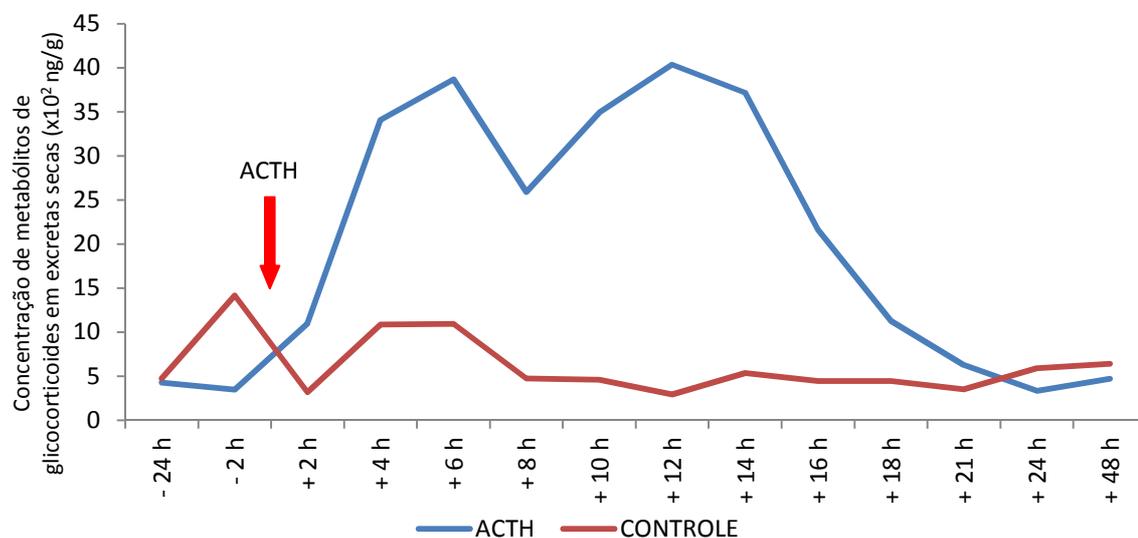
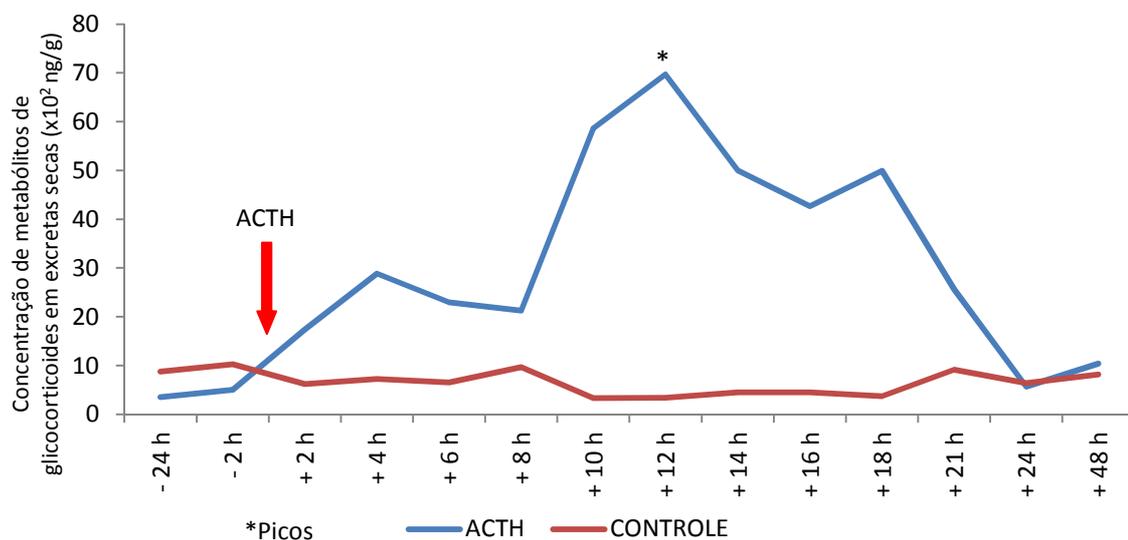
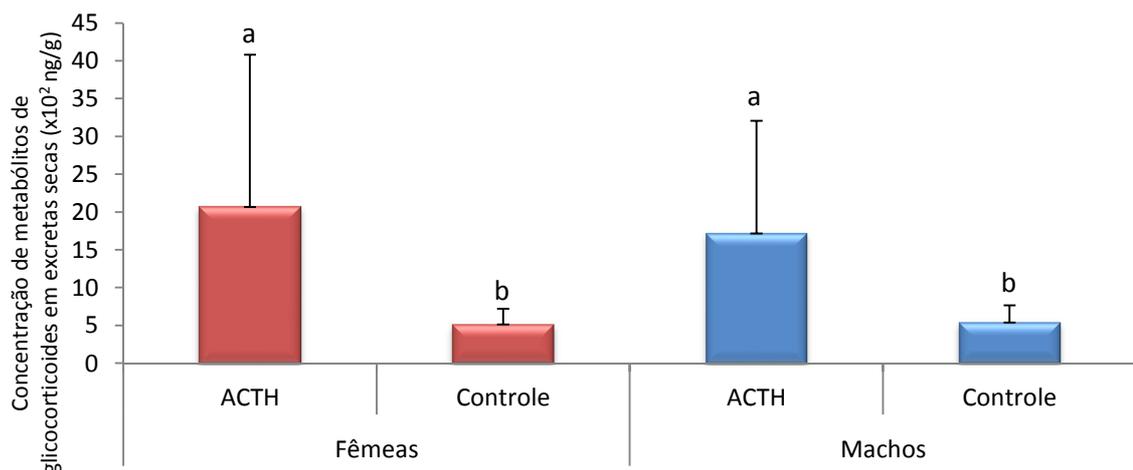


Gráfico 19 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas do macho C6, durante desafio de ACTH, quando pertenceu ao grupo ACTH e quando pertenceu ao grupo controle – São Paulo/SP - 2013



Quando analisados, os valores mostram que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) nas médias das concentrações de metabólitos de GC entre machos e fêmeas, quando comparadas, tanto no grupo ACTH como no grupo controle (Gráfico 20). Este resultado, difere do relatado por Astheimer et al. (1994) que encontraram diferenças na resposta à estimulação adrenal entre machos e fêmeas durante a época reprodutiva, não observando o mesmo resultado quando o teste foi feito fora da época reprodutiva, confirmando novamente que há desigualdade de excreção de metabólitos entre as épocas do ano.

Gráfico 20 – Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em 8 machos e 8 fêmeas de ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de ACTH – São Paulo/SP - 2013



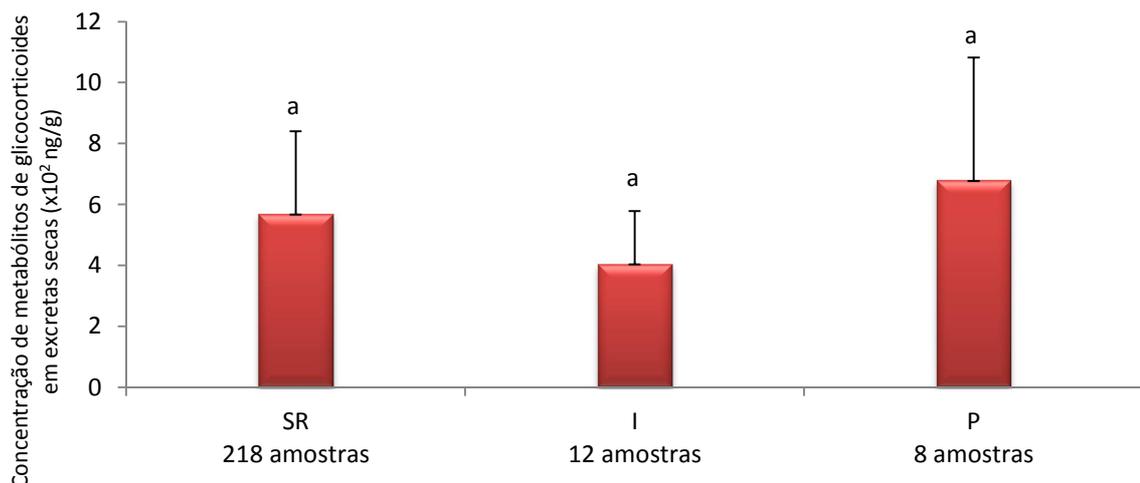
Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças estatísticas entre as médias ($p < 0,0001$). Total de machos - 8 aves; Total de fêmeas - 8 aves.

4.2 DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) EM EXCRETAS DE MACHOS E FÊMEAS DE ARARAJUBAS (*Guaruba guarouba*), ENTRE AS DIFERENTES CATEGORIAS DE ATIVIDADES REPRODUTIVAS

Foram coletadas 480 (quatrocentas e oitenta) amostras de excretas de cinco casais de ararajubas (C1, C2, C3, C4 e C5). Os casais C1, C2 e C3 tiveram amostras coletadas durante período sem atividade reprodutiva, o casal C4 teve excretas coletados durante dois períodos, sendo um sem atividade reprodutiva e outro com atividade de incubação de ovos, o casal C5 teve amostras coletadas durante período de postura.

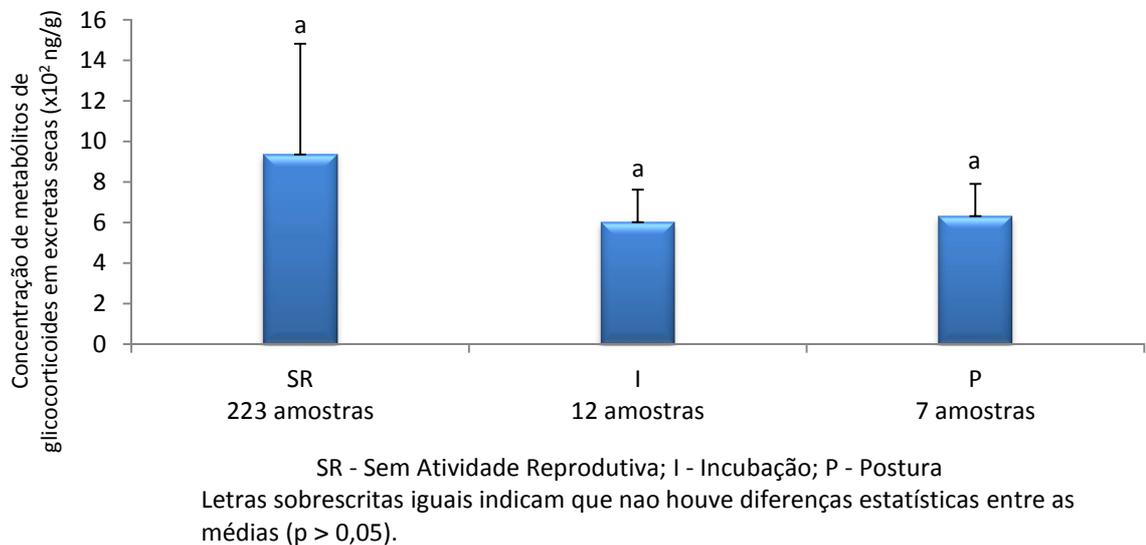
Os gráficos 21 e 22 mostram que não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) nas concentrações de metabólitos de GC entre as diferentes categorias reprodutivas (SR, I e P) nas fêmeas e nos machos.

Gráfico 21 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de fêmeas de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013



SR - Sem Atividade Reprodutiva; I - Incubação; P - Postura
Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferenças estatísticas entre as médias ($p = 0,07$).

Gráfico 22 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de machos de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013



Romero (2002) relatou concentrações maiores de metabólitos de GC dentro da época reprodutiva, associados ao comportamento de corte e defesa de território nos machos; outros autores associaram esse aumento com a demanda de criação de filhotes, havendo diferenças entre machos e fêmeas em diferentes sistemas de acasalamento (LOVE et al., 2004).

De maneira geral, as populações com concentrações de GC elevadas tendem a ter sucesso reprodutivo menor e menor sobrevivência (BREUNER, 2011).

Breuner (2011) observou, após desafio de ACTH, maiores valores de metabólitos de glicocorticoides em machos, dentro da época reprodutiva, o que poderia estar relacionado ao comportamento de defesa territorial. O mesmo autor relacionou que durante incubação e cuidados com filhotes, níveis maiores de glicocorticoides estão associados a insucesso reprodutivo. Em gansos, as concentrações de GC em excretas diferiu nas diferentes etapas reprodutivas, tendo a fase de pré-postura e postura com aumentos nos metabólitos de GC dos machos, que declinam quando a fêmea inicia a incubação (HIRSCHENHAUSER et al., 2000)

Inúmeras variáveis (temperatura, luminosidade, oferta de alimento, pareamento) podem causar estresse e, conseqüentemente alterações na secreção de GC. Em cativeiro algumas destas variáveis podem ser controladas e mantidas

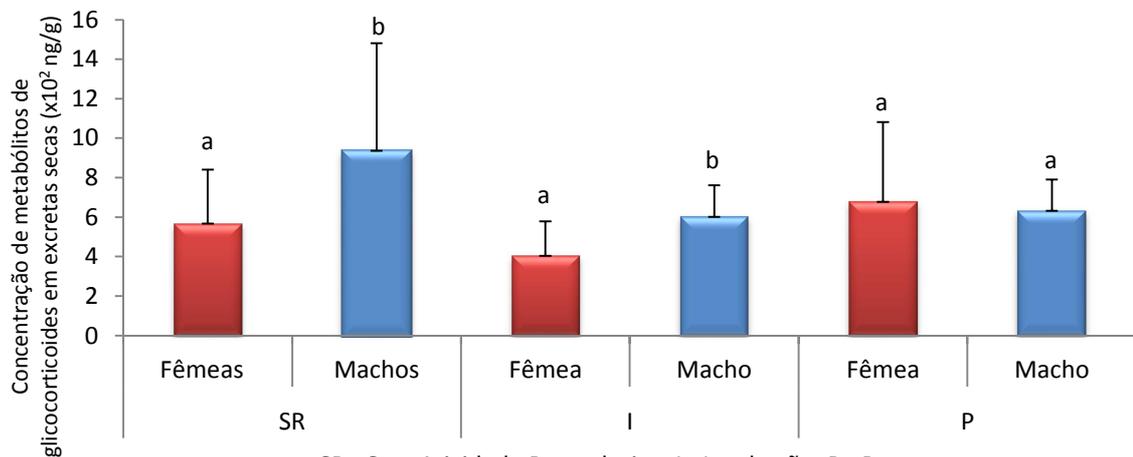
constantes ao longo do ano, o que poderia representar uma redução das condições de estresse e ganho no bem-estar animal e, como consequência, maior possibilidade de sucesso reprodutivo.

Durante o ano em que o experimento ocorreu, não observamos atividade reprodutiva, com exceção dos casais C4 e C5 (este último, inesperado) e todas as aves estão no local há pelo menos 8 anos, ou são nascidas lá, em condições homogêneas, não havendo variação da oferta de alimentos e nem competição entre machos para formação de casais, o que potencialmente pode estar relacionado aos resultados encontrados.

Destaca-se também que a grande diferença do número de amostras em cada categoria reprodutiva dificulta uma comparação direta entre elas.

Quando comparadas as médias entre os sexos, há diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), com machos apresentando sempre valores maiores em relação às fêmeas (Gráfico 23), com exceção da época de postura.

Gráfico 23 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de fêmeas e machos de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo - 2013



SR - Sem Atividade Reprodutiva; I - Incubação; P - Postura
Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias ($p < 0,05$), dentro da mesma categoria reprodutiva.

Alguma diferença entre sexos era esperada, uma vez que Touma et al. (2003) encontraram diferenças entre os sexos na excreção de metabólitos de corticosteroides em ratos; Rettenbacher et al. (2004) e Báltic et al. (2005) relataram diferenças sexuais no metabolismo dos corticosteroides em galinhas e galos domésticos, respectivamente, sempre apontando valores maiores nos machos.

De acordo com Wasser et al. (2000), as diferenças entre sexos são previstas e documentadas, porém há interferência da época em que os estudos foram realizados.

4.2.1 DESCRIÇÃO DAS VARIAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) EM EXCRETAS DE MACHO E FÊMEA DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*), COM E SEM OVOS NO NINHO

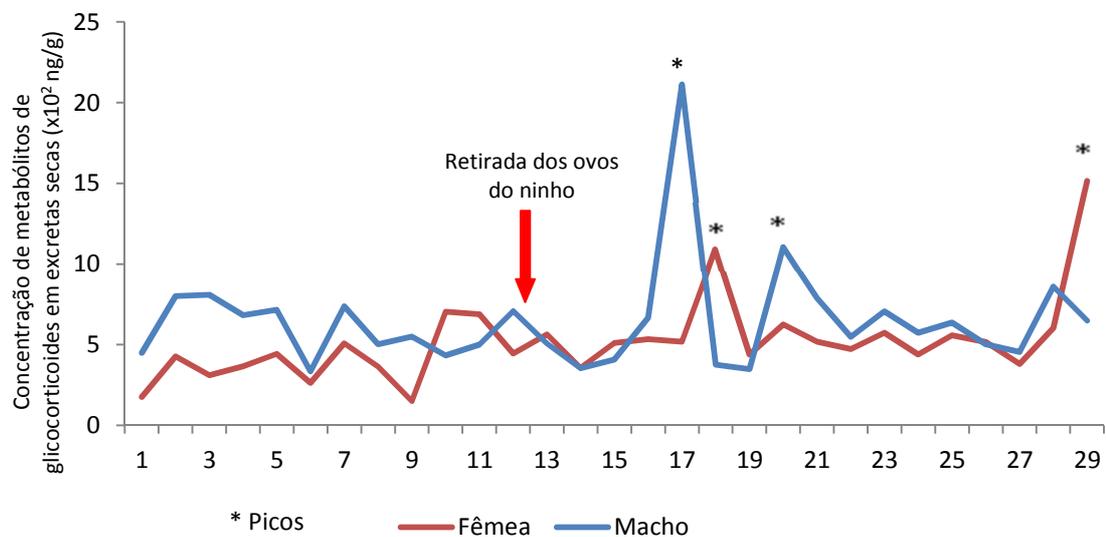
Como dito anteriormente, o casal C4 realizou postura e incubação de 3 ovos. Durante o período experimental, houve a incubação dos ovos até o 12º dia, quando estes foram retirados do ninho (final do período de incubação).

Quando houve a retirada dos ovos do ninho, houve picos de concentração de metabólitos de GC na fêmea (dias 18 e 30) e no macho (dias 17 e 20), evidenciados no gráfico 24.

Os picos surgiram após cinco dias da retirada dos ovos o que sugere não haver correlação entre os dois eventos.

Como observado no desafio do ACTH, o estímulo estressor demorou 6 horas para provocar o pico de concentração de metabólitos de GC, no entanto a retirada dos ovos deve ter causado estímulo suficiente para provocar alguma reação na adrenal, de forma mais tardia.

Gráfico 24 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas de macho e fêmea de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), com e sem ovos no ninho – São Paulo - 2013



4.3 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE TESTOSTERONA EM EXCRETAS DE MACHOS DE ARARAJUBAS (*Guaruba guarouba*) – DESAFIO DE GNRH, E DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES (GC) DURANTE ESTE EXPERIMENTO

Foram coletadas 35 (trinta e cinco) amostras de excretas de 4 machos durante desafio com GnRH (C1, C2, C3 e C4).

Os gráficos individuais mostram que houve picos nos animais tratados 4 horas após aplicação de GnRH (Gráficos 25 a 28).

O método não invasivo de mensuração de metabólitos de testosterona pôde ser considerado validado fisiologicamente na espécie ararajuba (*Guaruba guarouba*), pois a aplicação de GnRH foi capaz de induzir a ocorrência de picos de concentração de metabólitos de testosterona, com valores até cinco vezes maiores do que as concentrações basais.

Como forma de avaliar em que medida a aplicação do medicamento induziu resposta de aumento de metabólitos de GC, foi realizada a mensuração destes e os resultados também estão apresentados nos gráficos individuais (Gráficos 25 a 28).

Nos animais tratados, houve pico de excreção de metabólitos de GC possivelmente relacionado com a aplicação do GnRH, após 4 a 6 horas. Esses resultados sugerem que exista alguma ação do GnRH sobre a adrenal estimulando produção de metabólitos de GC, uma vez que no grupo controle apenas a injeção salina não produziu qualquer pico.

Gráfico 25 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C2 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo - 2013

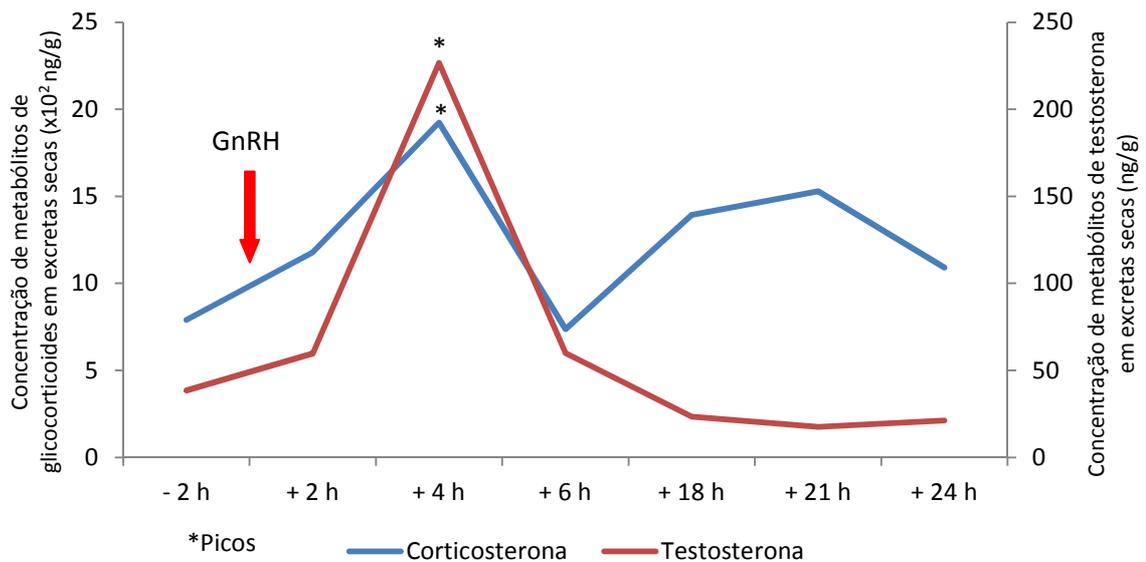


Gráfico 26 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C4 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo - 2013.

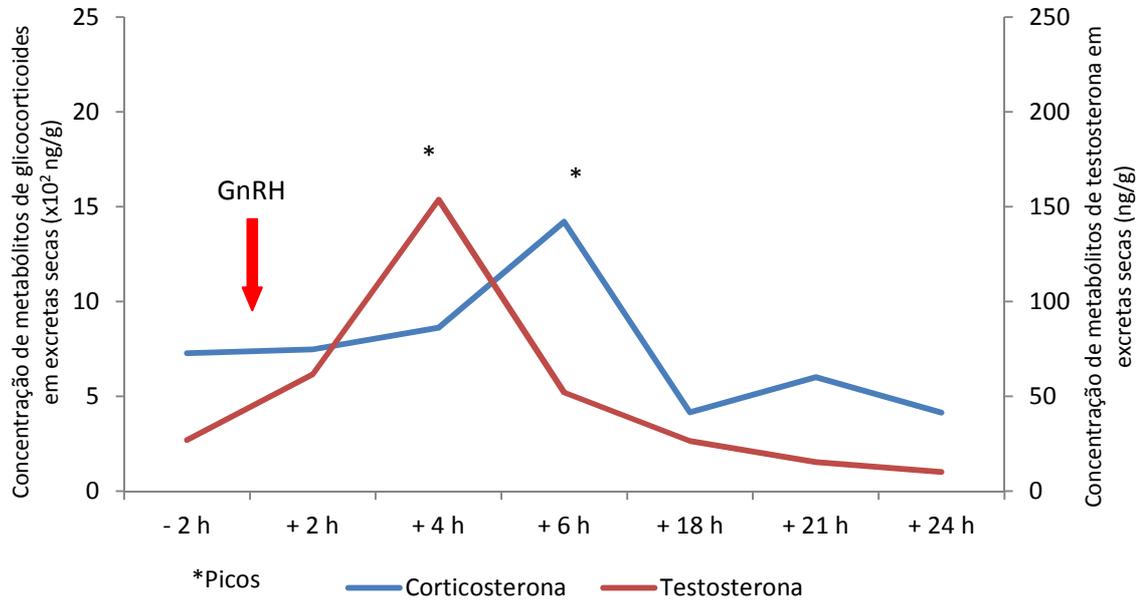


Gráfico 27 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C1 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo - 2013

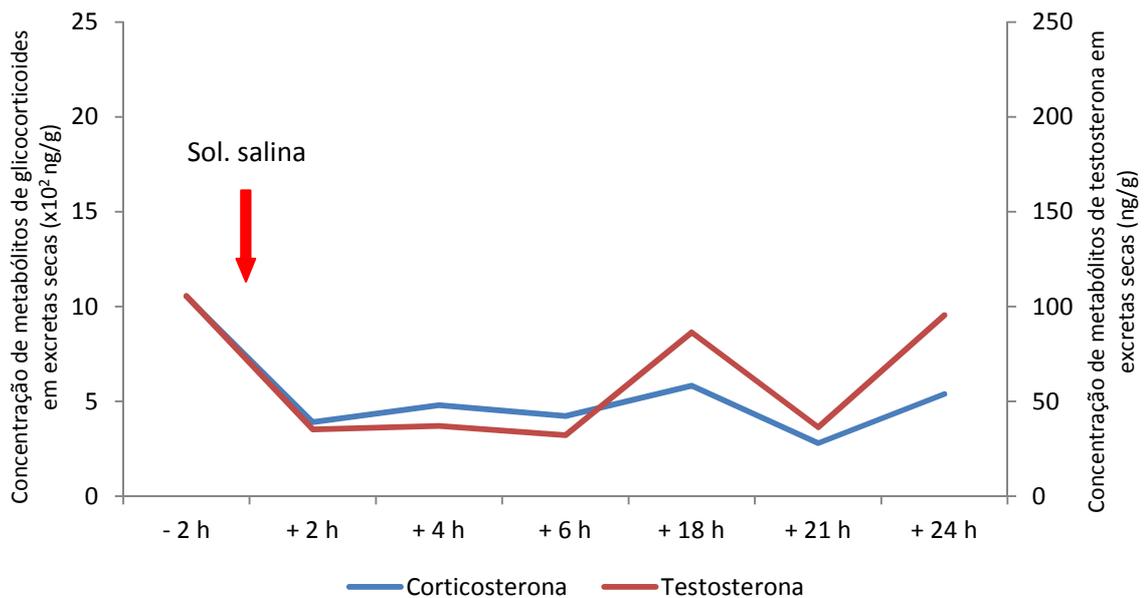
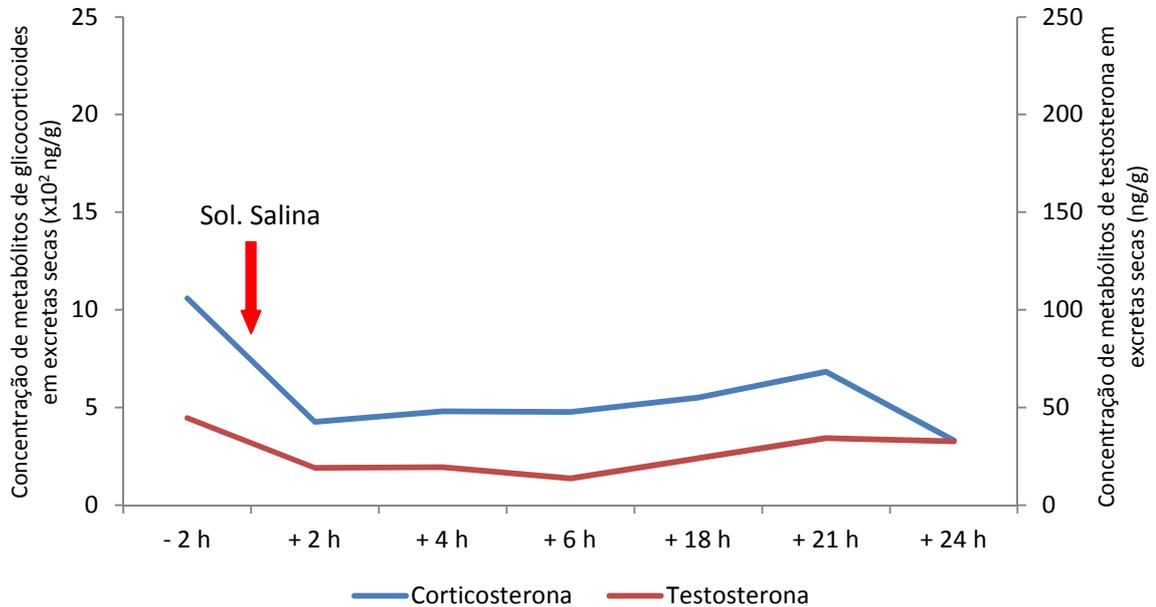


Gráfico 28 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas do macho C3 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo - 2013



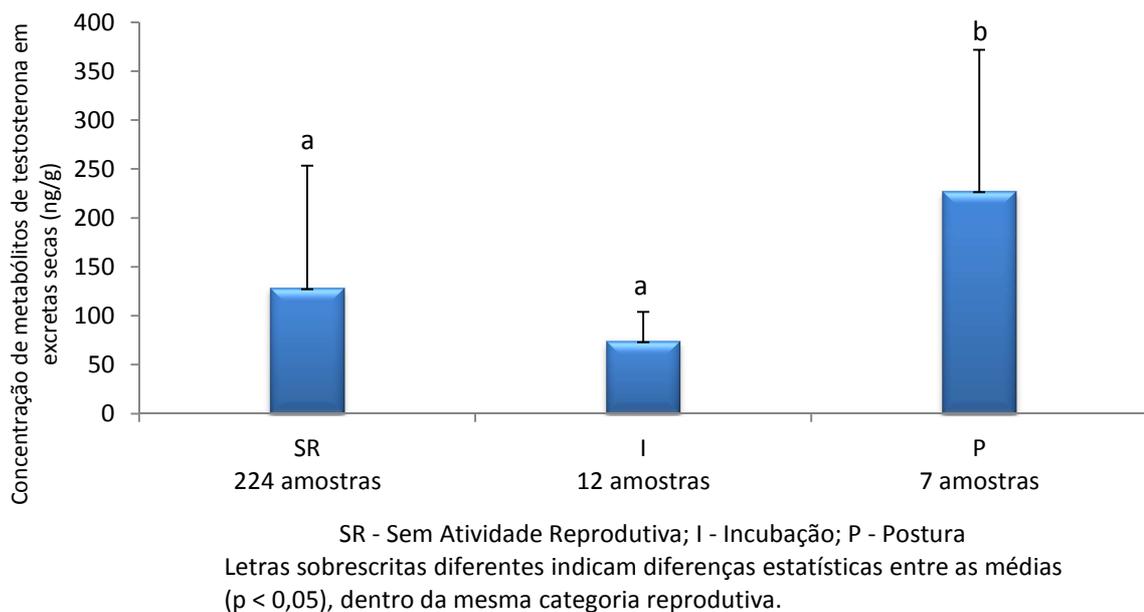
4.4 DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE TESTOSTERONA EM EXCRETAS DE MACHOS DE ARARAJUBAS (*Guaruba guarouba*), ENTRE AS DIFERENTES CATEGORIAS DE ATIVIDADES REPRODUTIVAS

Foram coletadas 243 (duzentas e quarenta e três) amostras de excretas de cinco machos de ararajubas (C1, C2, C3, C4 e C5), sendo que os machos C1, C2 e C3 encontravam-se em período sem atividade reprodutiva; o macho C4 teve amostras coletadas durante dois períodos, sem atividade reprodutiva e em incubação; e o macho C5 teve amostras coletadas durante período de postura.

Com relação aos metabólitos de testosterona, não houve diferenças significativas quando comparadas as médias das concentrações nas categorias sem atividade reprodutiva e com atividade de incubação de ovos; as concentrações

foram estatisticamente maiores somente na categoria postura, conforme demonstrado no gráfico 29.

Gráfico 29 - Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de testosterona em excretas de machos de Ararajubas (*Guaruba guarouba*), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013



A hipótese que poderia explicar esses resultados é que no período de incubação e/ou com filhotes ocorre aumento das concentrações de prolactina para facilitar a expressão do comportamento parental e as concentrações de testosterona, conseqüentemente são reduzidas (DEVICHE et al., 2011). Bentley et al. (2007) afirmaram que níveis elevados de testosterona afetam negativamente o comportamento parental.

No final do período reprodutivo, os testículos começam a diminuir, mantendo-se assim até o início da próxima estação (MORAIS, 2012). Durante o período de postura, a testosterona estimula a manifestação de comportamentos sexuais (DEVICHE et al., 2011; UBUKA; BENTLEY, 2011), ocorrem as cópulas, o que explicaria a alta concentração de metabólitos de testosterona encontrada no macho na época de postura.

4.4.1 DESCRIÇÃO DAS VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE TESTOSTERONA EM EXCRETAS DE MACHO DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*), COM E SEM OVOS NO NINHO

A variação nas concentrações de metabólitos de testosterona no macho C4, enquanto ele estava em período de incubação e após a retirada dos ovos do ninho, está demonstrada no gráfico 30.

Nele, pode-se observar que a retirada dos ovos do ninho não provocou alterações significativas ($p = 0,19$) nas concentrações dos metabólitos de testosterona. Esses dados confirmam as observações anteriores, de que no final do período de incubação, e não havendo estímulo para nova postura, as gônadas começam a diminuir, assim como a excreção de hormônios sexuais (UBUKA; BENTLEY, 2011).

Gráfico 30 – Variação das concentrações de metabólitos de testosterona em excretas de macho de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), com e sem ovos no ninho – São Paulo - 2013



4.5 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ENSAIOS PARA MENSURAR METABÓLITOS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE FÊMEAS DE ARARAJUBAS (*Guaruba guarouba*) – DESAFIO DE GNRH, E DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES DURANTE ESTE EXPERIMENTO

Foram coletadas 35 (trinta e cinco) amostras de excretas de 4 fêmeas durante desafio com GnRH (C1, C2, C3 e C4).

Quanto aos metabólitos de estrógeno, os gráficos individuais mostram que em uma fêmea (C2) do grupo tratado houve pico 19 horas após aplicação de GnRH (Gráfico 31), enquanto na outra (C4) ocorreu um pico 4 horas após aplicação (Gráfico 33). O grupo controle manteve padrão de excreção permanecendo nos níveis basais (Gráficos 35 e 37).

Os casais entravam no ninho para dormir todos os dias às 17 horas. Devido a esse comportamento, os ninhos eram fechados nesse horário e reabertos somente às 6 horas da manhã do dia seguinte. Assim, coletavam-se os primeiros excretas do dia. O pico apresentado pelo animal C2, reflete o intervalo de horas das 17:00 às 6:00, portanto se deu durante a noite.

Quanto aos metabólitos de progesterona, apenas uma fêmea do grupo tratado (C2) apresentou pico de concentração de metabólitos de progesterona após 19 horas da aplicação do GnRH, seguindo o mesmo padrão apresentado para os metabólitos de estrógeno, conforme demonstrado no gráfico 31.

Em função do número reduzido de aves e da heterogeneidade de resultados, consideramos inconsistente a validação fisiológica para os ensaios de dosagem de metabólitos de estrógeno e progesterona.

Após o período reprodutivo, a produção de esteroides ovarianos permanece relativamente baixa e não responsiva a tratamento com gonadotrofinas até o início da maturação sexual (JOHNSON, 2000). As concentrações de estrógeno circulantes aumentam duas a três semanas antes do início da postura, enquanto que os níveis de progesterona começam a aumentar cerca de uma semana antes da postura

(JOHNSON, 2011). Esse talvez seja o motivo para termos obtido respostas tão heterogêneas, possivelmente nesse período as gônadas estejam pouco sensíveis ou insensíveis aos estímulos gonadotróficos, uma vez que o desafio foi realizado em agosto/2012, época sem atividade reprodutiva no criadouro.

Como forma de avaliar em que medida a aplicação do medicamento induziu resposta de aumento de metabólitos de glicocorticoides, foi realizada a mensuração destes e os resultados estão apresentados nos gráficos 32, 34, 36 e 38.

O gráfico 32 demonstra que no animal C2 houve pico de concentração de metabólitos de glicocorticoides após aplicação do GnRH, coincidindo com o pico de metabólitos de estrógeno e progesterona 19 horas após a aplicação (excreta que refletia o período de 17:00 às 6:00hs).

O gráfico 34 evidencia que na fêmea C4, houve pico de excreção de metabólitos de glicocorticoides 4 horas após aplicação do GnRH, novamente coincidindo com o pico de concentração de metabólitos de estrógeno e progesterona.

Os animais controles, onde foi feita a aplicação de solução salina, apresentaram resultados diversos do grupo tratado com GnRH. No gráfico 36, pode-se observar que o animal C1 não teve pico de metabólitos de GC, já o animal C3 teve pico de excreção de metabólitos de GC 6 horas após aplicação da solução salina.

Frente aos resultados apresentados, existe a possibilidade de ter havido estimulação direta da adrenal pela aplicação do GnRH, porém como um dos controles também apresentou pico de concentração de metabólitos de GC, não se pode descartar a injeção como fator indutor de uma resposta do tipo estresse.

Gráfico 31 – Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C2 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo - 2013

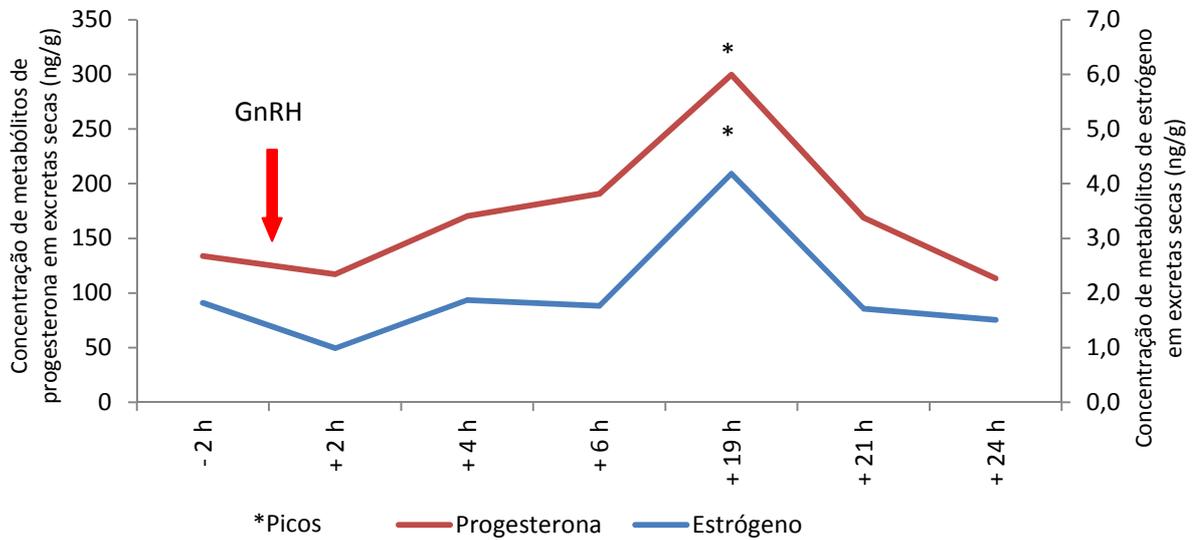


Gráfico 32 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C2 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo - 2013.

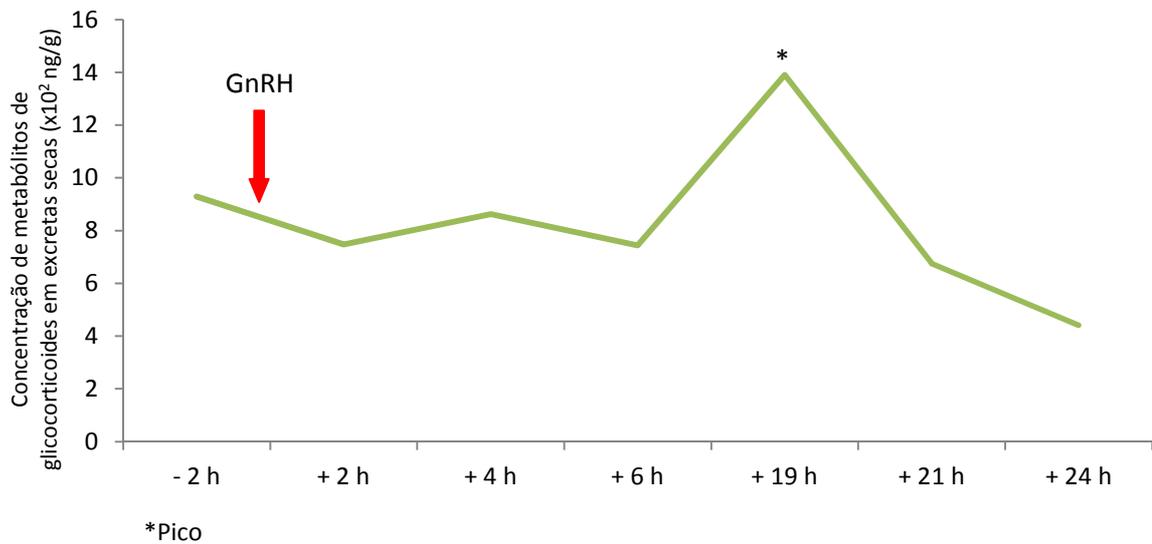


Gráfico 33 – Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C4 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo - 2013.

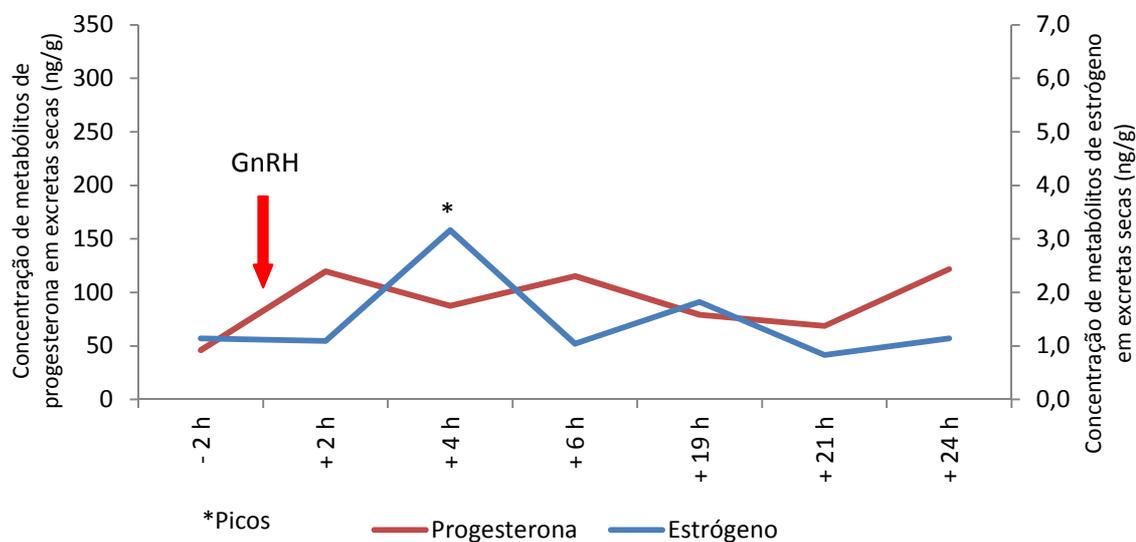


Gráfico 34 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C4 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal tratado) – São Paulo - 2013

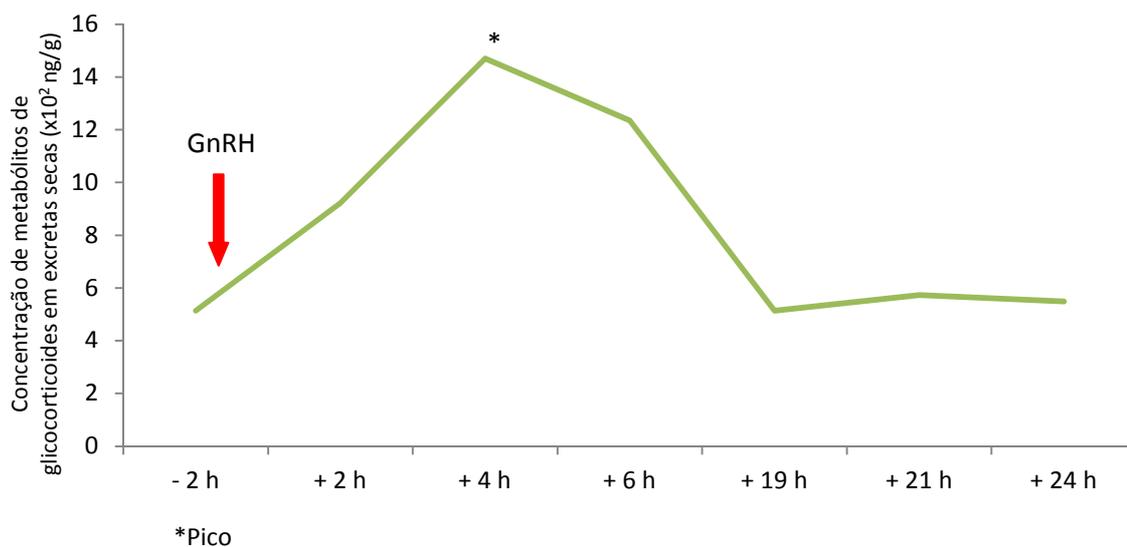


Gráfico 35 – Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C1 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo - 2013

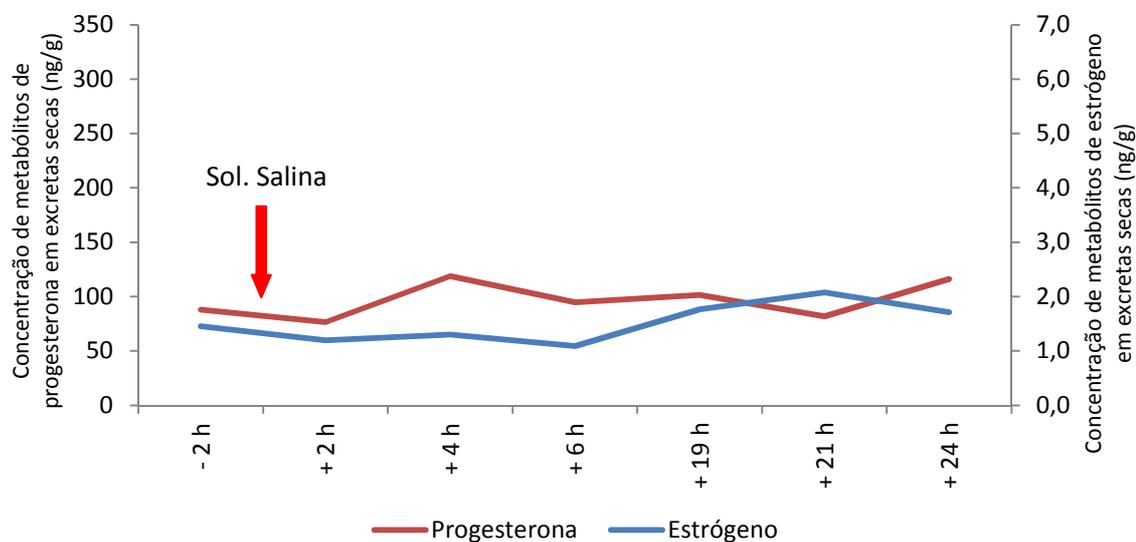


Gráfico 36 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C1 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo - 2013

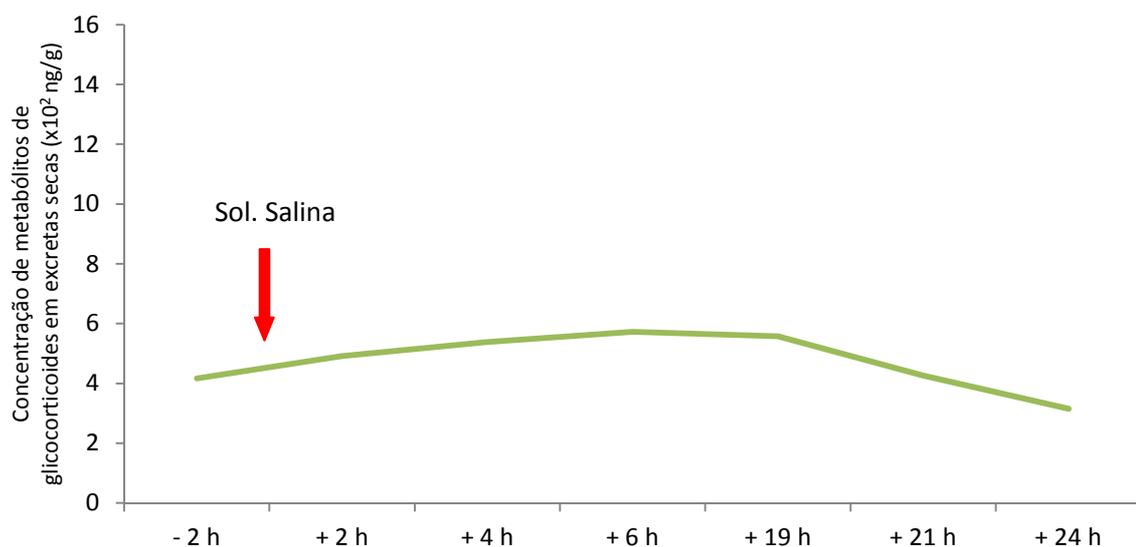


Gráfico 37 – Variação das concentrações de metabólitos de progesterona e estrógeno em excretas da fêmea C3 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo - 2013

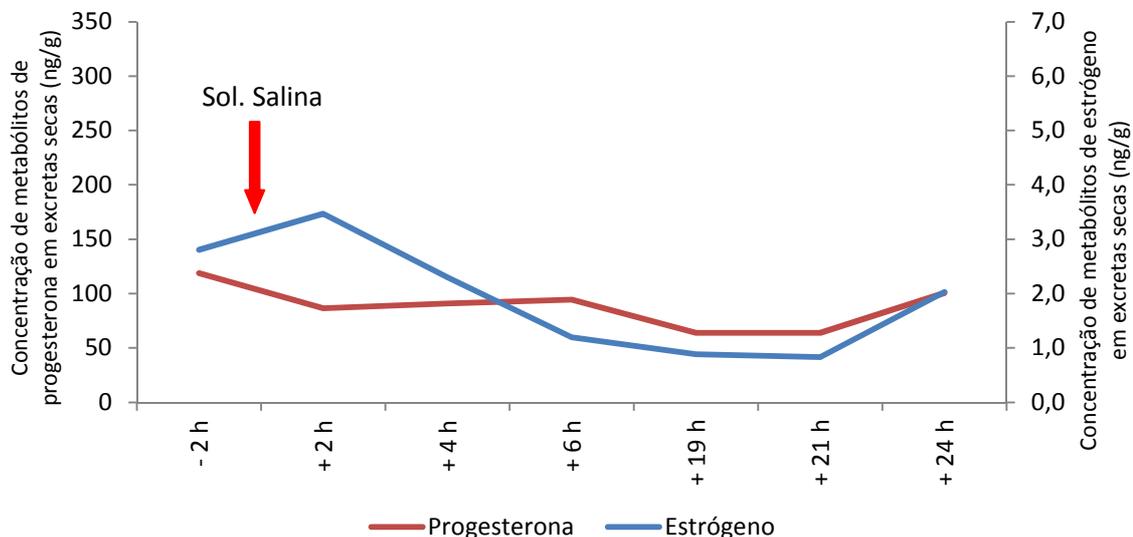
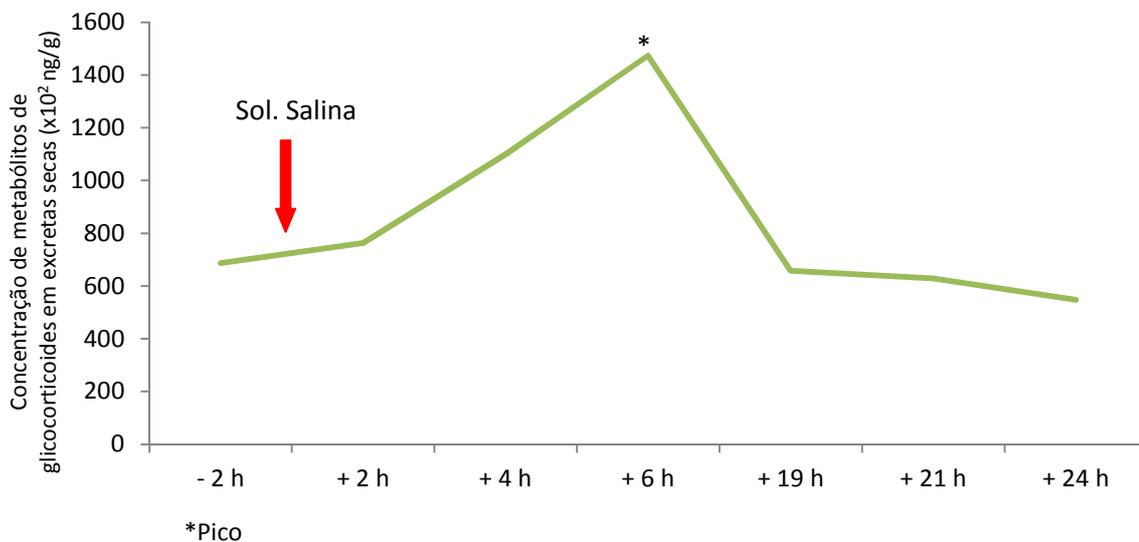


Gráfico 38 – Variação das concentrações de metabólitos de glicocorticoides em excretas da fêmea C3 de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), durante desafio de GnRH (animal controle) – São Paulo - 2013



*Pico

4.6 DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE FÊMEAS DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*) ENTRE AS DIFERENTES CATEGORIAS DE ATIVIDADES REPRODUTIVAS

Foram coletadas 56 (cinquenta e seis) amostras de excretas de duas fêmeas de ararajubas (C4 e C5). As amostras da fêmea C4 foram coletadas em dois períodos diferentes, sendo um sem atividade reprodutiva e outro durante incubação. As amostras da fêmea C5 foram coletadas enquanto ela estava realizando postura.

Por motivos operacionais, as amostras das fêmeas C1, C2 e C3 não foram ainda processadas e por isso não serão aqui apresentadas.

Com relação aos metabólitos de estrógeno, não houve diferenças significativas quando comparadas as médias das categorias Sem atividade reprodutiva e Incubação, porém houve diferença significativa dessas duas categorias, quando comparadas com a Postura ($p < 0,05$), conforme demonstrado no gráfico 39.

Com relação aos metabólitos de progesterona, houve diferenças estatísticas apenas entre as categorias Sem atividade reprodutiva e Postura ($p < 0,05$). Entre as outras categorias não houve diferenças estatísticas, conforme demonstrado no gráfico 40.

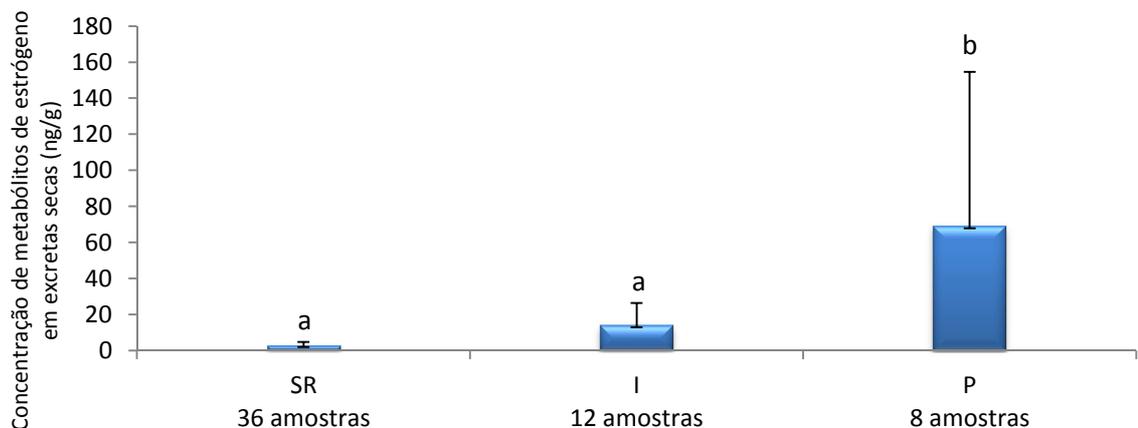
A queda nos níveis de esteroides sexuais após postura em várias espécies é indicativo de que esses hormônios não estão relacionados com manutenção da incubação. Em galinhas, quando se inicia o período de incubação, há uma rápida inibição dos órgãos reprodutores (FRENCH, 2009).

Sockman e Schwabl (1999) relataram que o nível de progesterona em canários (*Serinus canarius*) foi elevado até dois dias após a postura do primeiro ovo, retornando a níveis basais após este período. Nos últimos 20% da fase de postura, os níveis de prolactina ficam 5 vezes maiores e os de progesterona caem (os níveis de estrógeno continuam iguais) (VLECK; VLECK, 2011).

Os níveis de estrógeno mantêm-se altos durante postura, pois este hormônio é essencial para promover aumento da ligação de receptores para progesterona antes da oviposição, além de ser o estrógeno, importante na regulação do metabolismo de cálcio, mineral muito requisitado na época de formação e postura de ovos pela fêmea e responsável pelo comportamento de entrada no ninho e início de incubação (EL HALAWANI et al., 1986; JOHNSON, 2000).

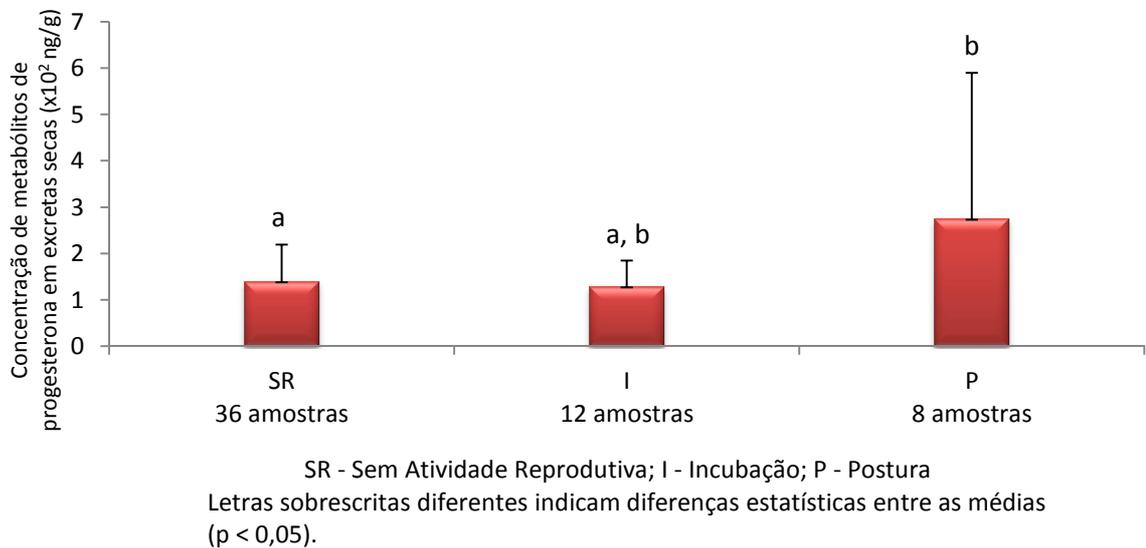
Por essa coerência biológica entre os resultados encontrados e os esperados das concentrações de metabólitos de estrógeno e progesterona, consideramos ambos os ensaios biologicamente validados.

Gráfico 39 – Variação das concentrações de metabólitos de estrógeno em excretas de fêmeas de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo - 2013



SR - Sem Atividade Reprodutiva; I - Incubação; P - Postura
Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias ($p < 0,05$).

Gráfico 40 – Variação das concentrações de metabólitos de progesterona em excretas de fêmeas de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), em diferentes categorias reprodutivas – São Paulo – 2013



4.6.1 DESCRIÇÃO DAS VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM EXCRETAS DE FÊMEA DE ARARAJUBA (*Guaruba guarouba*), COM E SEM OVOS NO NINHO

A variação nas concentrações de metabólitos de estrógeno e progesterona na fêmea C4, enquanto ela estava em período de incubação e após a retirada dos ovos do ninho, está demonstrada no gráfico 41.

Nele, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de metabólitos de estrógeno e progesterona antes e após a retirada dos ovos do ninho (Gráficos 42 e 43).

Gráfico 41 – Variação das concentrações de metabólitos de estrógeno e progesterona em excretas de fêmea de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), com e sem ovos – São Paulo - 2013

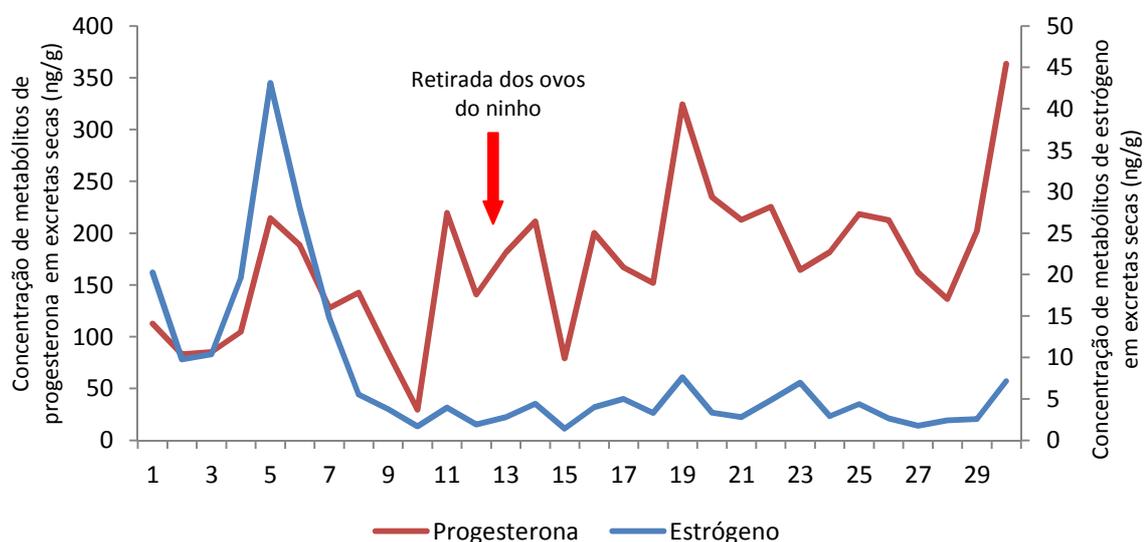
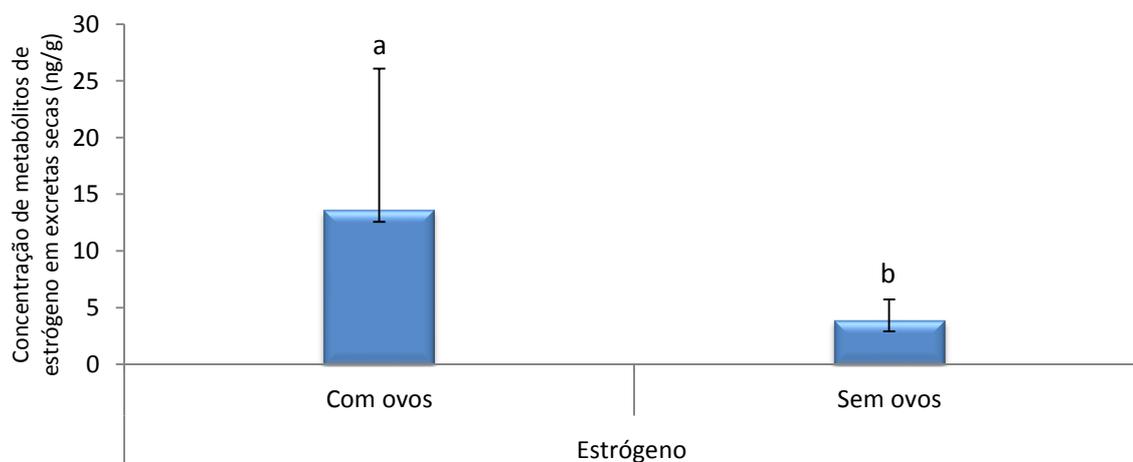
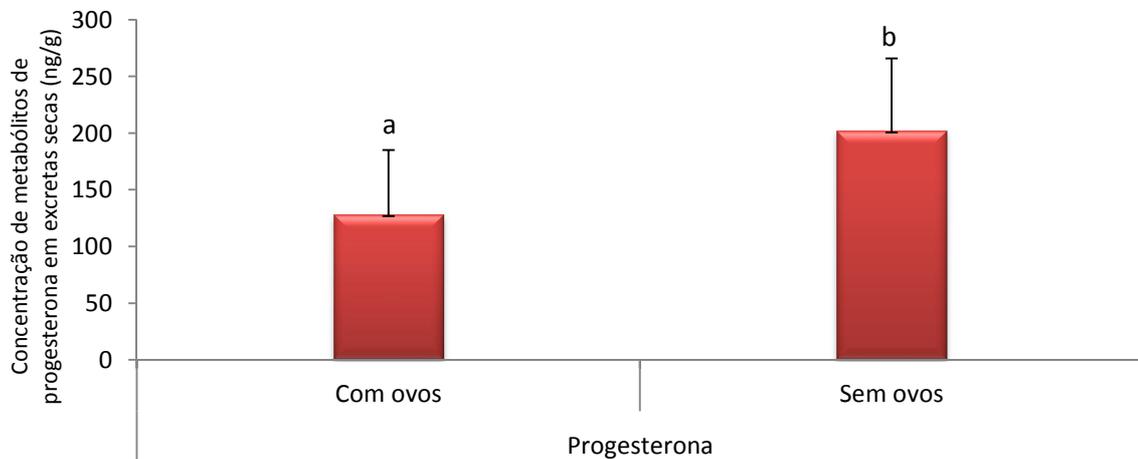


Gráfico 42 – Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de estrógeno em excretas de fêmea de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), antes e após a retirada de ovos do ninho – São Paulo - 2013



Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre as médias (p = 0,01).

Gráfico 43 – Médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos de progesterona em excretas de fêmea de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), antes e após a retirada de ovos do ninho – São Paulo - 2013



Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística entre as médias ($p=0,006$).

Analisando as concentrações, antes e depois da retirada dos ovos, dos metabólitos de estrógeno e progesterona encontramos duas respostas diferentes.

As concentrações de metabólitos de estrógeno caíram para valores significativamente menores. Segundo El Halawani et al. (1986) o estrógeno é responsável pelo início do comportamento de choco (incubação), que posteriormente é mantido pela prolactina. Talvez esse seja um dos motivos para as concentrações de metabólitos de estrógeno terem caído após a retirada dos ovos. Outra observação importante é de que após este ciclo de postura, o casal não apresentou mais comportamento reprodutivo. Sem atividade reprodutiva a gônada não está mais sensível aos estímulos não havendo mais produção de estrógeno.

As concentrações de metabólitos de progesterona aumentaram significativamente após retirada do ovo formando dois picos. Este aumento das concentrações ainda atinge valores inferiores àqueles encontrados no animal em postura no gráfico 40, fazendo com que possa se supor ser este um momento de transição do fim da incubação para a fase sem atividade reprodutiva onde possivelmente a concentração de metabólitos poderia ser reduzida.



5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que na espécie ararajuba (*Guaruba guarouba*):

Foi possível caracterizar e comparar as concentrações de metabólitos de glicocorticoides, testosterona, estrógeno e progesterona nas categorias reprodutivas, sem atividade reprodutiva, incubação e postura sendo, portanto viável e eficiente a metodologia não invasiva.

Foram validados fisiologicamente os ensaios para mensurar metabólitos de glicocorticoides e testosterona em excretas de machos.

Não foi possível validar fisiologicamente os ensaios para mensurar metabólitos de estrógeno e progesterona em excretas de fêmeas, no entanto os ensaios para esses hormônios foram validados biologicamente.

REFERÊNCIAS

- ACCACIO, G. M.; BRANT, A.; BRITEZ, R. M.; CERQUEIRA, R.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; GODOY, F.; LANDAU, E. C.; LOPES, A. T. L.; MIKICH, S. B.; OLIFIERS, N.; PIMENTA, B. V. S.; ROCHA, O.; SILVANO, D. L.; SMITH, W. S.; VENTORIN, L. B. Ferramentas biológicas para avaliação e monitoramento de habitats naturais fragmentados. In: Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF, 2003. p. 368-389.
- ASSENMACHER, I.; BOISSIN, J. Circadian endocrine and related rhythms in birds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 3, p. 489-98, 1972.
- ASTHEIMER, L. B.; BUTTEMER, W. A.; WINGFIELD, J. C. Gender and seasonal differences in adrenocortical response to ACTH challenge in an arctic passerine, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 94, p. 33-43, 1994.
- BAHR, J. M.; JOHNSON, P. A. 1991. Reproduction in poultry. In: Cupps P. T. **Reproduction in domestic animals**. 3rd ed. New York: Academic Press, p. 555-575, 1991.
- BALTIC, M. et al. 2005. A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the Black Grouse. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1046: 81–95.
- BENSUSAN, N. **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade: como, para que e por quê**. São Paulo: Editora Peirópolis, 2008. p. 17-42.
- BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K.; WINGFIELD, J. C. Endocrinology of Reproduction. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Birds**. New Hampshire: Edenbridge Ltda., 2007. p. 181-242.
- BirdLife International 2012 Species factsheet: *Guaruba guarouba*. <<http://www.birdlife.org>>. Acessado em 15 de maio de 2012.
- BISHOP, C. M.; HALL, M. R. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. **Journal of Zoology**, v. 224, p. 649 – 668, 1991.
- BLUHM, C. K.; PHILLIPS, R. E.; BURK, W. H. Serum Levels of Luteinizing Hormone, Prolactin, Estradiol and Progesterone in Laying and Nonlaying Mallards (*Anas platyrhynchos*). **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 295 – 305, 1983.
- BREUNER, C. W. Stress and Reproduction in Birds. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates. Volume 4: Birds**. California: Elsevier, 2011. p. 129-154.

- BURNIE, D.; WILSON, D. E. Introduction: Animals in Danger. In: _____. **Animal – The definitive visual guide to the world's wildlife**. New York: DK Publishing, Inc, 2001. p. 30-31.
- CARERE, C.; GROOTHUIS, T. G. G.; MOSTL, E.; DAAN S.; KOOLHAAS, J. M. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 540-48, 2003.
- CARSIA, R. V.; HARVEY, S. Adrenals. In: WITTHOW, C. **Sturkey's Avian Physiology**. New York: Cornell University Press, 2000. p. 489-537 withrow???
- COCKREM, J. F.; ADAMS, D. C.; BENNETT, E. J.; CANDY, E. J.; HAWKE, E. J.; HENARE, S. J.; POTTER, M. A. Endocrinology and Conservation of New Zealand Birds. In: GORDON, M. S.; BARTOL, S. M. **Experimental approaches in conservation biology**. California: University of California Press, 2004. p. 101-121.
- COLLAR, N. J. Foreword. In: _____. **The large macaws – Their care, breeding and conservation**. California: Raintree Publications, 1995. p.V.
- COLLAR, N. J. Family Psittacidae (Parrots). In: HOYO, J.; BRUGARGOLAS, R. M.; PASCUAL, C.; RUIZ-OLALLA, P.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx Edicions, 1997. p. 280-379.
- COSTANTINI, V.; CARRARO, C.; BUCCI, F. A.; SIMONTACCHI, C.; LACALANDRA, G. M.; MINOIA, P. Influence of a new slow-release GnRH analogue implant on reproduction in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 289 – 301, 2009.
- CROSTA, L.; GERLACH, H.; BURKLE, M.; TIMOSSI, L. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. **Vet. Clin. Exotic Animal**, v. 6, p. 57 – 83, 2003.
- DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; JEWGENOW, K.; KRAUSE, M.; GROSSMANN, R. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, p. 345-352, 2003.
- DEVICHE, P.; HURLEY, L. L.; FOKIDIS, H. B. Avian Testicular Structure, Function, and Regulation. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of vertebrates. Volume 4: Birds**. California: Elsevier, 2011. p. 27-70.
- DIAS, E. A.; OLIVEIRA, C. A. Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, suplemento, p. 5 - 11, 2006.

DUNN, I. C.; CICCONE, N. A.; JOSEPH, N. T. Endocrinology and Genetics of the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis. In: HOCKING, P. **Biology of Breeding Poultry**. UK: MPG Books Group, 2009. p. 61-88.

DUSSEAU, J. W.; MEIER, A. H. Diurnal and Seasonal Variations of Plasma Adrenal Steroid Hormone in the White-Throated Sparrow, *Zonotrichia albicollis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 16, p. 399-408, 1971.

DUYSE, E.V.; PINXTEN, R.; EENS, M. Seasonal fluctuations in plasma testosterone levels and diurnal song activity in free-living male great tits. **General and Comparative Endocrinology**, v. 134, p. 1 – 9, 2003.

EL HALAWANI, M. E.; SILSBY, J. L.; BEHNKE, E. J.; FEHRER S. C. Hormonal Induction of Incubation Behavior in Ovariectomized Female Turkeys (*Meleagris gallopavo*). **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 5, p. 9-67, 1986.

FERNANDEZ, F. A. S.; ALMEIDA, E. A. B.; CULLEN JR., L.; MARTINS, C. S.; OLIVEIRA, P. P.; PÁDUA, C. V.; RAMBALDI, D. M.; SCARIOT, A.; SILVEIRA, F. A.; VIDIGAL, T. H. D. A.; VIEIRA, D. L. M. Manejo das populações naturais nos fragmentos. In: Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF, 2003. p. 328-345.

FRENCH, N. A. Incubation and Hatching. In: HOCKING, P. **Biology of Breeding Poultry**. UK: MPG Books Group, 2009. p. 206-223.

FUJIHARA, C. J. Validação fisiológica da dosagem de metabólitos de glucocorticoides em fezes de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). **Tese apresentada junto ao programa de pós-graduação da faculdade de medicina veterinária e zootecnia – Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” – UNESP – campus de Botucatu, departamento de reprodução animal e radiologia veterinária, para obtenção do título de doutor**, 2012.

GASTAL, M. L.; SARAGOUSSE, M. Os instrumentos para conservação da biodiversidade. In: BENSUSAN, N. **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade: como, para que e por quê**. São Paulo: Editora Peirópolis, 2008. p. 43-62.

GODOY, S. N. Psittaciformes (arara, papagaio, periquito). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**, São Paulo: Roca, 2006. p. 222-251.

GOLDSMITH, A. R.; FOLLET, B. K. Anterior pituitary hormones. In: EPPLE, A.; STETSON, M. H. **Avian Endocrinology**. New York: Academic Press, Ins. 1980. p. 147 - 166.

GONZÁLEZ-MORÁN, M. G.; GUERRA-ARAIZA, C.; CAMPOS, M. G.; CAMACHO-ARROYO, I. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature, and aged chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, n. 4, p. 371-79, 2008.

- GOYMANN, W. Noninvasive Monitoring of Hormones in Bird Droppings: Physiological Validation, Sampling, Extraction, Sex Differences, and the Influence of Diet on Hormone Metabolite Levels. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1046, p. 35–53, 2005.
- HARVEY, S.; MERRY, B. J.; PHILLIPS, J. G. Influence of stress on the secretion of corticosterone in the duck (*Anas platyrhynchos*). **Journal of Endocrinology**, v. 87, p. 161-171, 1980.
- HIEBERT, S. M.; RAMENOFSKY, M.; SALVANTE, K.; WINGFIELD, J. C.; GASS, C. L. Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds. **Gen. Comp. Endocrinology**, v. 120, n. 2, p. 235 – 247, 2000.
- HIRSCHENHAUSER, K.; MOSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Seasonal patterns of sex determined from feces in different social categories of graylag geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, n. 1, p. 67-79, 1999.
- HIRSCHENHAUSER, K.; MOSTL, E.; PECZELY, P.; WALLNER, B.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Seasonal Relationships between Plasma and Fecal Testosterone in Response to GnRH in Domestic Ganders. **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, p. 262–272, 2000.
- HURLEY, L. L.; WALLACE, A. M.; STARTOR, J. J.; BALL, G. F. Photoperiodic induced changes in reproductive state of border canaries (*Serinus canarius*) are associated with marked variation in hypothalamic gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and the volume of song control regions. **Gen. Comp. Endocrinology**, p. 1 – 10, 2008.
- ICMBIO 2012. <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-especies/933-ararajuba-guarouba-guarouba>>. Acessado em 20 de junho de 2012.
- IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 06 de outubro de 2011.
- JAMIESON, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Birds**. New Hampshire: Edenbridge Ltda., 2007. p. V-VI.
- JOHNSON, A. L.; Reproduction in the female. In: WHITTOW, G. C. **Sturkie's Avian Physiology**. California: Academic Press, 2000, p. 569 - 596.
- JOHNSON, A. L.; WOODS, D. C. Ovarian Dynamics and Follicle Development. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Birds**. New Hampshire: Edenbridge Ltda., 2007. p. 243-278.
- JOSEPH, M. M.; MEIER, A. H. Daily rhythms os plasma corticosterone in the common pigeon, *Columba livia*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 20, n. 2, p. 326-30, 1973.

- KLASING, K. C. Potential Impact of Nutritional Strategy on Noninvasive Measurements of Hormones in Birds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 5 – 16, 2005.
- LARANJEIRAS, T.O. Biology and population size of the Golden Parakeet (*Guaruba guarouba*) in western Pará, Brazil, with recommendations for conservation. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.19, n. 3, p. 303-314, 2011.
- LARANJEIRAS, T.O.; COHN-HAFT, M. The geographic distribution of the Golden Parakeet (*Guaruba guarouba* - Psittacidae). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.17, n. 1, p. 1 - 19, 2009.
- LAUGHLIN, K. F. Breeder Management: How Did We Get Here? In: HOCKING, P. **Biology of Breeding Poultry**. UK: MPG Books Group, 2009. p. 10-26.
- LEE, J.; TELL, L.; LASLEY, B. A comparison of sex steroid hormone excretion and metabolism by Psittacine Species. **Zoo Biology**, v. 18, p. 247–260, 1999.
- LEITE, A. H.; SEINO, J. P. M.; LO, V. K. Fauna silvestre em cativeiro: indicativos sobre a situação no estado de São Paulo. **Nosso Clínico**, n. 86, p. 66 – 67, 2012.
- LENNOX, A. M.; HARRISON, G. J. The companion bird. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical avian medicine**. California: Spix, 2006. p. 29-44.
- LEWIS, P. D. Photoperiod and Control of Breeding. In: HOCKING, P. **Biology of Breeding Poultry**. UK: MPG Books Group, 2009. p. 243-260.
- LOVE, O. P.; BREUNER, C. W.; VÉZINA, F.; WILLIAMS, T. D. Mediation of a corticosterone-induced reproductive conflict. **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 1, p. 59 – 65, 2004.
- MANS, C.; TAYLOR, W.M. Update on neuroendocrine regulation and medical intervention of reproduction in birds. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 1, p. 83-105, 2008.
- MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 95-102, 2005.
- MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; BROOKS, T. M.; PILGRIM, J. D.; KONSTANT, W. R.; FONSECA, G. A. B.; KORMOS, C. Wilderness and biodiversity conservation. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, n. 18, p. 10309 – 10313, 2003.
- MORAIS, M. R. P. T.; SOUZA VELHO, A. L. M. C.; DANTAS, S. E. S.; FONTENELE-NETO, J. D. Morfofisiologia da reprodução das aves: controle endócrino do ciclo sexual das aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.285-293, 2012.

- MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B. BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C. G.; RICHARD, S.; VEISSIER, I. Exploeration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 317-339, 2007.
- MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Dom. Anim. Endocrinol.** v. 23, p.67-74. 2002.
- MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds droppings: an analytical approach. **Annals New York Acad. Sci.**, v. 1046, p. 17 - 34, 2005.
- MURPHY, D. D. Desafios à diversidade biológica em áreas urbanas. In: **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997. p. 89–97.
- MYERS, S. A.; MILLAM, J. R.; HALAWANI, M. E. Plasma LH and prolactin levels during the reproductive cycle of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 73, n. 1, p. 85-91, 1989.
- NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates. Volume 4: Birds**. California: Elsevier, 2011. p. XIII.
- OTTINGER, M. A.; WU, J.; PELICAN, K. Neuroendocrine regulation of reproduction in birds and clinical applications of GnRH analogues in birds and mammals. **Seminars in avian and exotic pet medicine**, v. 11, n. 2, p.71-79, 2002.
- OWEN, D. J.; LANE, J. M. High levels of corticosterone in feather-plucking parrots (*Psittacus erithacus*). **Veterinary Record**, v. 158, p. 804-805, 2006.
- PALME, R.; MÖSTL, E. Biotin-streptavidin enzyme immunoassay for the determination of oestrogens and androgens in boar feces. In: _____. **Advances of Steroid Analysis '93**. Budapeste: Ed. S. Görög, 1994, p. 111-117.
- PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **Int. J. Mammal. Biol.**, v. 62, n. 2, p. 192 - 197, 1997.
- PAKME, R.; BOBIA, C.; MESSMAN, S.; MOSTL, E. Measuring faecal cortisol metabolites: A non-invasive tool to evaluate adrenocortical activity in mammals. **Adv. Ethology**, v. 33, p. 27, 1998.
- PALME, R. Measuring fecal steroids – guidelines for practical application. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1046, p. 75 – 80, 2005.
- PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MÖSTL, E. Stress Hormones in Mammals and Birds - Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1040, p. 162 – 171, 2005.

- PEREIRA, R. J.G.; GRANZINOLLI, M. A. M.; DUARTE, J. M. B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, n. 1, p. 94 – 103, 2010.
- POLLOCK, C. G.; OROSZ, S. E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **Vet Clin Exot Anim**, v. 5, p. 441–474, 2002.
- POPP, L.G. Sazonalidade de excreção de corticoides urofecais e sua relação com aspectos reprodutivos e de manejo em papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) em cativeiro. **Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias**, 2006.
- REED, J. M. The Role of Behavior in Recent Avian Extinctions and Endangerments. **Conservation Biology**, v. 13, n. 2, p. 232–241, 1999.
- RETTENBACHER, S.; MÖSTL, E.; HACKL, R.; GHAREEB, K.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **Br. Poult. Sci.**, v. 45, p. 704–711, 2004.
- RETTENBACHER, S.; PALME, R. Biological validation of a non-invasive method for stress assessment in chickens. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 122, p. 8-12, 2009.
- ROMERO, L. M. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 1–24, 2002.
- SCANES, C. G. Introduction to endocrinology: Pituitary Gland. In: WHITTOW, G. C. **Sturkie's Avian Physiology**. California: Academic Press, 2000, p. 437– 460.
- SCHWARZENBERGER, F.; TOMÁSOVÁ, K.; HOLECKOVÁ, D.; MATERN, B.; MÖSTL, E. Measurement of fecal steroids in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes. **Zoo Biology**, v.15, p.159 - 171, 1996.
- SHARP, P. J.; DAWSON, A.; LEA, R. W. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 119, p. 275-282, 1998.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. p. 351-382.
- SILVEIRA, L. F.; BELMONTE, F. J. Comportamento reprodutivo e hábitos da ararajuba, *Guarouba guarouba*, no município de Tailândia, Pará. **Ararajuba**, v. 13, n. 1, p. 89 – 93, 2005.
- SMA – Secretaria de Meio Ambiente (São Paulo). **Fauna ameaçada no estado de São Paulo**. São Paulo: SMA/CED. 1998. 56p.

- SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. **Gen. and Comp. Endocrinology**, v.114, n. 2, p. 257-268, 1999.
- STALEY, A. M.; BLANCO, J. M.; DUFTY, A. M.; WILDT, D. E.; MONFORT, S. L. Fecal steroid monitoring for assessing gonadal and adrenal activity in the golden eagle and peregrine falcon. **Journal of Comp Physiology**, v. 177, p. 609–622, 2007.
- STOTZ, D. F.; FITZPATRICK, J. W.; PARKER III, T. A.; MOSKOVITZ, D. K.; **Neotropical birds: Ecology and Conservation**. Chicago: Univ. Chicago Press, 1996.
- STURKIE, P. D. **Avian Physiology**. New York: Cornell University Press, 1965.
- TOUMA C.; PALME, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: the importance of validation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1046, p. 54-74, 2005.
- TOUMA, C.; SACHSER, N.; MOSTL, E.; PALME, R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 130, p. 267–278, 2003.
- TSUTSUI, K.; SAIGOH, E.; UKENA, K.; TERANISHI, H.; FUJISAWA, Y.; KIKUSHI, M.; ISHII, S.; SHARP, P. J. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. **Biochemistry and Bioph. Research**, v. 275, p. 661-667, 2000.
- UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. Neuroendocrine Control of Reproduction in Birds. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates. Volume 4: Birds**. California: Elsevier, 2011. p. 1-26.
- VLECK, C. M.; VLECK, D. Hormones and Regulation of Parental Behavior in Birds. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and Reproduction of Vertebrates. Volume 4: Birds**. California: Elsevier, 2011. p. 181-204.
- VUILLEUMIER, F.; DOVE, C. Birds. In: BURNIE, D.; WILSON, D. E. **Animal: the definitive visual guide to the world's wildlife**. New York: DK Publishing, 2001. p. 258-263.
- 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 a Diverse Array of Nondomestic Mammalian and Avian Species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 260–275, 2000.
- WINGFIELD, J. C. Fine temporal adjustment of reproductive functions. In: EPPLE, A.; STETSON, M. H. **Avian Endocrinology**. New York: Academic Press, Ins. 1980. p. 367 – 390.

WIKELSKI, M.; HAU, M.; ROBINSON, D.; WINGFIELD, J.C. Reproductive seasonality of seven neotropical passerines species. **The Condor**, v. 105, p. 683-695, 2003.

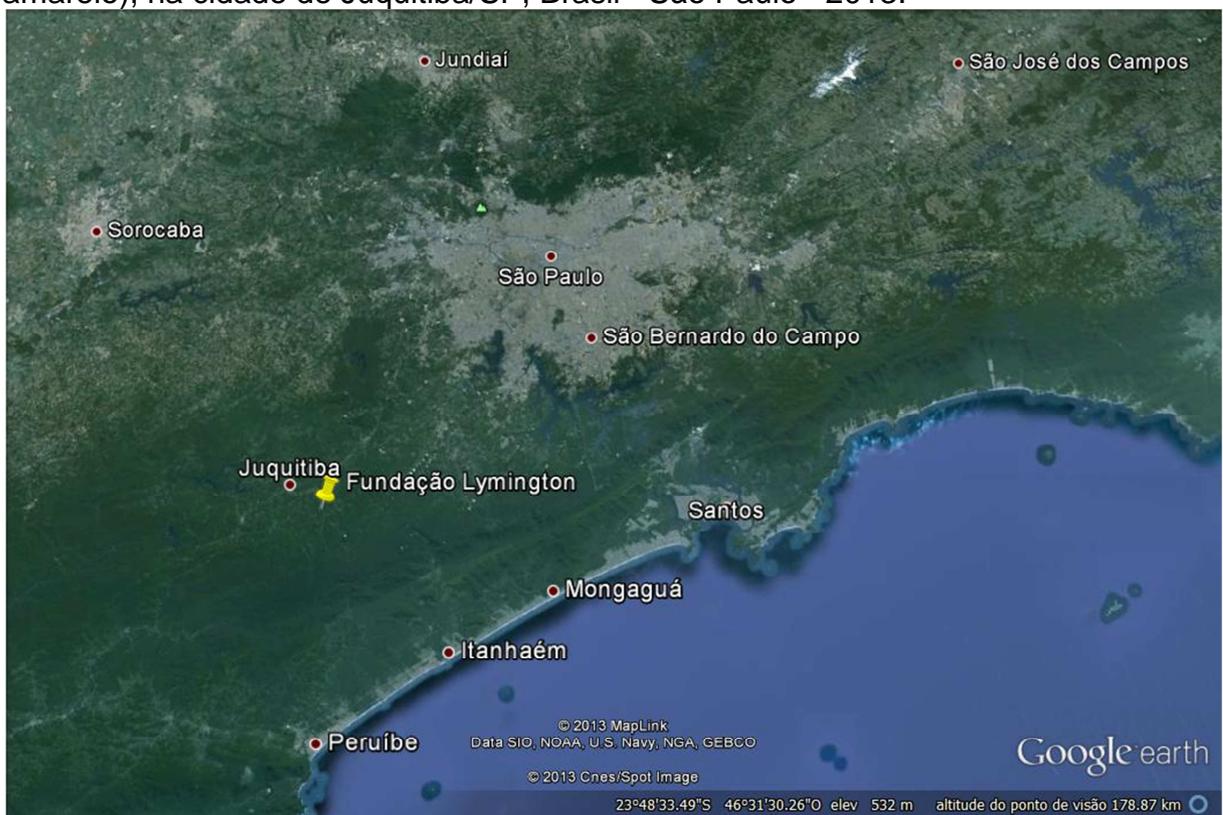
YAMASHITA, C. Field observations of the biology and comments on the conservation of the Golden Conure (*Guaruba guarouba*) in Brazil. **Proceedings of the International Aviculturists Society**, p. 1 - 6, 2003.

ANEXO A

Localização da Fundação Lymington

Latitude 23°58'3.38"S
Longitude 47°0'51.40"O

Imagem de satélite mostrando a localização da Fundação Lymington (marcador amarelo), na cidade de Jujituba/SP, Brasil - São Paulo - 2013.



Fonte: Google Earth (acessado em 07/05/2013).

APÊNDICE A

Ararajubas do grupo experimental			
Identificação	Sexo	Origem	Pareada
LYM 047	F	Nasceu no criadouro em 2008	Não
LYM 043	F	Nasceu no criadouro em 2007	Não
LYM 057	F	Nasceu no criadouro em 2008	Não
LYM 068	M	Nasceu no criadouro em 2009	Não
LYM 040	M	Nasceu no criadouro em 2005	Não
LYM 075	M	Nasceu no criadouro em 2010	Não
LYM 041	F	Nasceu no criadouro em 2006	Não
LYM 030	F	Nasceu no criadouro em 2005	Não
LYM 061	M	Nasceu no criadouro em 2009	Não
LYM 024	M	Nasceu no criadouro em 2004	Não
LYM 046	F	Nasceu no criadouro em 2008	Não
LYM 056	F	Nasceu no criadouro em 2008	Não
LYM 037	F	Nasceu no criadouro em 2005	Não
LYM 060	M	Nasceu no criadouro em 2009	Não
LYM 063	M	Nasceu no criadouro em 2009	Não
LYM 059	M	Nasceu no criadouro em 2009	Não
025	F	Apreensão IBAMA 2003	Sim – 035 (C1)
035	M	Apreensão IBAMA 2002	Sim – 025 (C1)
616	F	Apreensão IBAMA 2002	Sim – 617 (C2)
617	M	Apreensão IBAMA 2002	Sim – 616 (C2)
022	F	Nasceu no criadouro em 2005	Sim – 066 (C3)
066	M	Nasceu no criadouro em 2009	Sim – 022 (C3)
015	F	Nasceu no criadouro em 2004	Sim – 014 (C4)
014	M	Nasceu no criadouro em 2004	Sim – 015 (C4)

OBS: O casal C5 foi formado após o experimento do desafio de ACTH, composto pelas aves LYM 024 e LYM 030.

APÊNDICE B

Histórico reprodutivo de ararajubas na Fundação Lymington		
Ano	Nº casais reprodutores	Nº filhotes*
2004	2	7
2005	2	19
2006	2	9
2007	2	0
2008	3	2
2009	3	7
2010	4	12
2011	4	4
2012	3	1

* Os filhotes constantes na tabela são os que sobreviveram. Houve alguns óbitos e posturas de ovos brancos. Segundo a Sra. Linda Wittkoff, presidente da Fundação Lymington, houve uma média de 3 – 4 ovos por postura com um total de 150 a 200 ovos entre os anos de 2004 a 2012, sempre durante os meses de janeiro a abril de cada ano.