EDUARDO ANTUNES DIAS

**Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de
esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de
excretas cloacais**

SÃO PAULO

2003

EDUARDO ANTUNES DIAS

Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1182
FMVZ

Dias, Eduardo Antunes

Determinação do sexo psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais / Eduardo Antunes Dias. – São Paulo : E. A. Dias, 2003.

109 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Sexo. 2. Psitacídeos. 3. Excretas cloacais. 4. PCR.
5. Radioimunoensaio. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
17	3	7	g/fezes	ng/g fezes para os andrógenos e pg/g fezes para os estrógenos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais.", Protocolo nº 94/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 05/06/2002.

(We certify that the Research "Psitacine sex determination by radioiminoassay (RIA) of reproductive metabolites and by polimerase chain reaction (PCR) using tools" protocol number 94/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 06/05/2002 meeting.

São Paulo, 05 de junho de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E DA AMAZÔNIA LEGAL
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
DIRETORIA DE ECOSISTEMAS - DIREC

LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO

NÚMERO DA LICENÇA 10/2001	n.º de registro no IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE- 03 abril a 02 junho de 2001	PROCESSO IBAMA N.º 02027.003817/01-94
OBJETO:		FAVORECIDO:	
☐ CAPTURA/ COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO		☐ ZOOLOGICO	
☒ TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO		☒ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA	
☐ COLETA/ TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO/ PESQUISA CIENTÍFICA		☒ PESQUISADOR	
☐ TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA		☐ EXPOSITOR/CONCURSIONISTA	
☐ EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES		☐ CRIADOUROCONSERVACIONISTA	
☐ OUTROS (ESPECIFICAR)		☐ CRIADOURO COMERCIAL	

FAVORECIDO – ESPECIFICAÇÃO: Faculdade de Medicina Veterinária - USP

NOME: Eduardo Antunes Dias – CRMV 13214-SP

ENDEREÇO: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo /Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 / CEP 05508-900 / São Paulo/SP

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Medicina Veterinária USP – Departamento de Reprodução Animal – Laboratório de dosagens hormonais

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): .....

TRANSPORTADOR: o pesquisador favorecido

PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA - Criadouro Conservacionista Rancho das Hortências – Reg. IBAMA nº 3744/82 – de Ademar Marra

DESTINO: Biotério do Departamento de Reprodução Animal – Laboratório de Dosagens hormonais - USP

LISTA DAS ESPÉCIES QUANT. (TIPO)	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
00/00/02	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro

Observações: 1. Os responsáveis pela Expedição deverão apresentar relatório final ao término da validade desta licença, e encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objetos da presente licença

2. Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte da espécie vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.

3. Os animais serão mantidos nas dependências do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP por um período de 8 meses para coleta de amostras de sangue e excretas cloacais até a padronização das técnicas de sexagem

DATA DE EMISSÃO
São Paulo 03/04/2001

ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA
Marli Penteado - Ecossistemas/IBAMA/SP

- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO NACIONAL.
- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:
  1. CAPTURA/COLETA E TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO APROVADO
  2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO
  3. CAPTURA/ COLETA/ TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL
  4. CAPTURA / COLETA/ TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSETIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE
  5. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS OU MATERIAL BIOLÓGICO
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR): INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.

Zoológico de São Paulo

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Esportes e Turismo

Ofício FPZSP n.º 052/2001 - ALPP/mjc

São Paulo, 21 de maio de 2001.

Prezado Professor

Informamos Vossa Senhoria que, teremos condições de atender a solicitação do mestrando, Eduardo Antunes Dias, para a colheita de excretas cloacais de algumas espécies de Psitacídeos mantidos nesta Fundação.

Pedimos que entre em contato com o biólogo Luiz Francisco Sanfilippo, chefe do Setor de Aves, através do telefone 5073-0811 ramal 2019 ou 2067, para as devidas providências.

Aproveitamos a oportunidade para apresentar nossos protestos de consideração e apreço.

Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini

Diretor

Ilustríssimo **Professor**

Doutor Cláudio Alvarenga de Oliveira

Departamento de Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO

Av. Miguel Stéfano, 4241 - Ccp 04301-905 - Caixa Postal 12.954 - Ccp 04010-970

Tel.: (0xx11) 276-0811 - Fax: (0xx11) 276-0564 - 5581-7238

São Paulo - SP - Brasil

<http://www.zoologico.com.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: DIAS, Eduardo Antunes

Título: Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Carlos Arruda Dias e Lisá Antunes Dias, por me proporcionarem essa ímpar e valorosa experiência;

À minha querida companheira de todos os momentos, MS. Regina Célia Rodrigues da Paz, pela ajuda e apoio incondicional;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, por me conduzir pelos caminhos da ciência;

Ao ex-coordenador da Pós-graduação do VRA, Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, pelo exemplo profissional e pessoal, figura à qual tenho o maior respeito e admiração;

Ao grande amigo e colega Marcílio Nichi, pela paciência oriental e boa vontade sem igual;

Aos professores Dr. Leonardo José Richtzenhain, Dra. Regina Mieko Sakata Miranda, Dra. Alda Maria B. Noronha Madeira, Dra. Cristina Yumi Miyaki e aos colegas de Faculdade Andréa Moreno, Sandra Fernandez e Jane Silveira Fraga, do VPT; Rodrigo Martins Soares e Adriana Cortez, do VPS; M.V. Marta Brito Guimarães do ambulatório de aves/FMVZ; às técnicas de laboratório Érika Cristiane G. Felipe e Ivone Izabel MacKowiak da Fonseca, pelo suporte técnico;

Aos funcionários e colegas de Departamento, pela amizade e convivência;

Ao Sr. Ademar Marra e familiares pela hospitalidade e por me abrirem as portas do Criadouro Conservacionista Rancho das Hortências para a colheita das amostras de inestimável valor;

Ao médico veterinário Samuel Eurich Betkowsky, à bióloga Antonieta Ficucella e à acadêmica do curso de medicina veterinária/USP, Melissa Alves, pela ajuda na colheita das amostras;

Ao biólogo Luiz Antônio Bezerra de Melo Lula, ao Oriel Nogali, ao médico veterinário Rodrigo Teixeira e ao Zoológico de São Paulo pelas amostras de papagaio-verdadeiro;

Ao biólogo Luiz Francisco Sanfilippo pelas amostras de papagaio-verdadeiro;

A CAPES e principalmente a FAPESP, pelo apoio financeiro;

Ao LDH, pela coragem e pioneirismo em iniciar pesquisas com fisiologia endócrina de animais selvagens no Departamento;

À exuberante Natureza e seus admiráveis segredos escondidos por trás da sua beleza suprema.

Na Ciência, não existe absolutismo nas conclusões, existe sim a sabedoria nas suposições.

(DIAS, E. A.)

RESUMO

DIAS, E. A. **Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais.** [Psittacine sex determination by radioimmunoassay (RIA) of sex steroids and by polymerase chain reaction (PCR) using fecal samples]. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Para o presente estudo, utilizaram-se amostras de excretas cloacais de 65 aves da família Psittacidae, previamente sexadas. Os andrógenos e estrógenos fecais foram extraídos com Tampão Fosfato Salino (PBS) e com uma solução PBS:Álcool Etílico (4:1) e a mensuração hormonal foi realizada em “kits” comerciais para radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). O sexo de cada ave foi confirmado utilizando como parâmetro o intervalo de confiança (95%) da média dos valores transformados do fator Razão dos Índices de Estrógenos e Andrógenos ou com o intervalo de confiança (95%) da média dos valores transformados dos índices do fator Andrógeno. As extrações de DNA de algumas amostras foram realizadas por meio de “kits” comerciais e por meio de resinas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia (VPT) – FMVZ/USP. O DNA foi amplificado pela técnica da PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região que determina o sexo das aves. Também se avaliou o efeito da adição de células sanguíneas nas amostras. Setenta por cento das aves tiveram o sexo confirmado pela técnica do radioimunoensaio. A amplificação do produto na PCR somente ocorreu em amostras onde células sanguíneas foram adicionadas e o DNA extraído

com um determinado “kit” comercial. Os resultados encontrados demonstram a necessidade da realização de mais estudos para a determinação do sexo de aves monomórficas por meio de técnicas não invasivas. Validaram-se dois kits comerciais para a mensuração de metabólitos de hormônios esteróides em excretas cloacais de aves por radioimunoensaio.

Palavras-chave: Sexo. Psitacídeos. Excretas Cloacais. Radioimunoensaio. PCR.

ABSTRACT

DIAS, E. A. Psittacine sex determination by radioimunoassay (RIA) of sex steroids and by polimerase chain reaction (PCR) using fecal samples. [Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais]. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

For the current study, it were used fecal samples from 65 birds of Psittacine Family, previously sexed by PCR from blood cells. The fecal androgens and estrogens metabolites were extracted with PBS (Phosphate Buffer Saline) or PBS :Ethil Alchool (4:1) and measured by comercial radioimunoassay kits at the Hormonal Measurement Laboratory of the Department of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of the University of São Paulo. The sex determination of the birds were performed using the confidence interval (95%) for the mean of transformed values of estrogens/androgen rate or transformed androgens values. The fecal DNA extraction of some samples were performed using comercial kits or by resines at the Molecular Biology Laboratory of the Pathology Department of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of the University of São Paulo. The DNA were amplified by PCR using specific primers for the target region of bird gene that express sex. Evaluation of the effect of blood cells adding on samples also had been done. 70% of birds had the sex confirmed by radioimunoassay. The amplification of PCR products occured only in samples added with blood cells and extracted by a specific comercial kit. The results showed that further studies for sex determination on monomorphic birds by non-invasive techniques are necessary. Two comercial kits were validated for the measurement of fecal steroid metabolites by radioimunoassay.

Key words: Sex Determination. Psittacines. Feces. RIA. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Colheita das excretas cloacais de psitacídeos no criadouro Conservacionista Rancho das Hortências. Tapiraí/SP, 2001.....	28
Figura 2 -	Colheita das excretas cloacais de psitacídeos no Parque Zoológico de São Paulo/SP, 2001.....	28
Figura 3 -	Amostra de excretas cloacais de psitacídeos armazenadas a -20°C.....	29
Figura 4 -	Separação do DNA total em gel de Agarose 0,8% extraído com o QIAmp® DNA Stool Mini Kit de amostras de excretas cloacais de 5 machos e 5 fêmeas de papagaio-verdadeiro do Zoológico de São Paulo, onde se adicionou 10µl de sangue de galinha. São Paulo, 2002.....	58
Figura 5 -	Separação do DNA total em gel de Agarose 0,8% extraído com o “kit” Dynabeads®DNA DIRECT™ UNIVERSAL de amostras de excretas cloacais de 5 machos e 5 fêmeas de papagaio-verdadeiro do Zoológico de São Paulo, onde foi adicionado 2µl de sangue de galinha para 10µl de NaOH em 200µl de “dynabeads”. São Paulo, 2002.....	58
Figura 6 -	Amplificação do DNA separado em gel de Agarose 3% das amostras onde se adicionou 10µl de sangue de galinha e se extraiu com QIAmp® DNA Stool Mini Kit. Espaço Vazio: Controle Negativo. São Paulo, 2002.....	59
Figura 7 -	Vias metabólicas do hormônio Testosterona.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação das espécies de psitacídeos estudadas com os respectivos resultados das mensurações dos metabólitos hormonais com os valores não transformados e transformados, em g/fezes, sendo que a cor verde indica a confirmação do sexo, a cor vermelha indica erro na confirmação do sexo e a cor azul indica a incapacidade na confirmação do sexo. São Paulo, 2002.....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	FAMÍLIA PSITTACIDAE.....	19
2.2	TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE AVES MONOMÓRFICAS.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	26
3.2	RADIOIMUNOENSAIO (RIE).....	29
3.2.1	Solubilização dos Metabólitos	29
3.2.1.1	Testes de Diluição e de Extração.....	30
3.2.2	Mensuração dos Metabólitos	31
3.2.3	Validação dos Ensaios	33
3.3	DETERMINAÇÃO DO SEXO POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	34
3.3.1	Padronização da extração do DNA genômico	34
3.3.2	Deteccção do DNA Extraído	35
3.3.3	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	36
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS	41
4.1	RADIOIMUNOENSAIOS (RIE).....	41
4.2	VALIDAÇÃO DOS “KITS” DE RADIOIMUNOENSAIO (RIE).....	54
4.2.1	Testosterona	54
4.2.2	Estrógenos Totais	55

4.3	DETERMINAÇÃO DO SEXO POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	56
4.3.1	Obtenção do DNA	56
4.3.2	Amplificação da Região do DNA ligado ao Gene CHD	59
5	DISCUSSÃO	60
5.1	RADIOIMUNOENSAIOS (RIE).....	60
5.2	DETERMINAÇÃO DO SEXO POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	79
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

A Medicina Veterinária cada vez mais percebe a necessidade e a importância da atuação do seu profissional no campo da conservação de espécies ameaçadas de extinção. Atualmente, médicos veterinários são vistos com maior frequência coordenando organizações não governamentais que trabalham com meio ambiente; chefiando, tanto em universidades quanto a campo, projetos de pesquisa com espécies selvagens; dando assistência técnica a criadores de fauna nativa e a zoológicos; e por último dirigindo institutos de pesquisa nessa área.

Nesse sentido, o Departamento de Reprodução Animal (VRA) vem ampliando sistematicamente o número de pós-graduandos com projetos de pesquisa com animais selvagens. Esse fenômeno se fundamenta na capacidade em que a reprodução animal tem em desenvolver uma grande quantidade de ferramentas que podem ser usadas de maneira muito direta e decisiva na conservação das espécies.

As aves da família Psittacidae possuem características muito marcantes: a plumagem multicolorida, o bico forte recurvado, o quarto dedo deslocado anteriormente junto ao primeiro, alto grau de inteligência e capacidade de reproduzirem vocábulos humanos. Seus principais representantes são as araras e os papagaios. A destruição dos seus *habitats* e o comércio ilegal para a sua venda como animais de estimação ou de coleções faz com que muitas espécies estejam ameaçadas de extinção. O caso mais grave é o da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), extinta na natureza e com somente 8 indivíduos em cativeiro no Brasil. Como a maioria das espécies dessa família não

apresenta dimorfismo sexual externo, a determinação do sexo desses animais torna-se pertinente para planos de manejo reprodutivo.

O estudo de animais em vida livre tem como principal obstáculo a colheita de material biológico. A captura dos indivíduos geralmente emprega armadilhas e acarreta um grande estresse para o espécime. Mesmo com animais em cativeiro, as dificuldades não diminuem. Qualquer tipo de contenção é um fator de risco muito grande, tanto para o animal quanto para a pessoa que a realiza. Assim sendo, cada vez mais são valorizadas técnicas não invasivas que avaliam indiretamente o objeto de estudo. Como as fezes dos animais possuem as mais diversas informações sobre a sua genética e sobre o seu estado fisiológico, o desenvolvimento de métodos para processá-las e avaliá-las é crescente.

O princípio da técnica do radioimunoensaio baseia-se em uma reação do tipo antígeno-anticorpo. Estima-se a quantidade de hormônio (antígeno) na amostra usando-se como competidor um antígeno em solução com as mesmas características do primeiro e que no entanto está marcado com o isótopo ^{125}I , cuja radioatividade será detectada no contador Auto-Gama Cobra®. Os resultados são comparados com uma curva padrão que contém valores conhecidos para aquele determinado hormônio e expressos em pg/ g fezes para os estrógenos ou ng/ g fezes para os andrógenos (resultado da mensuração x diluição / peso das excretas em gramas).

A determinação do sexo por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) é atualmente o método mais seguro, com mais de 99% de acerto. Normalmente, utilizam-se amostras sanguíneas para a extração do DNA, já que as hemácias em aves são nucleadas. Várias cópias do gene CHD-W e CHD-Z são sintetizadas a partir de uma fita molde (GRIFFITHS et al., 1998). Para que ocorra essa amplificação, é necessário que a

região alvo seja flanqueada por oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos, para que posteriormente a enzima polimerase sintetize a nova sequência a partir da fita molde, na direção 5’ – 3’. À reação são adicionados deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPS) para servirem como substrato para a nova sequência; magnésio (Mg^{2+}), um cofator necessário para o funcionamento da enzima; e finalmente um Tampão de Reação com pH ideal para a atividade enzimática. O processo é composto por três etapas no equipamento chamado termociclador: a Desnaturação em altas temperaturas, objetivando interromper todas as reações enzimáticas e desnaturar a dupla fita de DNA em fita simples; o Anelamento em temperaturas mais baixas às da desnaturação, onde os oligonucleotídeos iniciadores encontrarão uma temperatura ideal para se ligarem na região apropriada do molde de DNA; e a Extensão a 72°C, temperatura ideal para que a enzima polimerase sintetize a região alvo do DNA.

O presente trabalho teve como objetivo testar em condições reais a técnica de determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIA) usando-se mensurações de metabólitos de esteróides sexuais em excretas cloacais, bem como validar os “kits” comerciais empregados nesta finalidade e analisar o método de extração desses metabólitos.

O segundo objetivo foi adaptar a técnica de determinação do sexo por PCR a partir da extração de DNA dessa mesma matriz, por meio de “kits” comerciais e resinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA PSITTACIDAE

A Família Psittacidae é constituída por 339 espécies de aves em todo o mundo (AUSTIN JR., 1971). Somente na América do Sul vivem mais de 100 espécies, sendo que 72 delas estão no Brasil (SICK, 1997). Por esse fato, o nosso país já foi chamado de “Terra dos Papagaios” (*Brasília sive terra papagallorum*) nos primeiros anos pós-descobrimento. Essas aves caracterizam-se por possuírem plumagem multicolorida; uma cabeça robusta com um bico forte recurvado, tendo a maxila móvel e articulada ao crânio; pé zigodáctilo, ou seja, com o quarto dedo deslocado anteriormente junto ao primeiro, e o tarso muito curto (SICK, 1997). Seus principais representantes são as araras e os papagaios, sendo esses últimos os mais populares e os mais estudados devido à suas habilidades na articulação de sons e na resolução de problemas. Essas particularidades, principalmente a de reproduzirem vocábulos humanos, bem como a grande variedade de cores das plumagens, contribuem para que sejam capturados e mantidos como animais de estimação ou como acervo de colecionadores. É justamente o tráfico ilegal dessas aves e a fragmentação dos seus *habitats*, ocasionados pelo avanço da fronteira agrícola e pela pressão da ocupação humana, que fazem com que muitas dessas espécies estejam ameaçadas de extinção. Das 38 espécies de psitacídeos citadas no “Threatened Birds of America”, 14 (36,84%) têm distribuição geográfica no Brasil (LISTA..., 2002). Os casos mais críticos são: Ararinha-azul

(*Cyanopsitta spixii*), considerada extinta na natureza e com aproximadamente 60 indivíduos em cativeiro, sendo apenas 8 no Brasil (IBAMA..., 2002); Arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari*), com aproximadamente 246 indivíduos de vida livre na região conhecida como Raso da Catarina, ao nordeste do Estado da Bahia (CENSO..., 2002); Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), que tem por volta de 4.500 indivíduos distribuídos na Serra do Mar, entre o sudeste do Estado de São Paulo e o leste do Estado do Paraná (COLLAR et al., 1992; PROJETO..., 2002).

Governo, zoológicos, criadouros científicos, comerciais e conservacionistas têm um importante papel em programas de conservação e em planos de manejo reprodutivo para essas espécies. A correta determinação do sexo para a formação de casais objetivando a reprodução em cativeiro e visando uma posterior soltura monitorada dos descendentes na natureza é uma das principais medidas para que se obtenha sucesso nesses tipos de programas e planos. Igualmente relevante é a manutenção dos animais de vida livre (DRECHSLER, 2000). Quando se toma todo o universo de espécies que compõem o grupo das aves, aproximadamente 30% delas não apresentam dimorfismo sexual externo (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978; TELL; LASLEY, 1991). Sendo a Família Psittacidae uma das que possui maior número de espécies com essa característica, torna-se pertinente o uso de técnicas para a determinação do sexo que tragam menor risco à vida da ave e que tenham resultados confiáveis.

2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE AVES MONOMÓRFICAS

Primeiramente, a determinação do sexo era feita com base no comportamento reprodutivo, na morfometria e na palpação da região da cloaca. Machos tendem a ter um tamanho corpóreo maior, a cabeça maior e mais quadrada e a serem dominantes. Como as fêmeas põem ovos, os ossos da região pélvica têm um tamanho diferente, mais alargado, quando comparado com os machos (JOHNSON, 1986a). Já em relação à cloaca, em algumas espécies, os machos apresentam uma proeminência nessa região, visando uma melhor deposição do sêmen na fêmea (JOHNSON, 1986b). Entretanto, esses dados são muito variáveis e nem sempre seguem um padrão.

Outros métodos alternativos também existem, como a Radiestesia, e desperta muita curiosidade (FREIXINHO JR., 2002). Esse método empírico é realizado com um pêndulo de ametista ou liga metálica contendo níquel, cromo ou ferro suspenso por um barbante sobre a região inguinal da ave, que está em decúbito dorsal. Se o pêndulo descrever um eixo único de um lado para o outro sobre a ave, se trataria de um macho. Se o pêndulo descrever uma circunferência, se trataria de uma fêmea.

Uma das técnicas mais usualmente empregadas é a citogenética ou cariotipagem, que consiste no exame dos cromossomos sexuais em metáfase. Diferentemente dos mamíferos, as fêmeas das aves são heterozigotas (ZW) e os machos homozigotos (ZZ). Para tanto, é preciso conter o pássaro uma ou duas vezes para a colheita de sangue ou de tecido. Quando é usada a colheita de tecido, captura-se a ave uma vez para o corte da unha ou da pena e outra para a colheita do tecido em desenvolvimento, já que é necessário que as células estejam em plena divisão. Leva-se

com isso cerca de duas a três semanas para completar todo o processo (DELHANTY, 1989). Além dos problemas de estresse da ave, causado pela contenção, dos problemas devido a invasividade da técnica e do tempo gasto, deve-se obter ainda uma boa visualização dos cromossomos em metáfase, correndo-se o risco de ter que repetir todo o processo de colheita.

Outra técnica amplamente difundida é a determinação do sexo, ou sexagem, por celioscopia (sexagem cirúrgica). Através de um endoscópio rígido (artroscópio de 2,7 mm), visualizam-se as gônadas masculinas ou femininas das aves na cavidade celomática. Normalmente, as fêmeas das aves possuem apenas o ovário esquerdo desenvolvido (JOHNSON, 1986a), enquanto que nos machos os dois testículos estão internalizados e situam-se lateralmente aos rins (JOHNSON, 1986b). Como em qualquer outro tipo de intervenção cirúrgica, necessita-se nesse caso da contenção física e posteriormente da contenção química da ave, aumentando-se os riscos de morte causados pela anestesia e pelo pós-cirúrgico (GREENWOOD, 1983; SMITH, 1983). Outro problema que poderá ocorrer é a difícil visualização das gônadas causada pela demasiada deposição de tecido adiposo sobre essas (GREENWOOD, 1983).

Em um experimento no qual foram comparadas essas duas técnicas, sendo a cariotipagem feita através de amostras sangüíneas, constatou-se que apesar dos riscos da sexagem por celioscopia serem maiores, essa era mais eficiente e financeiramente mais viável (PRUS; SCHMUTZ, 1987). No entanto, relatou-se também que aves sexualmente imaturas podem apresentar gônadas pouco desenvolvidas, dificultando assim a visualização.

Um método que parece ser muito rápido e simples é o uso da citometria de fluxo na determinação do sexo. Essa técnica se baseia na separação de células sanguíneas

masculinas das femininas devido à micro diferenças na densidade do núcleo dessas células em cada sexo, e ainda encontra-se em desenvolvimento (REDELMAN; FLEURY; GARNER, 1997).

O estudo endocrinológico propiciou uma nova maneira de se identificar o sexo das aves e até mesmo de traçar o perfil hormonal destas. As pesquisas iniciaram mensurando níveis plasmáticos de esteróides sexuais por meio do radioimunoensaio (RIA). Esse tipo de abordagem continuou sendo muito explorado, como no estudo dos níveis plasmáticos de esteróides sexuais em kiwi (POTTER; COCKREM, 1992) e no estudo sobre a secreção de LH e prolactina em aves (SHARP; DAWSON; LEA, 1998). Posteriormente, buscando-se uma abordagem não invasiva, menos estressante e menos traumática, os trabalhos concentraram-se em mensurações desses esteróides através das excretas cloacais (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978; BERCOVITZ et al., 1982; BISHOP; HALL, 1991; COCKREM; ROUNCE, 1994; COCKREM; ROUNCE, 1995; CZEKALA; LASLEY, 1977; HIEBERT et al., 2000; LEE; TELL; LASLEY, 1999; LEE et al., 1995; PATZL; HOCHLEITHNER, 1992; STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979) e até mesmo nos fragmentos da casca dos ovos (BERCOVITZ; SARVER, 1988). Estudos da fisiologia reprodutiva (glicocorticóides, andrógenos, estrógenos e progestágenos) com métodos não invasivos também foram priorizados em outras espécies (GRAHAM et al., 2001; ISHII, 1998; LASLEY; KIRKPATRICK, 1991; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WASSER et al., 2000). Por meio da mensuração de metabólitos de esteróides sexuais em aves, determina-se a relação entre hormônios femininos e masculinos, expressada pela razão estrógenos:andrógenos. Esses hormônios são usados como parâmetro por apresentarem grande importância durante o desenvolvimento e a maturação sexual (JOHNSON, 1986a; JOHNSON, 1986b). Se o resultado dessa razão

tiver valores altos devido à alta concentração de estrógenos e baixa concentração de andrógenos, a ave será sexada como fêmea. Se o resultado for baixo (o inverso da primeira), será sexada como macho.

Mais recentemente, com o desenvolvimento da engenharia molecular, produziu-se uma nova ferramenta para a amplificação de DNA, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Essa nova técnica foi utilizada para a determinação do sexo das aves baseada em genes CHD (“chromobox-helicase-DNA-binding”), que está associada aos cromossomos sexuais das aves (CLINTON; HAINES, 1999; GRIFFITHS et al., 1998). Usando dois tipos de oligonucleotídeos iniciadores ou “primers” (P2 e P8), que são uma sequência curta de bases que irão se ligar à região alvo do gene para a sua posterior amplificação, o resultado da sexagem foi correta em 27 das 28 espécies de aves estudadas nessa pesquisa. Os resultados expressaram duas bandas de leitura para as fêmeas (CHD-Z; CHD-W) e uma banda para os machos (CHD-Z), de tamanho variável entre 300 e 400pb (GRIFFITHS et al., 1998). A amplificação da região alvo CHD foi testada mais tarde em outras espécies de psitacídeos, onde se comprovou a sua acurácia (MIYAKI et al., 1998; RUSSELLO; AMATO, 2001). A técnica é mais comumente empregada usando-se amostras de sangue (GRIFFITHS et al., 1998; LESSELLS; MATEMAN, 1996; MATTOS et al., 1998; MIYAKI et al., 1998) e amostras de tecido de penas (RUSSELLO; AMATO, 2001). A sexagem por PCR através das excretas cloacais dos pássaros é muito recente, apresentando pouquíssimos trabalhos publicados (ROBERTSON; MINOT; LAMBERT, 1999; SEGELBACHER; STEINBRÜCK, 2001). Pesquisas com sexagem de aves a partir da urina são mais escassas ainda (NOTA; TAKENAKA, 1999). Fezes de animais já foram usadas com outro objetivo, como em estudos filogenéticos e populacionais em ursos, focas e coiotes (HÖSS et al.,

1992; KOHN; WAYNE, 1997; KOHN et al., 1999; REED et al., 1997; WASSER et al., 1997) e em estudos sobre métodos de extração de DNA com fezes de chimpanzés e babuínos (WHITTIER et al., 1999). Em humanos, alguns gramas de fezes contêm quantidade suficiente de DNA proveniente de células descamadas da mucosa intestinal para sua amplificação (ALBAUGH et al., 1992), permitindo assim uma alta confiabilidade da técnica. Outras técnicas que empregam microesferas magnetizadas que adsorvem o DNA da amostra evitam problemas com inibidores do PCR (FLAGSTAD et al., 1999; NILSSON et al., 1996; RUDI et al., 1997), já que tanto fezes quanto excretas cloacais contêm uma infinidade de substâncias que interferem na reação. Quando a amostra possui pouquíssima quantidade de DNA, pode-se utilizar resinas para a sua extração. A resina Chelex® é composta por copolímeros de divinilbenzeno estireno contendo íons iminodiacetato pareados que agem como um grupo quelante, muito utilizada em material forense (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas no experimento 65 aves nativas de 18 diferentes espécies da família Psittacidae, previamente sexadas por PCR a partir de amostras sanguíneas, e que se encontravam no Criadouro Conservacionista Rancho das Hortências, no Município de Tapiraí, Estado de São Paulo e no Parque Zoológico de São Paulo/SP. Todos os animais possuíam identificação, sendo padronizado uma anilha na pata esquerda para fêmeas e na pata direita para machos. Algumas aves também foram identificadas por características físicas individuais.

As espécies estudadas foram: Aratinga-de-testa-vermelha (*Aratinga solstitialis auricapilla*); Papagaio-do-mangue (*Amazona amazonica*); Maitaca-de-maximiliano (*Pionus maximiliani*); Periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalmus*); Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*); Papagaio-papa-cacau (*Amazona festiva*); Maracanã-verdadeira (*Propyrrhura maracana*); Jandaia-sol (*Aratinga solstitialis jandaya*); Papagaio-galego (*Amazona xanthops*); Maitaca-de-cabeça-azul (*Pionus menstruus*); Periquito-estrela (*Aratinga aurea*); Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*); Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*); Papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*); Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*); Papagaio-campeiro (*Amazona ochrocephala*); Periquito-da-caatinga (*Aratinga cactorum*) e Periquito-rico (*Brutogeris tircica*).

As excretas cloacais dos 15 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva* - 9 machos e 6 fêmeas) do Parque Zoológico de São Paulo foram colhidas com o intuito de aumentar o número de aves estudadas.

Em Tapiraí, as amostras foram colhidas em Março e principalmente em Novembro de 2001 (Figura 1). Nesse criadouro, segundo os poucos registros de nascimentos, a época reprodutiva das aves engloba esse período, apesar da reprodução em papagaios do gênero amazona ocorrer nos meses de Setembro à Janeiro. Cada ave sofreu um acompanhamento individual exclusivo e as excretas cloacais foram colhidas após a visualização da defecação. Na porção inferior de cada viveiro foi colocada uma lona plástica para a retenção das excretas, que foram colhidas com o auxílio de espátulas plásticas limpas em álcool etílico 96% e descartadas após o uso. A colheita era interrompida quando se atingia um volume suficiente para cada animal. No Zoológico, as colheitas se concentraram nos meses de Dezembro de 2001 (maioria das amostras), Março e Julho de 2002 (Figura 2). Como as aves estavam individualizadas em gaiolas, a colheita foi realizada sem a necessidade da observação da defecação. No grupo das aves do Zoológico, um dos objetivos foi comparar as mensurações dos metabólitos hormonais em relação à época reprodutiva com a época não reprodutiva. Também se comparou o grupo das aves do Zoológico com o grupo das aves do Criadouro, já que ambas estavam sob diferentes condições ambientais e de manejo.

Figura 1 – Colheita das excretas cloacais de psitacídeos no criadouro Conservacionista Rancho das Hortências. Tapiraí/SP, 2001.

Figura 2 – Colheita das excretas cloacais de psitacídeos no Parque Zoológico de São Paulo/SP, 2001.

As excretas foram acondicionadas em tubos de polipropileno KMA de 4 ml com tampas de rosca, foram devidamente identificados e posteriormente congeladas em um prazo máximo de 12h após a colheita a uma temperatura de -20°C (Figura 3).

Figura 3 – Amostra de excretas cloacais de psitacídeos armazenadas a -20°C .

3.2 RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

3.2.1 Solubilização dos Metabólitos

No LDH, as amostras foram liofilizadas em centrífuga refrigerada a vácuo ("speed-vac") e armazenadas à temperatura de -20°C até o momento da solubilização. Isso se deve à necessidade de se retirar a influência da presença da água nas amostras, em função da variedade das espécies estudadas, e aumentar o tempo de conservação. As excretas cloacais apresentaram uma umidade de aproximadamente 80% do seu peso total. Foram então dissolvidas em Tampão Fosfato Salino (PBS) com

gelatina (0,0874 g de fosfato de sódio dibásico $12 \text{ H}_2\text{O}$; 0,0216 g de fosfato de sódio monobásico $1 \text{ H}_2\text{O}$; 0,004 g de azida de sódio; 0,036 g de cloreto de sódio; 0,004 g de agarose; 4 ml de água ultrapura; pH 7,0) em uma relação peso:volume de 1:8 (em média 0,5 g para 4 ml) e maceradas com o uso de um bastão de vidro, evitando-se a contaminação entre as amostras. Após esse processo, foram agitadas no “vortex” por 1 minuto e levadas para um homogeneizador de amostras sanguíneas, onde ficaram nesse processo “overnight”. Foram então agitadas no “vortex” por mais 1 minuto e centrifugadas a $1.155 \times g$ por 20 minutos a 5°C . Reservou-se o sobrenadante e descartou-se o “pelete”. O sobrenadante foi novamente centrifugado ($1.155 \times g$ por 20 minutos a 5°C), evitando-se assim partículas que tenham persistido à primeira centrifugação e então foi procedida a mensuração.

3.2.1.1 Testes de Diluição e de Extração

Realizaram-se testes para a determinação da diluição mais apropriada para que os resultados das mensurações se concentrassem entre os limites superior e inferior da curva padrão dos “kits” comerciais. As diluições testadas foram 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, em relação ao peso:volume. Os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:8.

Também foram testadas diferentes técnicas de extração com solventes orgânicos. No início, utilizou-se o método de extração que emprega metanol/etanol (BROWN et al., 1994), com resultados nada animadores. Ao final do experimento,

realizou-se um outro protocolo de extração para andrógenos utilizando-se uma solução com Tampão Fosfato Salino 0.1 M (pH: 7,0) 0,1% de Gelatina:Álcool Etilico absoluto (4:1) nas amostras colhidas no Zoológico de São Paulo.

3.2.2 Mensuração dos Metabólitos

Inicialmente, foi testado para a mensuração dos andrógenos o “kit” comercial Testosterona fase-sólida (DPC - Diagnostic Products Corporation. 5700 West 96th Street, Los Angeles, CA 90045-5597). As porcentagens de reações cruzadas desse “kit” são de 100% para Testosterona, 3,3% para 5 α -Dihidrotestosterona, 19% para Nortestosterona, 2% para 19-Hidroxiandrostenediona e menor que 1,7% para os demais metabólitos, com uma sensibilidade de 4 ng/dL. Em um segundo momento, testou-se o “kit” comercial para Dihidroepiandrosterona Sulfato – fase sólida (CPEI, Rua Dr. Martinico Prado, 26, Conj. 125 – CEP 01226-000, Vila Buarque, São Paulo/SP), igualmente para a mensuração dos andrógenos. As porcentagens de reações cruzadas desse “kit” são de 100% para Dihidroepiandrosterona Sulfato, 95% para Dihidroepiandrosterona, 65% para Dihidroepiandrosterona glucoronida, 6,8% para Androsterona, 5,7% para Androsterona Sulfato, 24,2% para Epiandrosterona e menor que 1,1% para os demais metabólitos, com uma sensibilidade de 6 μ g/100ml.

Para os estrógenos, foi testado o “kit” comercial para Estradiol 3^o Geração duplo-anticorpo (DSL – Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Corporate Headquarters, 445 Medical Center Blvd., Webster, Texas 77598-4217, USA), com porcentagens de

reações cruzadas de 100% 17 β - estradiol, 6,9% para Estrona, e menor que 1% para os demais metabólitos, com uma sensibilidade de 0,6pg/ml.

Como as mensurações realizadas com os “kits” anteriormente relacionados não surtiram o efeito desejado, os metabólitos dos estrógenos e andrógenos foram efetivamente mensurados em duplicata por meio de “kits” comerciais de radioimunoensaio para:

1) Testosterona - fase sólida (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostic Division, Costa Mesa, CA 92626) com porcentagem de reações cruzadas de 100% para testosterona; 7,8% para 5 α -Dihidrotestosterona; 2% para 11-Oxitestosterona; 2,2% para 5 α -Androsterona-3 β , 17 β -diol e menor que 1% para os demais metabólitos, com uma sensibilidade de 0,2 ng/ml;

2) Estrógenos Totais – duplo anticorpo (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostic Division, Costa Mesa, CA 92626) com porcentagens de reações cruzadas de 100% para 17 β - Estradiol e Estrona, 9% para Estriol, 7% para 17 α -Estradiol, 2,55% para Equilina e menor que 0,01% para os demais metabólitos, com uma sensibilidade de 5,0 pg/ml. O protocolo desse “kit” indica a necessidade de efetuar uma extração orgânica com acetato etílico:hexano (3:2) previamente ao ensaio.

Os ensaios foram realizados segundo o protocolo do fabricante, utilizando-se como elemento traçador ¹²⁵I (Anexo E).

3.2.3 Validação dos Ensaios

Como os “kits” comerciais são desenvolvidos para a mensuração de hormônios no plasma sanguíneo humano, há a necessidade da realização da validação desses para a mensuração dos metabólitos fecais desejados.

O primeiro método de validação é conhecido como Curva de Paralelismo e indica se os metabólitos do extrato estão interagindo com o anticorpo do kit de forma similar ao hormônio usado como padrão. A técnica consiste em realizar a depleção hormonal (Anexo D) de um “pool” de amostras e adiciona-se nessa matriz valores conhecidos de hormônio padrão com diluições que se aproximam dos pontos da curva padrão do ensaio. Com essas diluições, deve-se construir uma curva que terá os seus valores correlacionados aos da curva padrão do “kit”. Os resultados devem ser interpolados e analisados por Regressão Simples (programa estatístico StatView, n° serial 04550).

O outro método de validação é conhecido como Curva Dose-Resposta, e indica se o material extraído está interferindo na ligação antígeno-anticorpo. O método utiliza uma amostra previamente mensurada e com valores próximos ao limite inferior da curva padrão. Adiciona-se a essa amostra valores conhecidos de hormônio (geralmente os padrões) e realiza-se então a mensuração hormonal. Espera-se que o resultado expresse a soma do valor hormonal que foi adicionado com o valor anteriormente mensurado. Os resultados devem ser interpolados e analisados por Regressão Simples (programa estatístico StatView, n° serial 04550).

Os controles intra-ensaio e inter-ensaio também foram realizados. O primeiro indica se o tempo de realização do ensaio está interferindo quantitativamente nas ligações antígeno-anticorpo e o segundo indica se as diferentes baterias de amostras mensuradas estão sofrendo ação pelo decaimento da radioatividade do hormônio marcado ou pelo decréscimo da validade dos componentes do “kit”.

O Índice de Recuperação dos metabólitos nas excretas não foi realizado, pois o interesse era muito mais qualitativo do que quantitativo.

Já a Validação Fisiológica reflete os resultados mensurados com as condições fisiológicas em que se encontram os animais.

3.3 DETERMINAÇÃO DO SEXO POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

3.3.1 Padronização da extração do DNA genômico

Na padronização da extração do DNA genômico das excretas cloacais, foram utilizados os “kits” comerciais QIAmp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Inc., 28159 Avenue Stanford, Valencia, CA 91355) (Anexo A), Dynabeads® DNA DIRECT™ UNIVERSAL (DynaL Biotech ASA, P.O. Box 114 Smestad, N-0309 Oslo, Norway) (Anexo B) e a resina Chelex® 100 (Anexo C), com pequenas alterações no protocolo descrito em literatura para a extração de DNA em sangue (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991).

Também foram adicionados às amostras aproximadamente 600ng de DNA de ave e 2-10 μ l de sangue de galinha (2 μ l para 10 μ l de NaOH em 200 μ l de “dynabeads”; 10 μ l – QIAmp e Chelex). O DNA foi extraído com os mesmos protocolos.

As amostras utilizadas foram as mesmas colhidas dos papagaios-verdadeiros do Zoológico de São Paulo. Essas aves estavam previamente sexadas. Empregou-se para cada protocolo, 5 amostras de machos e 5 amostras de fêmeas.

Nove amostras de excretas cloacais de galinha que não sofreram congelamento também foram empregadas na extração com “kit” Dynabeads, QIAmp e Chelex 100 (3 amostras por protocolo).

3.3.2 Detecção do DNA Extraído

Após a realização das extrações, o DNA total extraído foi quantificado em gel de agarose. Para a preparação do gel, a agarose, na concentração de 0,8% (p/v), foi fundida em tampão TBE 1x em forno microondas, resfriada até aproximadamente 50°C e adicionada de brometo de etídeo na concentração final de 0,5 μ l/mL. Amostras de 3 μ l de cada minipreparação de DNA foram adicionadas de 1 μ l do volume de tampão de amostra de DNA 6x concentrado (30% v/v glicerol; 0,25% p/v azul de bromofenol; 0,6% p/v SDS; 60 mM EDTA pH 8,0). Como referência para a análise da quantidade e qualidade de DNA, foram aplicadas no gel 2,4 μ l de marcador de massa molecular “High DNA Molecular Mass Ladder” (Life Technologies). As amostras foram aquecidas a

65°C por 5 minutos, colocadas em gelo e em seguida aplicadas no gel. A corrida foi realizada em TBE 1x com brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL e sob tensão constante de 96-97 V (cuba de eletroforese Horizon 11-14), até o azul de bromofenol atingir o final do gel (30 minutos). O gel foi analisado sob luz UV e fotografado (Chemillmager 4400- Low light imaging system).

As concentrações de DNA e as razões das leituras das absorbâncias a 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}) foram feitas em espectrofotômetro GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech). Razões com valores de absorbância abaixo de 1,7 indicam uma grande quantidade de proteína na amostra, o que é prejudicial para a amplificação do DNA. A concentração total de DNA ideal para a realização da sexagem é de 300-500ng.

3.3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Somente foram amplificadas as amostras onde houve a detecção do DNA total. Para a reação de PCR foram utilizados cerca de 200-400 ng de DNA, 25 pmoles de cada um dos “primers”, 200 µM de dNTP, 1 unidade de Taq polimerase (Amersham Pharmacia), 1x Tampão da enzima, em um volume final de 20,0 µL. A reação foi feita através de desnaturação a 95°C por 5 minutos; seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 40 segundos a 40°C e 40 segundos a 72°C, finalizando com extensão a 72°C por 7 minutos (termociclador PTC-100 MJ Research, Inc.).

A detecção do DNA amplificado foi realizada em gel de Agarose 3%. A corrida do DNA foi realizada sob tensão constante de 100 V (cuba de eletroforese Horizon 11-14), até o azul de bromofenol atingir o final do gel (2h e 30 minutos). Como referência para a análise das bandas obtidas, foi utilizado o marcador de massa molecular 100pb “High DNA Molecular Mass Ladder” (Life Technologies - Grand Island, NY, EUA).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do aplicativo Guided Data Analysis do programa The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000, n° serial GTA-31722-232).

Esses foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. O próprio aplicativo emprega vários tipos de testes estatísticos com essa finalidade, sem especificar qual foi utilizado. Caso não obedecessem a estas premissas, eram transformados (logarítmo na base 10 - $\log_{10}X$; Raiz quadrada - $\sqrt{X}$; Inverso da Raiz Quadrada - $1/\sqrt{X}$; Inverso do valor - $1/X$) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os desvios padrões dos dados originais e o nível de significância dos dados transformados, quando necessária a transformação. Os testes foram fixados em $p < 0,05$ para a rejeição da hipótese de nulidade.

Na análise dos dados da comparação entre os machos e as fêmeas do grupo composto pelos animais do Zoológico e do Criadouro, entre os machos do grupo do Criadouro e os machos do grupo do Zoológico, entre os machos e as fêmeas do grupo do Criadouro, as variáveis Estrógenos, Andrógenos e a Razão (estrógeno/andrógeno) não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo transformados para Logarítmo na base 10, 1/Raiz Quadrada e Raiz Quadrada, respectivamente, para que a normalidade fosse obtida. Estas variáveis foram então submetidas à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Na análise dos dados da comparação entre as fêmeas do grupo do Criadouro e as fêmeas do grupo do Zoológico, somente as variáveis Estrógenos e Andrógenos não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo transformados para Logarítmo na base 10, para que a normalidade fosse obtida. Estas variáveis foram então submetidas à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Na análise dos dados da comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico, somente a variável Andrógeno não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo transformados para 1/andrógeno para que a normalidade fosse obtida. Esta variável foi então submetida à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Na análise dos dados da comparação entre a época reprodutiva e a época não reprodutiva dos machos do grupo do Zoológico, somente as variáveis Estrógenos e Andrógenos não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo então transformados para Logarítmo na base 10 e 1/Andrógeno, respectivamente, para que a normalidade

fosse obtida. Estas variáveis foram então submetidas à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos

Na análise dos dados da comparação entre a época reprodutiva e a época não reprodutiva das fêmeas do grupo do Zoológico, somente a variável Andrógeno não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo transformados para Logarítmo na base 10 para que a normalidade fosse obtida. Esta variável foi então submetida à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Na análise dos dados da comparação entre as duas técnicas de extração (PBS; PBS:Álcool Etílico) de metabólitos no grupo formado pelos machos do grupo do Zoológico, as variáveis Estrógeno, Andrógeno e a Razão E/T não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo transformados para Logarítmo na base 10 para todas, para que a normalidade fosse obtida. Estas variáveis foram então submetidas à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Na análise dos dados da comparação entre as duas técnicas de extração de metabólitos (PBS; PBS:Álcool Etílico) no grupo formado pelas fêmeas do grupo do Zoológico, somente as variáveis Andrógeno e a Razão E/T não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo transformados para Logarítmo na base 10 para ambas, para que a normalidade fosse obtida. Estas variáveis foram então submetidas à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Na análise dos dados da comparação entre machos e fêmeas dentro da técnicas de extração de metabólitos com PBS:Álcool Etílico no grupo formado pelas aves do Zoológico, somente as variáveis Andrógeno e a Razão E/T não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo transformados para Logarítmo na base 10 para

ambas, para que a normalidade fosse obtida. Estas variáveis foram então submetidas à análise de variância ONEWAY ANOVA, para verificar a determinação do sexo em psitacídeos.

Foi realizado também o cálculo com o intervalo de confiança (95%) para a média das aves do grupo do Criadouro com os seus dados transformados (Raiz Quadrada da Razão E/A, Logarítmo na base 10 do Estrógeno, 1/Raiz Quadrada do Andrógeno) para a verificação do sexo dos animais.

RESULTADOS

---

4 RESULTADOS

4.1 RADIOIMUNOENSAIOS (RIE)

Na **Análise de Interação** dos valores transformados obtidos da **Razão** entre os estrógenos e os andrógenos mensurados dos **machos** e das **fêmeas** de psitacídeos, juntando no mesmo grupo os animais do grupo do **Criadouro** com os animais do grupo do **Zoológico** (Anexo F, Tabela 1), encontrou-se diferença significativa nos dados quanto aos fatores Local e Sexo, com $p=0,0008$ e $p<0,0001$ respectivamente. Em relação ao fator interação entre o Local e o Sexo, não se encontrou diferença significativa nos dados ($p=0,3757$). Analisando-se especificamente o fator **Razão** entre andrógenos e estrógenos, em uma amostra de 29 indivíduos fêmeas e 36 indivíduos machos, a média e o desvio-padrão foram respectivamente $1139,96\pm596,85$ e $509,01\pm501,24$, com $p<0,0001$.

Na **Análise de Interação** dos valores transformados obtidos da mensuração dos **Estrógenos** dos **machos** e das **fêmeas** de psitacídeos, juntando no mesmo grupo os animais do grupo do **Criadouro** com os animais do grupo do **Zoológico** (Anexo F, Tabela 1), não se encontrou diferença significativa nos dados quanto aos fatores Local ($p=0,4396$), Sexo ($p=0,7480$) e na interação entre o Local e o Sexo ($p=0,8116$). Analisando-se especificamente o fator **Estrógeno** em uma amostra de 29 indivíduos fêmeas e 36 indivíduos machos, a média (pg/ g fezes) e o desvio-padrão foram

respectivamente $1001,54 \pm 730,34$ e $1066,48 \pm 1082,45$, com $p=0,8475$. O nível de significância foi diferente do anterior porque com a análise específica desse fator, não são perdidos muitos graus de liberdade.

Na **Análise de Interação** dos valores transformados obtidos dos **Andrógenos** dos **machos** e das **fêmeas** de psitacídeos, juntando no mesmo grupo os animais do grupo do **Criadouro** com o animais do grupo do **Zoológico** (Anexo F, Tabela 1), encontrou-se diferença significativa nos dados quanto ao fator Sexo, com $p=0,0066$. Em relação aos fatores Local e interação entre o Local e o Sexo, não houve diferença significativa nos dados, com $p=0,1065$ e $p=0,3484$, respectivamente. Analisando-se especificamente o fator **Andrógeno**, em uma amostra de 29 indivíduos fêmeas e 36 indivíduos machos, a média (ng/ g fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1,20 \pm 1,39$ e $23,13 \pm 70,50$ com $p=0,0003$. O nível de significância foi diferente do anterior porque com a análise específica desse fator, não são perdidos muitos graus de liberdade.

Na comparação entre as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** com as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo G, Tabela 1), usando-se os valores do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 23 animais do Criadouro e 6 animais do Zoológico, a média e o desvio-padrão foram respectivamente $1024,27 \pm 506,76$ e $1583,42 \pm 753,25$, com $p=0,0385$.

Na comparação entre as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** com as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo G, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 23 animais do

Criadouro e 6 animais do Zoológico, a média (pg/ g fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $997,23 \pm 807,94$ e $1018,04 \pm 338,25$, com $p=0,4720$.

Na comparação entre as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** com as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo G, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 23 animais do Criadouro e 6 animais do Zoológico, a média e o desvio-padrão (ng / g fezes) foram respectivamente $1,19 \pm 1,33$ e $1,21 \pm 1,76$, com $p=0,2005$.

Na comparação entre os **machos** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** com os **machos** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo H, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 27 animais do Criadouro e 9 animais do Zoológico, a média e o desvio-padrão foram respectivamente $344,51 \pm 306,30$ e $1002,51 \pm 654,95$, com $p=0,0026$.

Na comparação entre os **machos** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** com os **machos** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo H, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 27 animais do Criadouro e 9 animais do Zoológico, a média (pg / g fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1114,70 \pm 1237,18$ e $921,79 \pm 346,74$ com $p=0,6968$.

Na comparação entre os **machos** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** com os **machos** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo H, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 27 animais do Criadouro e 9 animais do Zoológico, a média (ng/ g fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $29,26 \pm 80,64$ e $4,72 \pm 10,04$ com $p=0,0995$.

Na comparação entre os **machos** e as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo I, Tabela 1), usando-se os dados do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 6 fêmeas e 9 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1583,42 \pm 753,25$ e $1002,51 \pm 654,95$, com $p=0,1365$.

Na comparação entre os **machos** e as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo I, Tabela 1), usando-se os dados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 6 fêmeas e 9 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1018,04 \pm 338,25$ e $921,79 \pm 346,74$, com $p=0,5368$.

Na comparação entre os **machos** e as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Zoológico** (Anexo I, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 6 fêmeas e 9 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1,21 \pm 1,76$ e $4,72 \pm 10,04$, com $p=0,2105$.

Na comparação entre os **machos** e as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** (Anexo I, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 23 fêmeas e 27 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1024,27 \pm 506,76$ e $344,51 \pm 306,30$, com $p<0,0001$.

Na comparação entre os **machos** e as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** (Anexo I, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 23 fêmeas e 27 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $997,23 \pm 807,94$ e $1114,70 \pm 1237,18$, com $p=0,9364$.

Na comparação entre os **machos** e as **fêmeas** de psitacídeos do grupo do **Criadouro** (Anexo I, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator

Andrógeno, em uma amostra de 23 fêmeas e 27 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1,19 \pm 1,33$ e $29,26 \pm 80,64$, com $p=0,0002$.

Na comparação entre a **época não reprodutiva** e a **época reprodutiva** dos machos das aves do grupo do Zoológico (Anexo J, Tabela 1), usando-se os valores do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 9 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1199,89 \pm 916,11$ e $1002,51 \pm 654,95$, com $p=0,6062$.

Na comparação entre a **época não reprodutiva** e a **época reprodutiva** dos machos das aves do grupo do Zoológico (Anexo J, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 9 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $888,32 \pm 263,16$ e $921,79 \pm 346,74$, com $p=0,9241$.

Na comparação entre a **época não reprodutiva** e a **época reprodutiva** dos machos das aves do grupo do Zoológico (Anexo J, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 9 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $2,05 \pm 2,30$ e $4,72 \pm 10,04$, com $p=0,6372$.

Na comparação entre a **época não reprodutiva** e a **época reprodutiva** das fêmeas das aves do grupo do Zoológico (Anexo J, Tabela 2), usando-se os valores do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 6 fêmeas, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $939,39 \pm 710,54$ e $1583,42 \pm 753,25$, com $p=0,1586$.

Na comparação entre a **época não reprodutiva** e a **época reprodutiva** das fêmeas das aves do grupo do Zoológico (Anexo J, Tabela 2), usando-se os valores do

fator **Estrógeno**, em uma amostra de 6 fêmeas, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1185,42 \pm 221,93$ e $1018,04 \pm 338,25$, com $p=0,3347$.

Na comparação entre a **época não reprodutiva** e a **época reprodutiva** das fêmeas das aves do grupo do **Zoológico** (Anexo J, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 6 fêmeas, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $2,35 \pm 2,04$ e $1,21 \pm 1,76$, com $p=0,2264$.

Na comparação entre os dois **métodos de extração** (PBS; PBS:Álcool Etílico) com amostras de **machos** do grupo do **Zoológico** (Anexo L, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 9 machos com o método de extração PBS e 8 machos com o método de extração PBS:Álcool Etílico (4:1), a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1002,51 \pm 654,95$ e $119,01 \pm 121,91$, com $p=0,003$.

Na comparação entre os dois **métodos de extração** (PBS; PBS:Álcool Etílico) com amostras de **machos** do grupo do **Zoológico** (Anexo L, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 9 machos com o método de extração PBS e 8 machos com o método de extração PBS:Álcool Etílico (4:1), a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $921,79 \pm 346,74$ e $840,29 \pm 262,83$, com $p=0,6478$.

Na comparação entre os dois **métodos de extração** (PBS; PBS:Álcool Etílico) com amostras de **machos** do grupo do **Zoológico** (Anexo L, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 9 machos com o método de extração PBS e 8 machos com o método de extração PBS:Álcool Etílico

(4:1), a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $4,72 \pm 10,04$ e $20,90 \pm 18,79$, com $p=0,0047$.

Na comparação entre os dois métodos de extração (PBS; PBS:Álcool Etílico) com amostras de fêmeas do grupo do Zoológico (Anexo L, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator Razão dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 6 fêmeas com o método de extração PBS e 6 fêmeas com o método de extração PBS:Álcool Etílico (4:1), a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1583,43 \pm 753,26$ e $272,34 \pm 227,68$, com $p=0,0032$.

Na comparação entre os dois métodos de extração (PBS; PBS:Álcool Etílico) (PBS; PBS:Álcool Etílico) com amostras de fêmeas do grupo do Zoológico (Anexo L, Tabela 2), usando-se os valores do fator Estrógeno, em uma amostra de 6 fêmeas com o método de extração PBS e 6 fêmeas com o método de extração PBS:Álcool Etílico (4:1), a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram iguais para ambos ($1018,04 \pm 338,25$, com $p=1,0$).

Na comparação entre os dois métodos de extração (PBS; PBS:Álcool Etílico) com amostras de fêmeas do grupo do Zoológico (Anexo L, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator Andrógeno, em uma amostra de 6 fêmeas com o método de extração PBS e 6 fêmeas com o método de extração PBS:Álcool Etílico (4:1), a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1,21 \pm 1,76$ e $6,63 \pm 4,57$, com $p=0,0047$.

Na comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico dentro do método de extração PBS:Álcool Etílico (4:1) (Anexo M, Tabela 1), usando-se os valores transformados do fator Razão dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra

de 6 fêmeas e 8 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $272,34 \pm 227,68$ e $119,011 \pm 121,91$, com $p=0,1183$.

Na comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico dentro do método de extração **PBS:Álcool Etílico (4:1)** (Anexo M, Tabela 1), usando-se os valores do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 6 fêmeas e 8 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $1018,04 \pm 338,25$ e $840,29 \pm 262,83$, com $p=0,2749$.

Na comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico dentro do método de extração **PBS:Álcool Etílico (4:1)** (Anexo M, Tabela 1), usando-se os valores do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 6 fêmeas e 8 machos, a média (g/fezes) e o desvio-padrão foram respectivamente $6,63 \pm 4,57$ e $20,90 \pm 18,79$, com $p=0,0914$.

No cálculo com o **Intervalo de Confiança (95%) para a Média** dos dados das aves do grupo do **Criadouro** (Anexo M, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator **Razão** dos estrógenos e andrógenos, em uma amostra de 23 fêmeas, a média e o desvio padrão foi de $31,01 \pm 8,13$, o limite inferior foi de 27,49 e 34,52 para o limite superior e o $p < 0,0001$. Em uma amostra de 27 machos, a média e o desvio padrão foi de $16,52 \pm 8,65$, o limite inferior foi de 13,10 e 19,94 para o limite superior e o $p < 0,0001$.

No cálculo com o **Intervalo de Confiança (95%) para a Média** dos dados das aves do grupo do **Criadouro** (Anexo M, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator **Estrógeno**, em uma amostra de 23 fêmeas, a média e o desvio padrão foi de $6,68 \pm 0,66$, o limite inferior foi de 6,39 e 6,96 para o limite superior e o $p < 0,0001$. Em

uma amostra de 27 machos, a média e o desvio padrão foi de $6,66 \pm 0,80$, o limite inferior foi de 6,34 e 6,98 para o limite superior e o $p < 0,0001$.

No cálculo com o **Intervalo de Confiança (95%) para a Média** dos dados das aves do grupo do **Criadouro** (Anexo M, Tabela 2), usando-se os valores transformados do fator **Andrógeno**, em uma amostra de 23 fêmeas, a média e o desvio padrão foi de $0,85 \pm 0,17$, o limite inferior foi de 0,78 e 0,93 para o limite superior e o $p < 0,0001$. Em uma amostra de 27 machos, a média e o desvio padrão foi de $0,55 \pm 0,32$, o limite inferior foi de 0,43 e 0,68 para o limite superior e o $p < 0,0001$.

O índice de acerto na determinação do sexo das aves do grupo do Criadouro foi de 70% quando se utilizou o intervalo de confiança com os valores transformados do fator Andrógeno, enquanto que o índice de acerto quando se utilizou o intervalo de confiança com os valores transformados do fator Razão dos estrógenos e andrógenos foram de 68% (Quadro 1). Esse recurso foi utilizado porque os dados não seguiram uma distribuição normal.

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (g/fezes)	ANDRÓGENO (g/fezes)	RAZÃO E/A (g/fezes)	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)	RAZÃO E/A (Raiz Quadrada)
SUSPENSO 2	Aratinga- de-testa- vermelha	macho	585,34	11,33	51,69	0,297	7,189
SUSPENSO 5	Papagaio- do-mangue	macho	1371,4	17,93	76,49	0,236	8,745
SUSPENSO 5	Papagaio- do-mangue	fêmea	554,39	0,49	1131,41	1,428	33,638

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (pg/ g fezes)	ANDRÓGENO (ng/ g fezes)	RAZÃO E/A	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)	RAZÃO E/A (Raiz Quadrada)
SUSPENSO 18	Papagaio- do-mangue	macho	397,96	0,82	485,32	1,104	22,03
SUSPENSO 18	Papagaio- do-mangue	fêmea	908,91	0,52	1747,90	1,386	41,808
SUSPENSO 6	Maitaca-de- maximiliano	macho	2023,96	2,55	793,70	0,626	28,162
SUSPENSO 27	Maitaca-de- maximiliano	fêmea	2225,7	1,3	1712,08	0,877	41,377
SUSPENSO 27	Maitaca-de- maximiliano	fêmea	3797,4	6,61	574,49	0,388	23,969
SUSPENSO 32	Maitaca-de- maximiliano	macho	1328,93	14,5	91,65	0,262	9,573
SUSPENSO 32	Maitaca-de- maximiliano	fêmea	1094,54	1,41	776,27	0,842	27,862
SUSPENSO 7	Periquitão- maracanã	fêmea	491,98	0,55	894,51	1,348	29,908
SUSPENSO 22	Periquitão- maracanã	fêmea	759,13	2,61	290,854	0,618	17,054
SUSPENSO 48	Periquitão- maracanã	macho	679,98	0,87	781,59	1,072	27,957
SUSPENSO 48	Periquitão- maracanã	fêmea	415,42	0,5	830,84	1,414	28,824

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (pg/ g fezes)	ANDRÓGENO (ng/g fezes)	RAZÃO E/A	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)	RAZÃO E/A (Raiz Quadrada)
SUSPENSO 14	Papagaio-verdadeiro	macho	975,39	5,8	168,17	0,415	12,968
SUSPENSO 23	Papagaio-verdadeiro	macho	1737,94	259,39	6,7	0,062	2,588
SUSPENSO 23	Papagaio-verdadeiro	macho	6113,11	347,31	17,6	0,053	4,195
SUSPENSO 10	Papagaio-papa-cacau	macho	3507,57	12,92	271,42	0,278	16,475
SUSPENSO 57	Papagaio-papa-cacau	fêmea	209,38	0,51	410,55	1,40	20,262
SUSPENSO 11	Maracanã-verdadeira	fêmea	626,4	0,52	1204,61	1,386	34,707
VIVEIRO PEQUENO	Maracanã-verdadeira	macho	672,5	0,76	884,88	1,147	29,747
SUSPENSO 15	Jandaia-sol	fêmea	287,5	0,72	396,55	1,178	19,914
SUSPENSO 19	Jandaia-sol	macho	1396,58	6,15	227,09	0,403	15,07
SUSPENSO 19	Jandaia-sol	fêmea	940,34	0,6	1567,23	1,290	39,588
SUSPENSO 16	Papagaio-galego	fêmea	660,06	0,65	1016,31	1,240	31,88

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (pg/ g fezes)	ANDRÓGENO (ng/g fezes)	RAZÃO E/A	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)	RAZÃO E/A (Raiz Quadrada)
SUSPENSO 16	Papagaio- galego	fêmea	995,74	0,9	1106,38	1,054	33,262
SUSPENSO 34	Papagaio- galego	macho	291,28	0,52	560,15	1,386	23,667
SUSPENSO 34	Papagaio- galego	fêmea	518,62	0,87	596,11	1,072	24,415
SUSPENSO 20	Maitaca-de- cabeça-azul	macho	2089,99	34,2	61,11	0,170	7,817
SUSPENSO 35	Maitaca-de- cabeça-azul	macho	283,22	1,13	250,64	0,940	15,832
SUSPENSO 35	Maitaca-de- cabeça-azul	macho	202,26	0,52	388,96	1,386	19,722
SUSPENSO 35	Maitaca-de- cabeça-azul	fêmea	921,07	0,79	1165,91	1,125	34,145
SUSPENSO 24	Periquito- estrela	fêmea	1796,94	1,04	1727,83	0,980	41,567
GAIOLA 5	Periquito- estrela	macho	243,48	0,51	477,41	1,400	21,85
SUSPENSO PEQUENO 8	Periquito- estrela	fêmea	695,83	2,52	276,123	0,629	16,617
SUSPENSO 28	Maracanã- nobre	macho	716,16	3,61	198,55	0,526	14,091

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (pg/g fezes)	ANDRÓGENO (ng/g fezes)	RAZÃO E/A	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)	RAZÃO E/A (Raiz Quadrada)
SUSPENSO 37	Maracanã-nobre	fêmea	2124	2,0	1062	0,707	32,588
SUSPENSO 29	Papagaio-de-cara-roxa	macho	771,33	6,69	115,3	0,386	10,738
SUSPENSO 45	Papagaio-chauá	macho	818,93	5,11	160,26	0,442	12,659
SUSPENSO 45	Papagaio-chauá	fêmea	1123,63	0,51	2203,1	1,4	46,938
SUSPENSO 46	Papagaio-de-peito-roxo	macho	529,37	1,07	494,74	0,966	22,243
SUSPENSO 46	Papagaio-de-peito-roxo	macho	462,93	45,95	10,07	0,147	3,173
SUSPENSO 46	Papagaio-de-peito-roxo	macho	557,41	3,73	149,24	0,517	12,216
SUSPENSO 49	Papagaio-de-peito-roxo	macho	549,49	0,52	1056,71	1,386	32,507
SUSPENSO 49	Papagaio-de-peito-roxo	macho	643,94	4,67	137,89	0,462	11,743
SUSPENSO 54	Papagaio-campeiro	macho	570,51	0,94	606,92	1,031	24,636
SUSPENSO 54	Papagaio-campeiro	fêmea	488,85	0,5	977,7	1,414	31,268

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (pg/g fezes)	ANDRÓGENO (ng/g fezes)	RAZÃO E/A	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)	RAZÃO E/A (Raiz Quadrada)
SUSPENSO PEQUENO 1	Periquito- da-catinga	fêmea	745,58	0,72	1035,53	1,178	32,18
GAIOLA 3	Periquito- rico	macho	575,97	0,74	778,34	1,162	27,899
GAIOLA 4	Periquito- rico	fêmea	554,98	0,65	853,81	1,240	29,22

QUADRO 1 – Relação de psitacídeos estudados com os respectivos resultados da mensuração dos metabólitos hormonais com os valores não transformados e transformados, em g/fezes, sendo que a cor verde indica a confirmação do sexo, a cor vermelha indica erro na confirmação do sexo e a cor azul indica a incapacidade na confirmação do sexo. São Paulo, 2002.

4.2 VALIDAÇÃO DOS “KITS” DE RADIOIMUNOENSAIO

4.2.1 Testosterona

A validação do “kit” para radioimunoensaio Testosterona - fase sólida (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostic Division, Costa Mesa, CA 92626) foi realizado utilizando-se a Curva Dose-Resposta de amostras sem depleção de metabólitos hormonais e utilizando-se a Curva de Paralelismo de amostras cujo metabólitos foram depletados. O Coeficiente de Regressão (curva padrão x curva da amostra) para a

curva Dose-Resposta foi de 0,974 ($y = 4,588 + 0,699 \cdot x$; $R^2 = 0,974$), enquanto que esse mesmo índice para a curva de Paralelismo foi de 0,989 ($y = 3,507 + 1,01 \cdot x$; $R^2 = 0,989$).

A média dos controles intra-ensaio (2 baterias de ensaios) foi de 22,5% para o controle baixo e 4,56% para o controle alto. O controle inter-ensaio baixo foi de 2,07% e de 4,55% para o controle inter-ensaio alto. Esses índices não devem ultrapassar a 10%. Com exceção do controle inter-ensaio baixo, que ficou um pouco acima do limite, a maioria dos índices ficaram dentro dos níveis aceitáveis, validando portanto o ensaio. A média da Sensibilidade foi de 95,9% (dose = 0,05).

4.2.2 Estrógenos Totais

A validação do “kit” para radioimunoensaio Estrógenos Totais – duplo anticorpo (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostic Division, Costa Mesa, CA 92626), foi realizado utilizando-se a Curva de Paralelismo de amostras cujo metabólitos hormonais foram depletados. O Coeficiente de Regressão (curva padrão x curva da amostra) para a curva de Paralelismo foi de 0,986 ($y = 2,95 + 0,997 \cdot x$; $R^2 = 0,986$).

A média dos controles intra-ensaio (4 baterias de ensaios) foi de 9,8% para o controle baixo e 4,0% para o controle alto. O controle inter-ensaio baixo foi de 1,75% e de 1,44% para o controle inter-ensaio alto. Esses índices não devem ultrapassar a 10%. Todos os índices ficaram dentro dos níveis aceitáveis, validando portanto o ensaio. A média da Sensibilidade foi de 91% (dose = 0,64).

Uma medida inovadora que está se tomando no laboratório é evitar a depleção hormonal nos testes da Curva de Paralelismo, pois com a depleção algum elemento

que poderia estar contido na matriz original e que estivesse interagindo com o anticorpo do kit de forma diferente ao hormônio usado como padrão também poderia estar sendo retirado.

A Validação Fisiológica Comportamental foi realizada com os próprios resultados das mensurações, que determinaram as diferenças entre os níveis hormonais dos machos e das fêmeas, e também com a demonstração de casos de dominância entre machos (viveiros n° 46 e 49), onde um indivíduo teve um comportamento de subserviência ao(s) outro(s) macho(s), refletindo tal procedimento nos seus níveis hormonais, que foram semelhantes aos das fêmeas.

4.3 DETERMINAÇÃO DO SEXO POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

4.3.1 Obtenção do DNA

Após a extração do DNA das excretas cloacais, todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% para a avaliação da quantidade do produto obtido. Foram observadas bandas de DNA somente em três amostras. Duas com o protocolo Chelex® 100 e uma com o “kit” QIAmp® DNA Stool Mini Kit.

Na avaliação da quantidade de DNA obtido da extração das amostras onde foram adicionados 600ng de DNA de ave, este se apresentava degradado em 6 amostras extraídas com o “kit” QIAmp. Apenas uma amostra extraída com o “kit”

Dynabeads® DNA DIRECT™ UNIVERSAL apresentou banda. No restante das amostras extraídas, nada foi quantificado.

Todas as amostras onde foram adicionados sangue de galinha e as extrações realizadas com o “kit” QIAmp e com o “kit” Dynabeads tiveram o DNA quantificado em gel de agarose 0,8% (Figuras 4 e 5). Nas amostras extraídas com Chelex, nada foi quantificado.

No caso das amostras de excretas cloacais de galinha que não sofreram congelamento, não houve a quantificação do DNA em nenhuma situação.

Nas amostras onde foram adicionados DNA e sangue, a concentração de DNA ficou abaixo de 0,1 µg/µl e a razão 260/280 ficou abaixo de 1,7. Somente nas amostras que tiveram sangue adicionado e o DNA extraído com o “kit” QIAmp, a média da concentração de DNA (0,38µg/µl) e a média da razão 260/280 (1,89) foram adequadas. No caso das amostras extraídas com o Chelex 100, a média da concentração de DNA foi 0,45µg/µl e a média da razão 260/280 foi 0,778.

Figura 4 - Separação do DNA total em gel de Agarose 0,8% extraído com o QIAmp® DNA Stool Mini Kit de amostras de excretas cloacais de 5 machos e 5 fêmeas de papagaio-verdadeiro do Zoológico de São Paulo, onde se adicionou 10µl de sangue de galinha. São Paulo, 2002.

Figura 5 - Separação do DNA total em gel de Agarose 0,8% extraído com o “kit” Dynabeads® DNA DIRECT™ UNIVERSAL de amostras de excretas cloacais de 5 machos e 5 fêmeas de papagaio-verdadeiro do Zoológico de São Paulo, onde foi adicionado 2µl de sangue de galinha para 10µl de NaOH em 200µl de “dynabeads”. São Paulo, 2002.

4.3.2 Amplificação da Região do DNA ligado ao Gene CHD

Na amplificação dos produtos detectados em gel de Agarose 3%, apenas as amostras onde foram adicionados 10 μ l de sangue de galinha, com o DNA extraído pelo QIAmp® DNA Stool Mini Kit, tiveram o sexo confirmado (Figura 6) com a formação de bandas muito fracas. Uma das bandas ficou clara somente quando visualizada diretamente no gel sob luz UV. Todas as outras amostras onde o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% não apresentaram produtos amplificados com a PCR.

Figura 6 – Amplificação do DNA separado em gel de Agarose 3% das amostras onde se adicionou 10 μ l de sangue de galinha e se extraiu com QIAmp® DNA Stool Mini Kit. Espaço vazio: Controle Negativo. São Paulo, 2002.

5 DISCUSSÃO

5.1 RADIOIMUNOENSAIOS (RIE)

Os resultados das mensurações hormonais por radioimunoensaio indicam que uma série de fatores efetivamente interferem na fisiologia reprodutiva das aves e conseqüentemente na acurácia desse método de determinação do sexo de aves monomórficas. Outros artigos científicos com essa mesma linha de pesquisa fizeram comentários semelhantes (BERCOVITS; CZEKALA; LASLEY, 1978; STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979).

É importante enfatizar o fato de que os dois grupos de aves estudadas encontravam-se em condições completamente distintas. Enquanto que as aves do Criadouro Conservacionista Rancho das Hortências estavam em sua maioria acasaladas e mais adaptadas aos recintos ao ar livre, em consequência do longo período nessa situação, as aves do Parque Zoológico de São Paulo estavam temporariamente individualizadas (Setembro/2001 à Setembro/2002) em gaiolas em um ambiente fechado, sem muita claridade, e submetidas a um experimento que testava a preferência de cada animal a dois tipos de coloração de ração peletizada.

Quando se compararam os machos e as fêmeas considerando um grande grupo formado pelas aves do grupo do Criadouro e pelas aves do grupo do Zoológico, a análise de interação do fator Razão demonstrou diferença significativa quanto ao local ($p=0,0008$) e quanto ao sexo ($p<0,0001$). Na análise de interação do fator Andrógeno,

somente houve diferença significativa quanto ao sexo ($p=0,0003$). Não houve diferença significativa quando analisado o fator Estrógeno quanto ao local e sexo. Também não houve diferença significativa quanto à interação local/sexo nas três situações descritas, ou seja, principalmente os fatores Andrógeno e Razão observados nos diferentes locais se comportaram de maneira diferente, mas condizente com cada situação. Isso fica mais claro quando se percebe que nos dois grupos, o fator Razão foi mais elevado para as fêmeas e o fator Andrógeno foi mais elevado para os machos. A justificativa para esses dados está no fato de que as aves do Criadouro tiveram um comportamento diferente das aves do Zoológico devido a causas multifatoriais, como já foi mencionado anteriormente. Assim sendo, cada grupo foi estudado separadamente.

A dieta é um fator muito importante a ser considerado e que pode ter ação direta sobre os níveis hormonais. Cada grupo continha itens alimentares diferentes. As aves do Criadouro recebiam alimentação farta uma vez ao dia, contendo frutas (maçã, banana, mamão, goiaba, laranja e frutas da época), coco duas vezes por semana, legumes (tomate, abóbora, pepino, cenoura, pimenta vermelha, beterraba), talo de couve, sementes de girassol e ração para cães. A semente e a ração eram oferecidas em dias alternados, bem como o milho em espiga e o milho umedecido em água. Uma papa composta de farinha de milho, aveia, gema de ovo, leite de coco, coco ralado, óleo de dendê, água e suplementos vitamínicos e minerais foi oferecida antes da época reprodutiva. As aves do Zoológico recebiam somente ração peletizada (20g/dia). Existem estudos com algumas espécies de psitacídeos como o kakapo (*Strigops habroptilus*), habitante de pequenas ilhas na Nova Zelândia, que supõe que o seu ciclo hormonal poderia ser modulado por fito-hormônios de frutos verdes nativos e que as aves em cativeiro também poderiam estar sofrendo essa influência de alimentos

industrializados que continham farelo de soja (FIDLER et al., 2000). Altos níveis de xenoestrógenos (genisteína, daidzeína e seus conjugados) já foram mensurados em alimentos comerciais para aves (WOODHAMS, 1995). Não se conhece ainda qual a importância e influência da dieta natural dos psitacídeos brasileiros de vida livre no controle da função reprodutiva. A maioria dos frutos que são oferecidos para essas aves no cativeiro não são nativos e não se tem certeza se na natureza existe algum fator nutricional que poderia induzir a esteroidogênese. Outras famílias de aves também sofrem esse tipo de regulação. Mergulhões marrons (*Cinclus pallasii*) possuem diferentes épocas reprodutivas nas regiões norte, sul e central do Japão e essa condição provavelmente depende do início do surgimento de larvas de insetos aquáticos. Para Kofuji, Kanda e Oishi (1993, p. 222), “Seria interessante realizar nessas aves análises de esteróides gonadais em amostras fecais, comparando áreas do norte com áreas do sul”. Na Escócia, a população do galo silvestre europeu (*Tetrao urogallus* L.) está declinando devido a mudanças climáticas que estão modificando a vegetação do local e conseqüentemente diminuindo a abundância de uma larva de inseto, que é o principal item alimentar dessa ave em época reprodutiva (MOSS; OSWALD; BAINES, 2001).

A ausência de elementos nutricionais fundamentais para o desenvolvimento do organismo e para a maturação reprodutiva ou a própria restrição de alimento imposto por comportamentos de dominância entre indivíduos que vivem em grupo, também afetam consideravelmente a síntese hormonal. Estudos de Bruggeman et al. (1998, p. 206) demonstraram que, “Galinhas que sofreram restrição alimentar por longos períodos anteriormente à maturação sexual tiveram influência negativa no ganho de peso e no desenvolvimento do ovário e do oviduto”. Outros estudos corroboraram com

essa situação, como no caso em que o número de folículos atrésicos foi maior e o número de folículos ovarianos amarelos grandes foi menor em galinhas que sofreram restrição alimentar, quando comparadas com galinhas que tiveram acesso ao alimento *ad libitum*, conseqüentemente refletindo nos perfis de 17β -Estradiol dessas aves (RENEMA et al., 1999). O início da postura e o peso da gema de ovos de galinhas também podem ser afetados pela restrição alimentar. Esse período pode ter um atraso de 6 a 7 semanas, com decréscimo no peso da gema (HOCKING, 1996). Pássaros selvagens podem sofrer alterações na função reprodutiva com restrições alimentares diárias longas (6h ou mais) (SIKDAR, 2002). Fêmeas de perus que passaram por restrição alimentar também tiveram um atraso na maturação sexual (RENEMA et al., 1994). Elementos que atuam diretamente no desenvolvimento gonadal, como a vitamina E, não podem se esquecer, já que o acréscimo de doses maiores dessa vitamina na ração de galinhas poedeiras pode melhorar os índices de produção de ovos (TOMILOV, 2002). No caso das aves do grupo do Zoológico, a forma peletizada da ração provavelmente não teve efeito nenhum no desenvolvimento gonadal das aves, como ocorreu no estudo da influência da ração peletizada na maturidade sexual de frangas (GOUS; MORRIS, 2001).

Em relação à dominância, algumas aves podem desenvolver esse comportamento, levando a subserviência em outros indivíduos, inclusive entre animais do mesmo sexo. É o que parece ter acontecido com dois machos de papagaio-de-peito-roxo dos viveiros nº 46 e 49. Seus esteróides sexuais tiveram níveis compatíveis com os níveis das fêmeas. Em bandos de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), machos

ocupam posições sociais mais altas do que as fêmeas (WEINHOLD¹, 1998 apud SEIBERT; CROWELL-DAVIS, 2001, p. 156). Outrora, em um grupo de calopsitas da família dos psitacídeos, os machos demonstraram comportamento mais agressivo que o das fêmeas e as associações entre as aves não foi ao acaso, mas seguiu preferências individuais que se refletiram sobre o comportamento reprodutivo (SEIBERT; CROWELL-DAVIS, 2001). Essa informação é de extrema importância, visto que a maioria dos acasalamentos em criadouros de psitacídeos é realizada de maneira forçada. Em vida livre, durante a época reprodutiva, os papagaios vivem em pequenos grupos composto pelo casal e seu(s) filhote(s), mas fora dessa época, as aves tendem a ser fortemente sociais e gregárias e o tamanho do bando pode crescer significativamente (GILARDI; MUNN², 1998 apud MEEHAN; GARNER; MENCH, 2003, p. 2). A experiência reprodutiva também se mostra relevante, uma vez que em pareações forçadas de casais de cacatuas, somente ocorreu sucesso reprodutivo com aves que já tiveram algum contato prévio com comportamentos reprodutivos (STONE et al., 1999). Esse estudo também sugere que a comunicação por meio de sons entre aves que estavam acasaladas há mais tempo e que foram re-pareadas de maneira forçada também poderia inibir o comportamento reprodutivo nessas novas associações, mas em um menor grau de importância. Seguindo essa linha de raciocínio, ambos locais poderiam estar sofrendo esse efeito. Os recintos das aves do grupo do Criadouro encontravam-se muito próximos, havendo uma intensa comunicação entre os animais, e as aves do grupo do grupo do Zoológico estavam lado a lado. Até mesmo a

---

¹ WEINHOLD, J. Analysis of the social behavior of a community of blue-fronted Amazonas (*Amazona aestiva*) kept in an aviary, **Amazona Q.**, v. 14, p. 11-13, 1998.

² GILARDI, J. D.; MUNN, C. A. Patterns of activity, flocking and habitat use in parrots use of the Peruvian Amazon. **The Condor**, v. 100, n. 4, p. 641, 1998.

motivação para buscar alimento pode se refletir sobre os níveis de corticosterona, testosterona e seus metabólitos, em amostras de excretas cloacais de gansos (*Anser anser*) (PFEFFER; FRITZ; KOTRSCHAL, 2002). No criadouro, o indivíduo dominante era ávido em se alimentar primeiro.

A adaptação ao local também pode afetar o comportamento das aves e conseqüentemente as relações entre os indivíduos e a sua reprodução. O tipo de construção do ninho, o enriquecimento ambiental e o pareamento isosexual de psitacídeos juvenis podem diminuir o desenvolvimento de anormalidades de comportamento associado a posturas no chão do recinto, à agressão, ao medo, à vocalização excessiva e ao arrancamento de penas (MARTIN; MILLAM, 1995; MEEHAN; MENCH, 2002; MEEHAN; GARNER; MENCH, 2003). Filhotes de papagaios que tiveram um contato precoce com humanos apresentaram níveis mais baixos de corticosterona, quando comparados com filhotes que não tiveram esse contato (COLLETTE et al., 2000). Assim sendo, filhotes alimentados na mão poderão crescer como adultos contendo um maior grau de socialização e adaptação ao ambiente cativo.

Outro fator tão importante quanto os outros é o fotoperíodo. É notória a importância do tempo de exposição à luz de aves de granjas de criação comercial no manejo reprodutivo. Apesar de serem aves de regiões tropicais, o grupo do Criadouro estavam mais expostas à claridade do que as aves do grupo do Zoológico. Codornas mantidas em escuridão completa tiveram um atraso na maturação sexual (GUYOMARC'H; GUYOMARC'H, 1992). Frangas que foram submetidas a protocolos de foto-estimulação mais longos e com maior quantidade de horas/luz, tiveram níveis plasmáticos de FSH mais altos e uma correlação significativa com a média da idade na primeira postura (LEWIS et al., 1999). A produção de ovos de galinhas de postura e o

tamanho desses ovos também são afetados positivamente pelo aumento na intensidade de luz (RENEMA et al., 2001). Esteróides sexuais extraídos de excretas cloacais de gansos (*Anser anser*) que habitam zonas temperadas demonstraram a existência de padrões sazonais em machos e fêmeas dessa espécie (HIRSCHENHAUSER; MÖSTL; KOTRSHAL, 1999). Um único fotoperíodo longo (18 h de luz/dia) pode iniciar o processo de fotorefração em aves de zonas temperadas, como no caso de estorninhos europeus (DAWSON, 2001). Tentilhões fotorefratários apresentaram baixos níveis de GnRH durante esse período (CHO et al., 1998). Fêmeas de perus tiveram um rápido aumento nos níveis de LH plasmático quando passaram de um protocolo com fotoperíodo de dias curtos (6 h de luz:18 h de escuridão) para um protocolo com fotoperíodo de dias longos (14h de luz:10h de escuridão) (BACON; LONG, 1995). Frangas tiveram uma maior influência no retardamento do desenvolvimento sexual causado por um protocolo com dias curtos do que com a limitação à alimentação (GOUS; MORRIS, 2001). Após foto-estimulação, as concentrações plasmáticas de LH e FSH de galinhas aumentaram consideravelmente (RENEMA et al., 1999). Quando patos (*Cairina moschata*) originários de regiões tropicais são submetidos a diferentes protocolos com fotoperíodos com dias longos e dias curtos, o protocolo contendo dias mais longos é capaz de antecipar a maturação sexual. Entretanto, o desenvolvimento reprodutivo dessa ave ocorreu sob várias condições de fotoperíodo, demonstrando que outros fatores também interferiram nesse processo (JACQUET; SAUVEUR, 1995). Papagaios-do-mangue (*Amazona amazonica*), uma espécie que também é originária de regiões tropicais, quando submetidos à foto-estimulação, responderam a esse protocolo e produziram filhotes (COLLETTE et al., 2000). Um casal de papagio-verdadeiro que foi levado para o VRA em viveiros

separados para a colheita de amostras para os testes iniciais, ao retornarem para o Criadouro reproduziu e a fêmea fez a postura de um ovo, que não eclodiu. Esse fato talvez se deva a maior exposição diária à luz natural que essas aves recebiam no VRA, já que a alimentação foi muito semelhante.

No decorrer do estudo, preferencialmente foram colhidas amostras de animais adultos com três anos ou mais, pois a maturidade sexual das aves tem influência na produção de hormônios sexuais. Papagaios com um ano e mais ainda não atingiram a maturidade sexual e social (MEEHAN; GARNER; MENCH, 2003). Vários estudos demonstram que os níveis dos principais esteróides gonadais aumentam durante o desenvolvimento sexual (BRUGGEMAN et al., 1998; FRIGERIO; MOESTL; KOTRSCHAL, 2001; GUYOMARC'H; GUYOMARC'H, 1992; JACQUET; SAUVEUR, 1995; LEWIS et al., 1999). Outros experimentos tentam identificar as regiões do cérebro que ativam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal durante a maturidade sexual em aves macho filhotes (KUENZEL, 2000), ou então sugerem que perda total do comportamento sexual em machos senis pode estar ligada à deterioração da função hipotalâmica, afetando a síntese e liberação de cGnRH-I e levando a mudanças qualitativas e quantitativas do sistema da aromatase, limitando assim a síntese local de estradiol, um importante estimulador do comportamento sexual e regulador da produção de cGnRH-I (OTTINGER et al., 1997).

Em nenhuma das situações analisadas, os níveis de estrógenos das fêmeas tiveram diferença significativa quando comparado com os níveis de estrógenos dos machos ($p=0,5368$ para o grupo do Zoológico e $p=0,9364$ para o grupo do Criadouro). Esse resultado difere da maioria dos casos relatados em literatura. Para Tell e Lasley (1991, p. 365), "Em cacatuas, parece que as fêmeas excretam significativamente níveis

mais altos de todas as formas de estrógenos que os machos”. Bishop e Hall (1991, p. 657-658) descreveram que, “O estradiol-3-glucoronida possui um aumento considerável nas concentrações das fêmeas e uma diferença significativa entre os níveis dos machos e das fêmeas de codornas”. Para Sockman e Schwabl (1999, p. 264), “Em criações de canários, as concentrações fecais de estradiol são muito mais elevadas em fêmeas do que em machos, sem sobreposição das concentrações entre os sexos”. O mesmo aconteceu em um estudo para a determinação do sexo em calopsitas (TELL; LASLEY, 1991) e no estudo de padrões sazonais da atividade gonadal em águias-carecas (BERCOVITZ et al., 1982). No caso do grupo do Zoológico, a média dos estrógenos dos machos foi discretamente menor que os níveis de estrógenos das fêmeas ($921,79 \pm 346,74$ para os machos e $1018,04 \pm 338,25$ para as fêmeas), enquanto que no grupo do Criadouro essa situação está invertida ($1114,70 \pm 1237,18$ para os machos e $997,23 \pm 807,94$ para as fêmeas). Tal fato pode ser justificado na baixa atividade gonadal das fêmeas quando comparado com os machos, principalmente no grupo do Criadouro, fazendo com que seus níveis estrogênicos decrescessem aos níveis dos machos e até mesmo permanecessem abaixo desses.

Quando se analisa o fator Razão entre os níveis de estrógenos e andrógenos, a comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico não apresentou diferença significativa ($p=0,1365$); enquanto que na comparação entre os machos e as fêmeas do Criadouro, o fator Razão apresentou diferença significativa ($p<0,0001$), corroborando com outros experimentos (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978; CZEKALA; LASLEY, 1977; STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979). No grupo do Zoológico, a média do fator Razão das fêmeas ($1583,42 \pm 753,25$) foi um pouco superior à média do

fator Razão dos machos ($1002,51 \pm 654,95$). No grupo do Criadouro, a média do fator Razão das fêmeas ($1024,27 \pm 506,76$) foi bem superior à média do fator Razão dos machos ($344,517 \pm 306,30$). A literatura também cita que o fator Razão das fêmeas é superior ao fator Razão dos machos, apesar de haver diferença em relação aos números absolutos para esse índice em papagaios (fêmea $\geq 2,0\text{ng}/24\text{h}$; macho $\leq 0,5\text{ng}/24\text{h}$) (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978) e em calopsitas (fêmea $\geq 2,5\text{ng/ml} \leq$ machos) (STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979). Esse índice também possui uma variação entre espécies e gêneros (STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979). Porém, no presente estudo, o objetivo não foi estabelecer a determinação do sexo por espécie e sim considerar todos os indivíduos dentro do grupo dos psitacídeos.

Na comparação entre as fêmeas do grupo do Criadouro com as fêmeas do grupo do Zoológico, o fator Razão entre os níveis de estrógenos e andrógenos apresentou diferença significativa ($1024,27 \pm 506,76$ para o grupo do Criadouro e $1583,42 \pm 753,25$ para o grupo do Zoológico; $p=0,0385$) devido à tendência dos níveis androgênicos em ter diferença significativa ($p=0,2005$). Essa situação ficou mais evidenciada quando se compararam os machos do grupo do Criadouro com os machos do grupo do Zoológico. O fator Razão também apresentou diferença significativa ($344,517 \pm 306,306$ para o grupo do Criadouro e $1002,51 \pm 654,954$ para o grupo do Zoológico; $p=0,0026$) devido a maior tendência dos níveis androgênicos em seguir esse mesmo comportamento ($p=0,0995$).

Já em relação aos níveis de andrógenos, somente existiu diferença significativa na comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Criadouro (machos = $29,268 \pm 80,64$, fêmeas = $1,195 \pm 1,33$; $p=0,0002$). Esses dados comprovam que nesse

experimento, os níveis androgênicos entre machos e fêmeas tiveram uma participação decisiva na determinação do sexo das aves do grupo do Criadouro. Não houve diferença significativa desse fator nas condições do grupo do Zoológico ($4,721 \pm 10,04$ para os machos e $1,218 \pm 1,76$ para as fêmeas; $p=0,210$).

Sugere-se que em nenhuma situação as fêmeas estariam em plena atividade gonadal. Já em relação aos machos do grupo do Criadouro, estes sim estariam com produção androgênica e estrogênica, enquanto que os machos do Zoológico não estariam com atividade gonadal. Os dados justificam o motivo pelo qual os índices dos machos do criadouro são maiores que os índices das fêmeas desse local e maiores que os índices do grupo do Zoológico. Entretanto, ressalta-se a possível influência do tamanho da amostra estudada no Criadouro, com 50 aves, e no Zoológico, com apenas 15 aves estudadas e de uma única espécie.

Papagaios, no geral, possuem péssimos índices reprodutivos em cativeiro, refletindo-se sobre a fisiologia endócrina. Para um grande número de espécies de papagaios, incluindo aquelas que estão ameaçadas de extinção na natureza, a taxa reprodutiva é baixa e a importação legal ou o contrabando de indivíduos de vida livre ainda continua sendo a alternativa mais barata (STONE et al., 1999).

Na sexagem das aves, utilizou-se o intervalo de confiança (95%) da média. Quando o Intervalo de Confiança foi determinado com base nos valores transformados do fator Razão, a porcentagem de acerto foi de 68% (fêmea $\geq 27,49$; macho $\leq 19,94$; valores entre esse intervalo não determinaram o sexo). Quando o Intervalo de Confiança foi determinado com base nos valores transformados do fator Andrógeno, a porcentagem de acerto foi de 70% (fêmea $\geq 0,78$; macho $\leq 0,68$; valores entre esse

intervalo não determinaram o sexo). Os valores do limite inferior e do limite superior do fator Estrógeno, tanto para machos quanto para fêmeas, se sobrepueram por não existir diferença significativa entre eles nas diversas situações estudadas. Na literatura, a porcentagem de acerto na determinação do sexo de psitacídeos com base no fator Razão foi de 63,5% (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978). Em outro estudo, foi obtido 70% de acerto na determinação do sexo com aves de vários gêneros e espécies (STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979). Nesse último experimento, somente em uma colônia de calopsitas conseguiu-se uma porcentagem de acerto acima de 95% utilizando como parâmetro o fator Razão. Entretanto, o próprio autor discute que essas aves encontravam-se em uma situação controlada pelo pesquisador dentro do seu laboratório. Há situações de determinação do sexo em que somente foi usado o fator Estrógenos, pois esse índice estava muito mais elevado nas fêmeas do que nos machos, e o fator Andrógeno não apresentava diferença estatística entre os sexos. Dessa maneira, 87% das calopsitas foram corretamente sexadas (TELL; LASLEY, 1991). Com na situação anterior, essas aves encontravam-se sob condições controladas de foto-estimulação e alimentação. Assim sendo, sempre é importante lembrar que cada local comporta-se de maneira muito particular devido à padronização do manejo.

O sexo somente foi determinado nos psitacídeos do grupo do Criadouro, pois não houve diferença significativa na comparação do fator Razão ($p=0,1365$), do fator Estrógenos ($p=0,5368$) e do fator Andrógenos ($p=0,2105$), entre os machos e fêmeas do grupo do Zoológico.

Ainda dentro do grupo das aves do Zoológico, foi estudada a influência da época não reprodutiva na determinação do sexo dessas, devido à facilidade de colheita das

amostras. Não se encontrou nenhuma diferença significativa na comparação entre os valores da época reprodutiva e da época não reprodutiva dos machos (Razão $p=0,6062$; Estrógenos $p=0,9241$; Andrógenos $p=0,6362$) e das fêmeas (Razão $p=0,1586$; Estrógenos $p=0,3347$; Andrógenos $p=0,2264$). Novamente o fato pode ser explicado devido às condições ambientais e de manejo ao qual esses papagaios-verdadeiros estavam submetidos, levando a uma queda da função reprodutiva nesse grupo. Esses dados também podem indicar que essa espécie não possui um comportamento sazonal muito definido, já que são animais originários de regiões tropicais. Mas isso ainda é muito discutível, por seria necessário determinar o perfil hormonal dessa espécie.

Existem registros de que a testosterona nos machos e nas fêmeas é rapidamente metabolizada, formando uma complexidade de produtos (GOYMANN; MÖSTL; GWINNER, 2002; HIRSCHENHAUSER et al., 2000; TELL, 1997). Apesar do contato com os fornecedores, não foi encontrado nenhum “kit” comercial que detectasse esses metabólitos. Na maioria das situações, o resultado das mensurações dos andrógenos foi muito baixo e até mesmo indetectável. As mensurações dos andrógenos foram realizadas com “kit” comercial em fase sólida para Testosterona livre. Apesar da maioria das referências elegerem uma solução aquosa como a ideal na solubilização de metabólitos em aves, foi testada a extração com uma solução PBS:Álcool Etílico (4:1) no grupo das aves do Zoológico, para saber-se qual efeito que essa etapa teria sobre a mensuração dos andrógenos e na posterior determinação do sexo das aves. Solubilizações com soluções aquosas (PBS) retiram da amostra principalmente metabólitos conjugados (glucoronados e sulfatados), enquanto que extrações com solventes orgânicos (Álcool Metílico, Álcool Etílico) retiram da amostra

principalmente metabólitos livres. Na comparação entre a solubilização e a extração (PBS:Álcool Etílico) no grupo dos machos do Zoológico, o fator Razão teve uma diferença significativa nos seus valores ($p=0,0030$), bem como o fator Andrógeno ($p=0,0047$). O mesmo ocorreu na comparação entre as duas extrações no grupo das fêmeas do Zoológico ($p=0,0032$ para o fator Razão e $p=0,0047$ para o fator Andrógeno).

Quando se comparam os machos e as fêmeas somente dentro do protocolo de extração com PBS:Álcool Etílico (4:1), os resultados dos valores do fator andrógeno tenderam a uma diferença significativa ($p=0,0914$). Com um tamanho de amostra maior, provavelmente seria possível obter-se diferença significativa nesses valores e conseqüentemente determinar o sexo desses papagaios. Essa avaliação indica que com o uso de “kits” comerciais onde os anticorpos se ligam especificamente com hormônios e metabólitos livres, seria recomendado aumentar um pouco o volume de solvente orgânico na extração.

Outros autores também encontraram dificuldades na mensuração de andrógenos em aves. Desde o início das pesquisas, as mensurações dos hormônios masculinos em excretas cloacais não demonstravam ter correlação com os níveis de testosterona plasmática (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978). Amostras de excretas cloacais de ganso doméstico foram utilizadas na extração de andrógenos com metanol 80% e hidrolisadas com β -glucoronidase/arilsulfatase, pois os anticorpos do ensaio imunoenzimático contra 17 β -OH-Andrógeno e contra o grupo 17-oxo-Andrógeno não se ligariam aos metabólitos conjugados. No entanto, os níveis dos metabólitos de andrógenos fecais foram muito mais variáveis do que os níveis de testosterona plasmática, não demonstrando uma correlação estreita entre esses dois parâmetros

(HIRSCHENHAUSER et al., 2000). Resultados semelhantes ocorreram na mensuração de metabólitos de andrógenos em excrementos de um passeriforme europeu (GOYMANN; MÖSTL; GWINNER, 2002). Apesar da extração nesse estudo anterior ser com uma solução de metanol:água bidestilada (3:1) e apesar da realização da hidrólise dos metabólitos, o hormônio testosterona não foi detectado no ensaio que utilizaram anticorpos contra Testosterona (100%), 5α -Dihidrotestosterona (44%), δ -1-Testosterona (41%) e δ -1-Dihidrotestosterona (18%). Em fêmeas de calopsitas, os andrógenos conjugados excretados por esse animal são formados por uma complexidade de metabólitos onde predomina aqueles a base de Androsterona e, por esse motivo, não foi possível detectá-los no radioimunoensaio ou no enzimoimunoensaio para Testosterona (TELL, 1997). Os andrógenos conjugados excretados por fêmeas de periquitos australianos e papagaios-do-mangue também são formados por uma complexidade de metabólitos, havendo diferenças entre eles em relação a sua composição, e alguns desses metabólitos excretados pelo papagaio-do-mangue não aparentam ter reatividade para enzimoimunoensaios e radioimunoensaios para Testosterona (LEE; TELL; LASLEY, 1999). Contrário a essa condição, para Bishop e Hall (1991, p. 666), “O ensaio mais conveniente para mensurações de andrógenos fecais em codornas é o realizado diretamente em hormônios conjugados não extraídos com solventes orgânicos, como os para testosterona-17-glucoronida”. Seguindo nessa mesma linha, para Cockrem e Rounce (1994, p. 441-442), “Encontrou-se clara correspondência entre os padrões de concentração desses dois hormônios no plasma de machos e fêmeas e nas suas fezes”, em mensurações hormonais de fezes de galinha realizada por meio de “kit” comercial específico para Testosterona e para

Estradiol (Diagnostic Products Corporation – Los Angeles), somente solubilizando a amostra com PBS e não efetuando a hidrólise. Ainda segundo esses dois autores, “A proporção de estrógenos e andrógenos livres nas fezes é menor do que a proporção dos estrógenos e andrógenos conjugados”. A hidrólise enzimática dos metabólitos conjugados não foi efetuada no presente estudo devido a essa informação. A porcentagem de estrógenos conjugados em excretas cloacais de codornas seria de 15,4% e 31% para os andrógenos conjugados (BISHOP; HALL, 1991). Em estorninhos, a concentração de esteróides livres de amostras fecais não hidrolisadas é consideravelmente menor (5,9% para os estrógenos e 6,5% para os andrógenos) (BISHOP³, 1988 apud TELL, 1997, p. 515). Em excretas de papagaios e periquitos australianos, as formas conjugadas dos andrógenos e estrógenos são predominantes (>80%) para ambas as aves (LEE; TELL; LASLEY, 1999). Há indícios de que em aves, as principais vias metabólicas de excreção da testosterona sejam aquelas mediadas pela 17 β -OH-Esteróidedesidrogenase e por enzimas de conjugação, levando a formação de metabólitos a base de androsterona e a metabólitos conjugados (GRIFFIN; WILSON, 1998) (Figura 8).

---

³ BISHOP, C. M. **Monitoring of reproductive condition in birds utilising the noninvasive technique of fecal steroid analysis**. Ph.D Dissertation, University of Bristol, 1988.

Figura 7 – Vias metabólicas do hormônio Testosterona.

Fonte: GRIFFIN, J. E.; WILSON, J. D. Disorders of the testis and the male reproductive tract. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. **Williams textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 819-875.

Quanto aos anticorpos contra estrógenos fecais (Estríol, 17 β -Estradiol, Estrona) e seus metabólitos conjugados, estes parecem refletir bem os seus próprios níveis plasmáticos ou os dos seus precursores, quando realizada a hidrólise desses metabólitos (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978; STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979; HIRSCHENHAUSER; MÖSTL; KOTRSCHAL, 1999). Há casos em que essa hidrólise não é empregada, mas os anticorpos do ensaio de fluorescência eram contra Estrona-3-glucoronida (TELL; LASLEY, 1991), os anticorpos do radioimunoensaio eram contra Estradiol-3-glucoronida e Pregnanodiol-3 α -glucoronida (BISHOP; HALL, 1991) e os anticorpos do enzimoimunoensaio eram contra formas conjugadas de Estrona e formas conjugadas de Estradiol (LEE; TELL; LASLEY, 1999; TELL, 1997).

O período de estocagem das amostras foi grande, atingindo até um ano e quatro meses. As amostras foram liofilizadas e depois congeladas em freezer a -20°C . Nessas condições, acredita-se que a degradação hormonal causada por microorganismos seja muito baixa, já que a amostra está em baixas temperaturas e desidratada. Apesar de haverem trabalhos que não indicam a estocagem de amostras de excretas cloacais por mais de 90 dias à -40°C (STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979) ou de amostras fecais em etanol por mais de 120 dias à -20°C (KHAN et al., 2002), os resultados do presente trabalho não sugerem uma degradação hormonal efetiva, já que o índice de acerto na determinação do sexo foi semelhante a outros trabalhos publicados.

O uso de PBS para a solubilização dos metabólitos fecais teve o efeito desejado quanto à simplicidade do protocolo e solubilização dos esteróides conjugados. Porém, devido à especificidade dos anticorpos empregados nos “kits” comerciais, sugere-se que para aumentar a eficiência do ensaio, se acrescente um pouco de solvente orgânico nessa solução e que se faça à hidrólise enzimática antes da mensuração. Outra alternativa mais improvável seria encontrar “kits” comerciais que mensurem metabólitos de esteróides conjugados. A simplificação da extração de metabólitos de excretas cloacais das aves usando-se apenas Tampão Fosfato Salino (PBS) com o sentido de tornar a técnica de dosagem hormonal mais prática e de fácil execução é amplamente empregada por outros pesquisadores (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978; BERCOVITZ et al., 1982; BISHOP; HALL 1991; COCKREM; ROUNCE, 1994; COCKREM; ROUNCE, 1995; CZEKALA; LASLEY, 1977; LEE; TELL; LASLEY, 1999; LEE et al., 1995; STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979; TELL, 1997; TELL; LASLEY, 1991).

As excretas cloacais foram congeladas em um prazo de 12h após a colheita a uma temperatura de -20°C, pois segundo Cockrem e Rounce (1994, p.442), “Manter amostras em temperatura ambiente dentro de um período de até 48h antes do congelamento não afeta as concentrações hormonais mensuradas”. Vários outros trabalhos também adotam o procedimento de colheita e congelamento dentro das primeiras 24h após a defecação (BERCOVITZ; CZEKALA; LASLEY, 1978; BISHOP; HALL, 1991; COCKREM; ROUNCE, 1995; CZEKALA; LASLEY, 1977; LEE et al., 1995; STAVY; GILBERT; MARTIN, 1979; TELL; LASLEY, 1991).

Tell (1997, p. 514) diz que, “Ocorrendo à imediata absorção no músculo, os dados sugerem que a meia-vida da totalidade do Estradiol e da totalidade da Testosterona sérica, em calopsitas, é menor ou igual à 4h”. Nesse mesmo caso, após um período de 24h da administração do hormônio marcado, a taxa de recuperação dos dois esteróides nas excretas foi de 75%. Essa informação comprova que a mensuração de amostras diárias de excretas cloacais reflete a excreção de metabólitos de Estradiol e Testosterona produzidos nas 24h anteriores. Lee, Tell e Lasley (1999, p. 258) observaram que, “A rápida excreção de hormônios esteróides em periquitos australianos e papagaios-do-mangue, indicam que mudanças diárias na produção de Estradiol e Testosterona se refletem nos resultados das mensuração de amostras de excretas cloacais representativas de um dia”. Nesse estudo, a recuperação do hormônio marcado injetado nessas aves foi maior nos periquitos australianos (média dos dois esteróides= 94%) do que nos papagaios (média dos dois esteróides= 67%), pois suas excretas são menores, mais concentradas e mais secas. Além disso, o tamanho da massa corpórea e da superfície de área dos papagaios-do-mangue é maior, fazendo com que a distribuição do hormônio marcado nos tecidos fosse maior.

Ainda nesse experimento, o pico máximo de excreção do hormônio foi atingido 4h após a injeção, em ambas espécies. Após 16 h, não foi mais detectado o hormônio marcado. Em Tapiraí, a colheita das excretas cloacais era interrompida quando se atingia um volume suficiente para cada animal, o que demorava algumas horas, dependendo do tamanho da ave. No Zoológico, como as aves estavam individualizadas, era preciso somente colocar as excretas dentro dos tubos. Com certeza, essas últimas eram representativas de um dia.

5.2 DETERMINAÇÃO DO SEXO POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Apesar das inúmeras tentativas, não foi possível em nenhuma das situações estudadas amplificar as regiões CHD-Z e CHD-W dos cromossomos sexuais a partir de excretas cloacais das aves.

Os indícios apontam para a necessidade de uma maior quantidade de células e conseqüentemente uma maior quantidade de DNA para a realização da determinação do sexo por meio desta técnica.

Para simular essa situação, DNA de ave foi adicionado às amostras. A degradação desse DNA ocorreu provavelmente devido à ação dos processos de lise celular empregados no “kit” QIAmp. Procurando evitar esse fato, sangue de galinha foi adicionado às excretas, pois nessa situação o DNA encontra-se protegido dentro da célula.

Como a amplificação do DNA e o aparecimento de bandas somente ocorreram na situação em que foi adicionados à amostra um volume de 10 µl de sangue (volume recomendado pelos “kits”) com aproximadamente 2.496.500,000 células/ml e extraída com o “kit” comercial da QIAgen, sugere-se que atualmente essa técnica não poderia ser empregada rotineiramente em laboratório para a determinação do sexo de aves, devido à necessidade de se obter amostras com grandes quantidades de células. Mesmo nessa situação, as bandas obtidas foram fracas (principalmente a de 300pb) devido a baixa concentração do DNA. Em fezes humanas, uma grande variação na quantidade de DNA também foi observada (0,06%-46%) e 40 ciclos de amplificação de DNA total não diluído não foram suficientes para a visualização do produto, embora o DNA tenha sido amplificado com mais ciclos (MACHIELS et al., 2000). Essa variação na quantidade de DNA fecal ao longo das amostras também é comentada por outros autores (BOOM et al., 2000). Na maioria das amostras fecais de focas, pouquíssima quantidade de DNA foi visualizado em gel de agarose (REED et al., 1997). Até mesmo o não aparecimento de um dos alelos na amplificação é reportado em decorrência da pouca quantidade de DNA (NOTA; TAKENAKA, 1999; SEGELBACHER; STEINBRÜCK, 2001; TABERLET et al., 1996). Em muitos protocolos publicados sobre amplificação de DNA de excretas ou urina, quase sempre é necessário realizar processos extras devido à sua baixa quantidade ou à degradação, como o uso de múltiplos e independentes PCRs (SEGELBACHER; STEINBRÜCK, 2001), reamplificações e uso de gel SSCP (“single-stranded conformation polymorphism”) (FLAGSTAD et al., 1999; ROBERTSON; MINOT; LAMBERT, 1999) e precipitações (NOTA; TAKENAKA, 1999). Com isso, todo o processo vai ficando mais complexo.

Em mamíferos, a técnica parece funcionar melhor. Isso talvez possa ocorrer devido à maior massa corpórea, ao tamanho das fezes e ao tipo de alimentação, que promoveria um efeito mais abrasivo no trato intestinal. Aproximadamente 10^6 células normais são descamadas do colon humano a cada 24h (SHORTER⁴ et al., 1964 apud SIDRANSKY et al., 1992, p. 104). Processos de isolamento dessas células nas fezes com gradiente percoll poderiam ser empregados anteriormente a PCR (IYENGAR et al., 1991), mas tornaria o processo ainda mais demorado. Em cervídeos, as fezes foram lavadas externamente para a retirada da camada de células aderidas e a amplificação é feita sem maiores problemas (FLAGSTAD et al., 1999). Já em fezes de coite, porções da parte externa das fezes é que foram retiradas para as análises (KOHN et al., 1999).

Outro fator que influenciam na amplificação do DNA é a quantidade de inibidores da enzima polimerase. Vários trabalhos relatam que as fezes contêm muitos inibidores, como polissacarídeos provenientes de plantas, sais biliares, DNA bacteriano em demasia e bilirrubina (DEUTER et al., 1995; LANTZ et al., 1997; MACHIELS et al., 2000; MONTEIRO et al., 2001). Na urina, a uréia e a glicose também podem inibir a polimerase (KHAN et al., 1991). Entretanto, essa hipótese é secundária, já que os “kits” comerciais para a extração de DNA são específicos para esse tipo de amostra e possuem mecanismos para retirar tais inibidores. O “kit” QIAmp utiliza pastilhas “inhibitEX” a base de sais que absorvem os inibidores, tampão ASL, vários tampões de lavagem e finalmente utiliza colunas de centrifugação (microfiltros) para purificar o DNA. Os “kit” Dynabeads sugere que se faça uma maior quantidade de etapas de lavagem com seus tampões específicos. O método de extração com Chelex 100 parece ser o que possui uma menor preocupação com esse fator. Outros artifícios para retirarem os

---

⁴ SHORTER, R. G. et al. **American Journal of Digestory Diseases** , v. 9, p. 760, 1964.

inibidores foram desenvolvidos, como bloqueadores feitos de agarose (MONTEIRO et al., 2001), ultrafiltração (KHAN et al., 1991), BSA (albumina sérica bovina) adicionada à reação de amplificação (AL-SOUD; RADSTRÖM, 2000; KOHN; WAYNE, 1997), farinha de batata adicionada à extração (DEUTER et al., 1995), sistemas bifásicos aquosos (LANTZ et al., 1997) e DNAzol (ROBERTSON; MINOT; LAMBERT, 1999).

A degradação parcial do DNA também é um fator limitante da PCR, e que pode ocorrer durante o congelamento de amostras secas (MACHIELS et al., 2000; MONTEIRO et al., 2001). A degradação pode chegar até a 80% em amostras fecais congeladas (DEUTER et al., 1995). Entretanto, outras pesquisas extraíram e amplificaram com sucesso o DNA de fezes ou excretas congeladas (REED et al., 1997; WASSER et al., 1997). O próprio “kit” QIAmp é indicado para amostras congeladas. Alguns artigos científicos descrevem a amplificação do DNA utilizando-se amostras de excrementos que não foram congeladas e que tinham um período de armazenagem de até 7 dias (MACHIELS et al., 2000; SEGELBACHER; STEINBRÜCK, 2001). Essa medida evitaria a degradação do DNA devido ao congelamento. No presente estudo, esse tipo de abordagem também foi empregado utilizando-se amostras de excretas cloacais de galinha que não sofreram congelamento e que não foram armazenadas. Como o DNA não foi quantificado nessa situação, a degradação parece não ter contribuído para esse evento. Além disso, publicações demonstraram que é possível amplificar o DNA de material muito antigo e mal preservado, como em cérebros com 7.000 anos de idade encontrados em sítios arqueológicos na Flórida/EUA (PÄÄBO; GIFFORD; WILSON, 1988).

No caso da extração do DNA com o “kit” Dynabeads onde foi adicionado um volume de sangue na amostra de excretas cloacais, notou-se que o complexo

DNA/Dynabeads não se apresentava estável. Talvez por esse motivo é que a amplificação do DNA não tenha ocorrido, já que a detecção do produto extraído em gel de Agarose 0,8% e no espectrofotômetro demonstrou pouca quantidade de DNA (média das amostras= 0,1µgµL; média da razão 260/280= 1,26).

Aumentar o tamanho da amostra de excreta cloacal a ser extraída para quantidades maiores que 1g pode ser uma alternativa para se conseguir mais células nesse tipo de matriz (FLAGSTAD et al., 1999; WASSER et al, 1997; WHITTIER et al, 1999). Previamente à etapa de extração, também pode ser realizada uma lavagem externa da excreta cloacal com uma solução neutra (solução salina, PBS) ou com outros tipos de tampões, para remover somente as células presentes na superfície. Isso foi feito com amostras de aves e de outras espécies (FLAGSTAD et al., 1999; KOHN et al, 1998; SEGELBACHER; STEINBRÜCK, 2001).

CONCLUSÕES

---

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no estudo “Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais” nos permitem chegar as seguintes conclusões:

1. A determinação do sexo de psitacídeos no grupo das aves do Criadouro, utilizando-se o Intervalo de Confiança (95%) da Média dos valores transformados do fator Andrógeno e do fator Razão, foi correta em 70% e 68% das situações, respectivamente;
2. Cada local onde se encontram as aves deve ser analisado separadamente, pois uma série de fatores como a alimentação, o fotoperíodo, o comportamento reprodutivo, a idade e a adaptação ao viveiro interferem nos níveis dos esteróides das excretas;
3. A solubilização de amostras com PBS mostra-se uma técnica fácil e eficiente, devido á natureza dos metabólitos nas excretas de aves (andrógenos e estrógenos conjugados);
4. Quando forem utilizados “kits” comerciais para mensurações de esteróides sexuais livres em excretas cloacais de aves, as extrações devem ser procedidas com uma solução PBS:Álcool Étilico (4:1). Para aumentar ainda mais a eficiência do ensaio, recomenda-se que se faça a hidrólise enzimática com arilsulfatases e β -glucuronidases na amostra solubilizada. Outra alternativa seria encontrar “kits” comerciais que mensurem estrógenos e

andrógenos conjugados e nesse caso somente realizar a solubilização dos metabólitos da excretas com PBS;

5. O “kit” comercial para Estrógenos Totais da ICN detectou bem os estrógenos das excretas cloacais de psitacídeos de ambos os sexos e foi validado para essa finalidade. Já em relação aos andrógenos, o “kit” comercial da ICN para Testosterona também foi validado para ambos os sexos. Ressalta-se que devido à incerteza na determinação do principal metabólito da testosterona, sugere-se que sempre se procure utilizar “kits” comerciais com altos índices de reação cruzada com andrógenos, ou ainda que se proceda a análise mais específica do principal metabólito por método eletroforético ou cromatográfico;
6. Andrógenos e estrógenos mensurados de excretas cloacais de um dia em psitacídeos, refletem bem os níveis dos esteróides sexuais plasmáticos do período compreendido entre as 24h anteriores à colheita, na época reprodutiva. Para a determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio, sugere-se colher as amostras de excretas cloacais de dois dias, dentro de um intervalo mínimo de 4h, aumentando-se assim as chances de realizar a correta sexagem;
7. Amostras de excretas cloacais de psitacídeos congeladas a -20°C em um prazo máximo 24h e armazenadas por aproximadamente 1 ano não sofreram qualquer tipo de alteração. Entretanto, recomenda-se que o período de estocagem não exceda 120 dias;

8. Não foi possível extrair o DNA de amostras congeladas de excretas cloacais de psitacídeos e nem de amostras frescas de excretas cloacais de galinha com os métodos empregados, possivelmente devido à baixa quantidade de células de descamação do trato digestório/urinário e conseqüentemente de DNA nesse matriz;
9. Somente foi possível amplificar o DNA de amostras de excretas cloacais de papagaio-verdadeiro onde foi acrescentado 10 µL de sangue de galinha e posteriormente extraído com o “kit” comercial QIAmp.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-SOUD; W. A.; RADSTRÖM, P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4463-4470, 2000.

ALBAUGH, G. P.; IYENGAR, V.; LOHANI, A.; MALAYERI, M.; BALA, S.; NAIR, P. P. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. **International Journal of Cancer**, v. 52, p. 347-350, 1992.

AUSTIN JR, O. L.; **Families of Birds**. New York: Golden Press, 1971. 200 p.

BACON, W. L.; LONG, D. W. Changes in plasma luteinizing hormone concentration in turkey hens after switching from short-day to long-day photoperiods. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 257-267, 1995.

BERCOVITZ, A. B.; COLLINS, J.; PRICE, P.; TUTTLE, D. Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive Bald Eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). **Zoo Biology**, v. 1, p. 111-117, 1982.

BERCOVITZ, A. B.; CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. A new method of sex determination in monomorphic birds. **Journal of Zoology and Animal Medicine**, v. 9, p. 114-124, 1978.

BERCOVITZ, A. B.; SARVER, P. L. Comparative sex-related differences of excretory sex steroids from day-old Andean Condors (*Vultur gryphus*) and Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*): non-invasive monitoring of neonatal endocrinology. **Zoo Biology**, v. 7, p. 147-153, 1988.

BISHOP, C. M.; HALL, M. R. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. **Journal of Zoology (London)**, v. 224, p. 649-668, 1991.

BOOM, R.; SOL, C.; WEEL, J.; LETTINGA, K.; GERRITS, Y.; VAN BREDA, A.; VAN DILLEN, P.W. Detection and quantification of human cytomegalovirus DNA in faeces. **Journal of Virological Methods**, v. 84, p. 1-14, 2000.

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

BRUGGEMAN, V.; D'HONDT, E.; BERGHMAN, L.; ONAGBESAN, O.; VANMONTFORT, D.; VANDESANDE, F.; DECUYPERE, E. The effect of food intake from 2 to 24 weeks of age on LHRH-I content in the median eminence and gonadotrophin levels in pituitary and plasma in female broiler breeder chickens. **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 200-209, 1998.

CENSO do IBAMA mostra que a população de araras-azuis cresceu. **Folha On Line**. 11/06/2002 – 12h56min. Disponível em:
<<http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u3953.shtml>>. Acesso em: 28 dez. 2002.

CHO, R. N.; HAHN, T. P.; SHACKLETON, S. M.; BALL, G. F. Seasonal variation in brain GnRH in free-living breeding and photorefractory house finches (*Carpodacus mexicanus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 100, p. 244-250, 1998.

CLINTON, M.; HAINES, L. C. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 876-886, 1999.

COCKREM, J. F.; ROUNCE, J. R. Faecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentration in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 35, p. 433-443, 1994.

COCKREM, J. F.; ROUNCE, J. R. Non-invasive assessment of the annual gonadal cycle in free-living kakapo (*Strigops habroptilus*) using fecal steroid measurements. **The Auk**, v. 112, n. 1, p. 253-257, 1995.

COLLAR, N. J.; GONZAGA, L. P.; KRABBE, N.; MADROÑO NIETO, A.; NARANJO, L. G.; PARKER III, T. A.; WEGE, D. C. **Threatened Birds of Americas**: the ICBP/IUCN Red Data Book. Cambridge, UK: International Council of Bird Preservation, 1992. 1150 p.

COLLETTE, J. C.; MILLAM, J. R.; KLASING, K. C.; WAKENELL, P. S. Neonatal handling of Amazon parrots alters the stress response and immune function. **Applied Animal Behavior Science**, v. 66, p. 335-349, 2000.

CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. A technical note on sex determination in monomorphic birds using faecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**, v. 17, p. 209-211, 1977.

DAWSON, A. The effects of a single long photoperiod on induction and dissipation of reproductive photorefractoriness in european starlings. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, p. 316-324, 2001.

DELHANTY, J. D. A. Rapid chromosomal sexing of birds by direct and short term culture techniques. **The Veterinary Record**, v. 125, p. 92, 1989.

DEUTER, R.; PIETSCH, S.; HERTEL, S.; MÜLLER, O. A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 18, p. 3800-3801, 1995.

DRECHSLER, M. A model-based decision aid for species protection under uncertainty. **Biological Conservation**, v. 94, p. 23-30, 2000.

FIDLER, A. E.; ZWART, S.; PHARIS, R. P.; WESTON, R. J.; LAWRENCE, S. B.; JANSEN, P.; ELLIOTT, G.; MERTON, D. V. Screening the foods of an endangered parrot, the kakapo (*Strigops habroptilus*), for oestrogenic activity using a recombinant yeast bioassay. **Reproduction and Fertility Development**, v. 12, p. 191-199, 2000.

FLAGSTAD, O.; ROED, K.; STACY, J. E.; JAKOBSEN, K. S. Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. Short Communication. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 879-883, 1999.

FREIXINHO JR., F. Sexagem de aves por radiestesia. **Site Saúde Animal** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <eantdias@usp.br> em 10 abr. 2002.

FRIGERIO, D.; MOESTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted metabolites of gonadal steroid hormones and corticosterone in greylag geese (*Anser anser*) from hatching to fledging. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 246-255, 2001.

GOUS, R. M.; MORRIS, T. R. The influence of pelleted feed on the response of growing pullets to photoperiods of less than ten hours. **British Poultry Science**, v. 42, p. 203-206, 2001.

GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; GWINNER, E. Non-invasive methods to measure androgen metabolites in excrements of european stonechats, *Saxicola torquata rubicola*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 80-87, 2002.

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

GREENWOOD, A. G. Avian sex determination by laparoscopy. **The Veterinary Record**, v. 112, p. 105, 1983.

GRIFFIN, J. E.; WILSON, J. D. Disorders of the testis and the male reproductive tract. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. **Williams textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 819-875.

GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M. C.; ORR, K. C. Y.; DAWSON, R. J. G. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1071-1075, 1998.

GUYOMARC'H, C.; GUYOMARC'H, J. C. Sexual development and free-running period in quail kept in constant darkness. **General and Comparative Endocrinology**, v. 86, p. 103-110, 1992.

HIEBERT, S. M.; RAMENOFKY, M.; SALVANTE, K.; WINGFIELD, J. C.; LEE GASS, C. Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 235-247, 2000.

HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Seasonal patterns of sex steroids determined from feces in different social categories of greylag geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 67-79, 1999.

HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; PÉCZELY, P.; WALLNER, B.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Seasonal relationship between plasma and fecal testosterone in response to GnRH in domestic ganders. **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, p. 262-272, 2000.

HOCKING, P.M. Role of body weight and food intake after photostimulation on ovarian function at first egg in broiler breeder females. **British Poultry Science**, v. 37, p. 841-851, 1996.

HÖSS, M.; KHON, M.; PÄÄBO, S.; KNAUER, F.; SCHRÖDER, W. Excrement analysis by PCR. **Nature**, v. 359, p. 199, set. 1992.

IBAMA dissolve comitê de recuperação da ararinha-azul. **IBAMA** – terça-feira 16/07/2002. Fonte: IBAMA. Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br/noticia_ararinha.htm>. Acesso em: 27 dez. 2002.

ISHII, S. Application of modern endocrine methods to conservation biology. In: ADAMS, N.J.; SLODOW, R. H. **Ostrich**, v. 70, n. 1, p. 33-38, 1998.

IYENGAR, V.; ALBAUGH, G. P.; LOHANI, A.; NAIR, P. P. Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2856-2859, out. 1991.

JACQUET, J. M.; SAUVEUR, B. Photoperiodic control of sexual maturation in muscovy drakes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 189-195, 1995.

JOHNSON, A. L. Reproduction in the Female. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1986a. p. 403-431.

JOHNSON, A. L. Reproduction in the Male. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1986b. p. 433-451.

KHAN, G.; KANGRO, H. O.; COATES, P. J.; HEATH, R. B. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. **Journal Clinical Pathology**, v. 44, p. 360-365, 1991.

KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; ISANI, S. S., YU, J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 57-64, 2002.

KOFUJI, K.; KANDA, M.; OISHI, T. Breeding cycles and fecal gonadal steroids in the brown dipper (*cinclus pallasii*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 91, p. 216-223, 1993.

KOHN, M. H.; WAYNE, R. K. Facts from feces revisited. **Tree**, v. 12, n. 6, p. 223-227, 1997.

KOHN, M. H.; YORK, E. C.; KAMRADT, D. A.; HAUGHT, G.; SAUVAJOT, R. M.; WAYNE, R. K. Estimating population size by genotyping faeces. **Proceedings of Royal Society of London B**, v. 266, p. 657-663, 1999.

KUENZEL, W. J. Central nervous system regulation of gonadal development in the avian male. **Poultry Science**, v. 79, p. 1679-1688, 2000.

LANTZ, P-G.; MATSSON, M.; WADSTRÖM, T.; RADSTRÖM, P.; Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 28, p. 159-167, 1997.

LASLEY, B. L.; KIRKPATRICK, J. F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 23-31, 1991.

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.

LEE, J. V.; WHALING, C. S.; LASLEY, B. L.; MARLER, P. Validation of an enzyme immunoassay for measurement of excreted estrogen and testosterone metabolites in the white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys oriantha*). **Zoo Biology**, v. 14, p. 97-106, 1995.

LESSELLS, K.; MATEMAN, C. Molecular sexing of birds. **Nature**, v. 383, p. 761-762, 1996.

LEWIS, P. D.; PERRY, G. C.; MORRIS, T. R.; DOUTHWAITE, J. A. Effect of timing and size of photoperiod change on plasma FSH concentration and the correlation between FSH and age at first egg in pullets. **British Poultry Science**, v. 40, p. 380-384, 1999.

LISTA oficial das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. 2.9 Psittaciformes. **RENTAS**. Disponível em:
<<http://www.rentas.org.br/index.php?action=listaoficial&mn=6&titulo=Lista%20de%20animais%20ameaçados&idioma=pt>>. Acesso em : 27 dez. 2002.

MACHIELS, B. M.; RUERS, T.; LINDHOUT, M.; HARDY, K.; HLAVATY, T.; BANG, D. D.; SOMERS, V. A. M. C.; BAETEN, C.; VON MEYENFELDT, M. V.; THUNNISSEN, F.B.J.M. New protocol for DNA extraction of stool. **BioTechnique**, v. 28, p. 286-290, Fev. 2000.

MARTIN, S. G.; MILLAM, J. R. Nest box selection by floor laying and reproductively naive captive cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 43, p. 95-109, 1995.

MATTOS, K. K.; DEL LAMA, S. N.; SALLES, A. R. C.; FRANCISCO, M. R.; MEDAGLIA, A.; TOMASULO, A. M.; CARMO, F. M. S.; PEREIRA, J. M. C.; OLIVEIRA, M. A. Sex determination of parrots *Amazona a. aestiva* and *Amazona amazonica* using the Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 280, p. 217-219, 1998.

MEEHAN, C. L.; GARNER, J. P.; MENCH, J. A. Isosexual pair housing improves the welfare of young Amazon parrots. **Applied Animal Behavior Science**, p. 1-16, 2003. Pré-print.

MEEHAN, C. L.; MENCH, J. A. Environmental enrichment affects the fear and exploratory response to novelty of young Amazon parrots. **Applied Animal Behavior Science**, v. 79, p. 75-88, 2002.

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

MONTEIRO, L.; GRAS, N.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p. 89-94, 2001.

MORENO, A. M. **Enterite proliferativa suína: aspectos anatomopatológicos e epidemiológicos**. 1999. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MOSS, R.; OSWALD, J.; BAINES, D. Climate change and breeding success: decline of the capercaillie in Scotland. **Journal of Animal Ecology**, v. 70, p. 47-61, 2001.

NILSSON, H. O.; ALELJUNG, P.; NILSSON, I.; TYSZKIEWICZ, T.; WADSTRÖM, T. Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in human stools. **Journal of Microbiological Methods**, v. 27, p. 73-79, 1996.

NOTA, Y.; TAKENAKA, O. DNA extraction from urine and sex identification of birds. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1235-1238, 1999.

OTTINGER, M. A.; THOMPSON, N.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G. C. Neuroendocrine regulation of GnRH and behavior during aging in birds. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 471-477, 1997.

PÄÄBO, S.; GIFFORD, J. A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 20, p. 9775-9787, 1988.

PATZL, M.; HOCHLEITHNER, M. Sexing in monomorphic birds through faecal steroid measurement. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FECAL STEROID MONITORING IN ZOO ANIMALS, 1, 1992, Holland. **Proceedings...** Holland:Royal Rotterdam Zoological and Botanical Gardens, 1992. p. 71.

PFEFFER, K.; FRITZ, J.; KOTRSCHAL, K. Hormonal correlates of being an innovative greylag goose, *Anser anser*. **Animal Behavior**, v. 63, p. 687-695, 2002.

POTTER, M. A.; COCKREM, J. F. Plasma levels of sex steroids in the north island brown kiwi (*Apteryx australis mantelli*) in relation to time of year and stages of breeding. **General and Comparative Endocrinology**, v. 87, p. 416-424, 1992.

PROJETO de conservação do papagaio-de-cara-roxa. **SPVS** – Sociedade de pesquisa em vida selvagem e educação ambiental. Comunicações PG1. Disponível em: <<http://www.spvs.org.br/projetos/papagaio.doc>> . Acesso: 28 dez. 2002.

PRUS, S. E.; SCHMUTZ, S. M. Comparative efficiency and accuracy of surgical and cytogenetic sexing in Psittacines. **Avian Diseases**, v. 31, n. 2, p. 420-424, 1987.

REED, J. Z.; TOLLIT, D. J.; THOMPSON, P. M.; AMOS, W. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 225-234, 1997.

REDELMAN, D.; FLEURY, S. A.; GARNER, D. L. Flow cytometry for sexing birds. **Tree**, v. 12, n. 12, p. 489, dez. 1997.

RENEMA, R. A.; ROBINSON, F. E.; FEDDES, J. J. R.; FASENKO, G. M.; ZUIDHOF, M. J. Effects of light intensity from photostimulation in four strains of commercial egg layers: 2. Egg production parameters. **Poultry Science**, v. 80, p. 1121-1131, 2001.

RENEMA, R. A.; ROBINSON, F. E.; MELNYCHUK, V. L.; HARDIN, R. T. The use of feed restriction for improving reproductive traits in male-line large white turkey hens. 1. Growth and carcass characteristics. **Poultry Science**, v. 73, p. 1724-1738, 1994.

RENEMA, R. A.; ROBINSON, F. E.; PROUDMAN, J. A.; NEWCOMBE, M.; McKAY, R. I. Effects of body weight and feed allocation during sexual maturation in broiler breeder hens. 2. Ovarian morphology and plasma hormone profiles. **Poultry Science**, v. 78, p. 629-639, 1999.

ROBERTSON, B. C.; MINOT, E. O.; LAMBERT, D. M. Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* Aves, from faeces. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1349-1350, 1999.

RUDI, K.; KROKEN, M.; DAHLBERG, O. J.; DEGGERDAL, A.; JAKOBSEN, K. S.; LARSEN, F. Rapid, Universal Method to Isolate PCR-Ready DNA Using Magnetic Beads. **BioTechniques**, v. 22, p. 506-511, 1997.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Application of a Noninvasive, PCR-Based Test for Sex Identification in an Endangered Parrot, *Amazona guildingii*. **Zoo Biology**, v. 20, p. 41-45, 2001.

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

SEGELBACHER, G.; STEINBRÜCK, G. Bird faeces for sex identification and microsatellite analysis. **Vogelwarte**, v. 41, n. 2, p. 139-142, dez. 2001.

SEIBERT, L. M.; CROWELL-DAVIS, S. L. Gender effects on aggression, dominance rank, and affiliative behaviors in a flock of captive adult cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 71, p. 155-170, 2001.

SHARP, P. J.; DAWSON, A.; LEA, R. W. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 275-282, 1998. Part C

SICK, H. Ordem Psittaciforme. In: _____. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 351-382.

SIDRANSKY, D.; TOKINO, T.; HAMILTON, S. R.; KINZLER, K. W.; LEVIN, B.; FROST, P.; VOGELSTEIN, B. Identification of *ras* oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. **Science**, v. 256, p. 102-105, abr. 1992.

SIKDAR, M. Role of feeding time and food amount in the reproduction of spotted munia. **Journal of Environmental Biology**, v. 23, n. 2, p. 163-167, 2002.

SMITH, G. A. Avian sex determination. **The Veterinary Record**, v. 19, p. 182, 1983.

SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 257-268, 1999.

STAVY, M.; GILBERT, D.; MARTIN, R. D. Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**, v. 19, p. 209-214, 1979.

STONE, E. G.; MILLAM, J. R.; EL HALAWANI, M. E.; PHILLIPS, R. E.; REDIG, P. T. Determinants of reproductive success in force-re-paired cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 63, p. 209-218, 1999.

TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N.; WAITS, L. P.; BOUVET, J. Reliable genotyping of sample with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 16, p. 3189-3194, 1996.

TELL, L. A. Excretion and Metabolic Fate of Radiolabeled Estradiol and Testosterone in Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). **Zoo Biology**, v. 16, p. 505-518, 1997.

TELL, L. A.; LASLEY, B. L. An Automated Assay for Fecal Estrogen Conjugates in the Determination of sex in Avian Species. **Zoo Biology**, v. 10, p. 361-367, 1991.

TOMILOV, A. P. Reproductive ability of poultry in connection with vitamins A and E content in ration. **Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya**, v. 4, p. 90-96, 2002.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. **BioTechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.

WASSER, S. K.; HOUSTON, C. S.; KOEHLER, G. M.; CADD, G. G.; FAIN, S. R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. **Molecular Ecology**, n. 6, p. 1091-1097, 1997.

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.

WHITTIER, C. A.; DHAR, A. K.; STEM, C.; GOODALL, J.; ALCIVAR-WARREN, A. Comparison of DNA extraction methods for PCR amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (COII) DNA from primate fecal samples. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 771-779, 1999.

WOODHAMS, D. J. Phytoestrogens and parrots: the anatomy of an investigation. **Proceedings of the Nutrition Society of New Zeland**. v. 20, p. 22-31, 1995.

ANEXO A

EXTRAÇÃO PELO MÉTODO QIAamp DNA STOOL MINI KIT

1. Pesar 220 mg de excretas em um microtubo de 2 ml;
2. Adicionar 1,6 ml de Tampão ASL em cada tubo. Agitar em “vortex” por 1 minuto até a homogeneização completa;
3. Centrifugar as amostras por 1 min. a 20.000 x g / 25°C;
4. Pipetar 1,4 ml do sobrenadante para um novo microtubo de 2 ml e descartar o “pelete”;
5. Adicionar 1 comprimido de “InhibitEX” em cada amostra e agitar imediatamente por 1 minuto até o comprimido suspender-se por completo. Incubar a suspensão por 1 min à temperatura ambiente para que os inibidores adsorvam à matriz do “InhibitEX”.
6. Centrifugar as amostras por 3 min. a 20.000 x g / 25°C;
7. Imediatamente após a centrifugação, pipetar todo o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5ml e descartar o “pelete”. Centrifugar novamente esse sobrenadante por 3 min. a 20.000 x g / 25°C.
8. Pipetar 25µl de proteinase K em um novo microtubo de 2 ml;
9. Pipetar 600µl do sobrenadante para o microtubo contendo proteinase K;
10. Adicionar 600µl do Tampão AL e agitar no “vortex” por 15 segundos;
11. Incubar a 70°C por 10 minutos;
12. Adicionar 600 µl de etanol absoluto e agitar no “vortex” por 15 segundos;
13. Pipetar 600µl para a coluna de centrifugação QIAamp e centrifugar por 1 minuto a 20.000 x g / 25°C. Acoplar a coluna de centrifugação em um outro tubo coletor e descartar o tubo coletor contendo o filtrado;
14. Pipetar mais 600µl da etapa número 12 para a coluna de centrifugação QIAamp e centrifugar por 1 minuto a 20.000 x g / 25°C. Acoplar a coluna de centrifugação em um outro tubo coletor e descartar o tubo coletor contendo o filtrado;
15. Repetir a etapa número 14 pipetando-se a terceira alíquota da etapa número 12 para a coluna de centrifugação;
16. Gentilmente, adicionar 500µl do Tampão AW1 à coluna de centrifugação. Centrifugar por 1 minuto a 20.000 x g / 25°C e descartar o tubo coletor contendo o filtrado;
17. Gentilmente, adicionar 500µl do Tampão AW2 à coluna de centrifugação. Centrifugar por 3 minutos a 20.000 x g / 25°C e descartar o tubo coletor contendo o filtrado;
18. Acoplar a coluna de centrifugação QIAamp para um novo microtubo de 1,5 ml e pipetar 200µl do Tampão AE diretamente na membrana da coluna. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Após isso, centrifugar por 1 minuto a 20.000 x g à 25°C. Reservar o filtrado para a PCR.

ANEXO B

EXTRAÇÃO DE DNA COM DYNABEADS

Fezes: Suspende 100mg da amostra em 300 μ l de Tampão (500mM Tris, 16 mM EDTA, 10Mm NaCl pH 9.0) e centrifugar a 10.000 x g por 2 minutos para compactar os sólidos fecais. Cuidadosamente, remover e descartar o sobrenadante, evitando desestabilizar a superfície de coloração pálida sobre o sólido. Transferir essa camada superficial para um tubo limpo:

1. Colocar a amostra em microtubo de 1,5ml e adicionar 200 μ l (1 unidade) de “Dynabeads” completamente ressuspendido no Tampão de Lise em uma única e rápida pipetagem. O vigor da pipetagem deve misturar suficientemente os componentes. Não vortexar ou misturar.
2. Deixar o tubo à temperatura ambiente por 5 minutos. Não é necessária agitação contínua.
3. Colocar o microtubo no magneto “DynaL MPC” para que o complexo DNA/“Dynabeads” possa aderir à face lateral do tubo voltada para o magneto e após 1-2 minutos, descartar cuidadosamente o sobrenadante. O complexo DNA/“Dynabeads” ficará com uma aparência gelatinosa marrom escuro. Durante essa etapa e a etapa da lavagem deve-se tomar cuidado para não quebrar o complexo.
4. Remover o tubo do “DynaL MPC”. Adicionar 200 μ l de Tampão de Lavagem (diluído para 1x concentração) em uma única e rápida pipetagem para que o complexo desca da lateral da parede do microtubo. Não agite o microtubo.
5. Colocar o tubo no “DynaL MPC” e deixar por 30 segundos ou até o sobrenadante clarear. Cuidadosamente pipetar e descartar o sobrenadante.
6. Repetir as etapas 4 e 5 uma vez. Se uma grande proporção de DNA isolado for usada para uma reação de PCR, deve-se repetir as etapas 4 e 5 duas vezes. O complexo DNA/“Dynabeads” se tornará mais compacto durante os passos de lavagem.
7. Remover o tubo do magneto “DynaL MPC”. Ressuspender o complexo DNA/“Dynabeads” em 20-40 μ l de Tampão de Resuspensão. Pipetar o complexo para cima e para baixo 30-40 vezes ou até a suspensão se tornar homogênea. O DNA está pronto para a PCR.

Se necessário, o DNA pode ser eluído do “Dynabeads” por incubação a 65°C por 5 minutos. Colocar o microtubo em “DynaL MPC” e deixar por 30 segundos. Rapidamente, retirar o sobrenadante com o DNA e transferir para um microtubo limpo.

ANEXO C

EXTRAÇÃO CHELEX® 100 5%

1. Pipetar 1ml de solução salina 0,9% em um microtubo estéril de 1,5ml contendo de 0,22 a 0,5g de fezes. Homogeneizar sem “vortexar”;
2. Centrifugar em temperatura ambiente a 1.500 x g por 3 minutos e cuidadosamente descartar o sobrenadante, sem desestabilizar o pelete;
3. Repetir a etapa acima descrita por 3 a 5 vezes;
4. Pipetar 500 µl de Chelex® 100 5% com uma ponteira com a ponta cortada e adicionar 15 µl de Proteinase K (20 mg/ml);
5. Incubar a 56°C por 40 minutos;
6. Agitar em “vortex” por 5 a 10 segundos;
7. Incubar em banho fervente por 8 minutos;
8. Colocar as amostras em gelo até resfriá-las;
9. Agitar em “vortex” por 5 a 10 segundos;
10. Centrifugar por 5 minutos a 6.500 x g;
11. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e armazenar a -20°C.

PRECIPITAÇÃO do DNA em ACETATO 3M (pH 5,2)

Após a extração DNA Método Chelex® -100 5%:

1. Pipetar 160 µl do DNA extraído do protocolo Chelex® 100 5%;
2. Adicionar a esse volume 16 µl de Acetato 3 M pH 5,2 (1/10 do volume);
3. Adicionar 352 µl de Isopropanol (dobro do volume da alíquota de DNA somado à alíquota de Acetato 3M);
4. Homogeneizar suavemente;
5. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos;
6. Centrifugar a 2.000 x g por 15 minutos a 4°C;
7. Desprezar o sobrenadante;
8. Lavar o “pelete” de DNA com 500 µl de etanol 70% gelado em estante com gelo;
9. Centrifugar por 5 minutos a 2.000 x g;
10. Desprezar o sobrenadante;
11. Lavar novamente o “pelete” de DNA com mais 500 µl de Etanol 70% gelado em estante com gelo;
12. Centrifugar por 10 minutos a 2.000 x g;
13. Desprezar o sobrenadante;
14. Secar o “pelete” em centrífuga refrigerada a vácuo ou estufa;
15. Ressuspender o “pelete” em 20 µl de Tampão de Eluição;
16. Incubar em banho-maria a 65°C por 10 minutos;
17. Retirar a alíquota para a PCR.

ANEXO D

DEPLEÇÃO HORMONAL

Fazer uma solução de Carvão-Dextran (p/ 01 litro):

- 50g de carvão
- 5g de dextran
- Completar com 01 litro de Água Destilada.

Coloca-se a solução no agitador magnético por 2 horas dentro da geladeira. A quantidade de material a ser depletado deve ser 10 vezes maior que a quantidade da solução de carvão, portanto, coloca-se 10% da solução de carvão no material.

Após, agita-se por 2 horas no “vortex”, centrifuga-se sob refrigeração a 1.500 x g / 12-17°C por 15 minutos. Retira-se o sobrenadante para outro recipiente e colocam-se mais 10% (a mesma quantidade do início) da solução de carvão. Agita-se em “vortex” novamente por mais 2 horas e centrifuga-se por mais 15 minutos.

Validade da solução: 10 dias.

ANEXO E

PROTOCOLO DO ENSAIO PARA ESTRÓGENOS TOTAIS – DUPLO ANTICORPO (ICN)

1. Adicionar 0,6 ml do sobrenadante em um tubo de vidro de 12ml;
2. Adicionar 6ml de acetato etílico:metanol (3:2) ao sobrenadante;
3. Agitar no “vortex” vigorosamente por 1 minuto e deixar formar as duas fases;
4. Retirar 5 ml da fase orgânica (fase superior) e evaporar sob ar comprimido;
5. Reconstituir a amostra seca em 2,5 ml de PBS e incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. Agitar suavemente durante esse período;
6. Adicionar 0,6 ml do tampão diluente nos tubos NSB, e 0,5 ml nos tubos do padrão 0;
7. Adicionar 0,5 ml do Padrão Estrógenos Totais (2,5-100pg) nos tubos dos padrões 2,5pg, 5pg, 10pg, 25pg, 50pg, 100pg (tubos 5 a 16);
8. Adicionar 0,5 ml das amostras reconstituídas da etapa número 5 nos tubos 17 até o final do ensaio;
9. Com exceção dos tubos número 1 e 2, adicionar 0,1 ml do Anti-Estrógenos Totais em todos os tubos do ensaio;
10. Adicionar 0,1 ml do 17- β -Estradiol ^{125} I em todos os tubos;
11. Agitar todos os tubos e incubar por 90 minutos a temperatura ambiente;
12. Após a incubação, adicionar 0,1 ml do segundo anticorpo em todos os tubos do ensaio e incubar a temperatura ambiente por 60 minutos;
13. Centrifugar todos os tubos do ensaio a 1.000 x g por 15 minutos. Aspirar ou decantar o sobrenadante (se for decantar, colocar os tubos invertidos sobre papel absorvente e deixar descansar por 15 minutos);
14. Contar o precipitado no contador gama.

ENSAIO PARA TESTOSTERONA – FASE SÓLIDA (ICN)

1. Pipetar 25 μ l de cada padrão, dos controles e das amostras em todos os tubos;
2. Quando todas as amostras foram pipetadas, adicionar 1 ml da Testosterona ^{125} I e agitar em “vortex” rapidamente;
3. Incubar todos os tubos por 120 minutos a 37°C;
4. Aspirar ou decantar todos os tubos (se for decantar, colocar os tubos invertidos sobre papel absorvente e deixar descansar por 15 minutos);
5. Contar co contador gama.

ANEXO F

TABELA - 1 Comparação entre os machos e as fêmeas do grupo Criadouro somado às aves do grupo Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	SEXO / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p	⁽¹⁾ p
RAZÃO E/A (raíz quadrada)	Fêmeas/29	1139,96±596,84	110,83	< 0,0001	⁽²⁾ 0,0008
	Machos/36	509,01±501,24	83,54		⁽³⁾ < 0,0001
ESTRÓGENOS (log [10])	Fêmeas/29	1001,54±730,34	135,62	0,8475	⁽⁴⁾ 0,3757
	Machos/36	1066,48±1082,45	180,40		⁽²⁾ 0,4396
ANDRÓGENOS (1/raíz quadrada)	Fêmeas/29	1,20±1,39	0,25	0,0003	⁽³⁾ 0,7480
	Machos/36	23,13±70,50	11,75		⁽⁴⁾ 0,8116

(1) Nível de Significancia da Análise de Interação. (2) Fator Local. (3) Fator Sexo. (4) Fator Local x Fator Sexo.

ANEXO G

TABELA - 1 Comparação entre as fêmeas do grupo do Criadouro com as fêmeas do grupo Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	LOCAL / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A	Criadouro/23	1024,27±506,76	105,66	0,0385
	Zoológico/06	1583,42±753,25	307,51	
ESTRÓGENOS (log [10])	Criadouro/23	997,23±807,94	168,46	0,4720
	Zoológico/06	1018,04±338,25	138,09	
ANDRÓGENOS (log [10])	Criadouro/23	1,19±1,33	0,27	0,2005
	Zoológico/06	1,21±1,76	0,72	

ANEXO H

TABELA - 1 Comparação entre os machos do grupo do Criadouro com os machos do grupo Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	LOCAL / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A (raíz quadrada)	Criadouro/27	344,51±306,30	58,94	0,0026
	Zoológico/09	1002,51±654,95	218,31	
ESTRÓGENOS (log [10])	Criadouro/27	1114,70±1237,18	238,09	0,6968
	Zoológico/09	921,79±346,74	115,58	
ANDRÓGENOS (1/raíz quadrada)	Criadouro/27	29,26±80,64	15,52	0,0995
	Zoológico/09	4,72±10,04	3,34	

ANEXO I**TABELA - 1** Comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	SEXO / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A	Fêmea/06	1583,42±753,25	307,51	0,1365
	Macho/09	1002,51±654,95	218,31	
ESTRÓGENOS	Fêmea/06	1018,04±338,25	138,09	0,5368
	Macho/09	921,79±346,74	115,58	
ANDRÓGENOS (1/andrógeno)	Fêmea/06	1,21±1,76	0,72	0,2105
	Macho/09	4,72±10,04	3,34	

TABELA - 2 Comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Criadouro. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	SEXO / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A (raíz quadrada)	Fêmeas/23	1024,27±506,76	105,66	<0,0001
	Machos/27	344,51±306,30	58,94	
ESTRÓGENOS (log [10])	Fêmeas/23	997,23±807,94	168,46	0,9364
	Machos/27	1114,70±1237,18	238,09	
ANDRÓGENOS (1/ raíz quadrada)	Fêmeas/23	1,19±1,33	0,27	0,0002
	Machos/27	29,26±80,64	15,52	

ANEXO J

TABELA – 1 Comparação entre a época reprodutiva com a época não reprodutiva dos machos do grupo do Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	ÉPOCA / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A	Não Reprodutiva/09	1199,89±916,11	305,37	0,6062
	Reprodutiva/09	1002,51±654,95	218,31	
ESTRÓGENOS (log [10])	Não Reprodutiva/09	888,32±263,16	87,72	0,9241
	Reprodutiva/09	921,79±346,74	115,58	
ANDRÓGENOS (1/andrógeno)	Não Reprodutiva/09	2,05±2,30	0,76	0,6372
	Reprodutiva/09	4,72±10,04	3,34	

TABELA – 2 Comparação entre a época reprodutiva com a época não reprodutiva das fêmeas do grupo do Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	ÉPOCA / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A	Não Reprodutiva/06	939,39±710,54	290,07	0,1586
	Reprodutiva/06	1583,42±753,25	307,51	
ESTRÓGENOS	Não Reprodutiva/06	1185,42±221,93	90,60	0,3347
	Reprodutiva/06	1018,04±338,25	138,09	
ANDRÓGENOS (log [10])	Não Reprodutiva/06	2,35±2,04	0,83	0,2264
	Reprodutiva/06	1,21±1,76	0,72	

ANEXO L

TABELA – 1 Comparação entre a extração com PBS (1) com a extração PBS:Álcool Etílico (2) dos machos do grupo do Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	EXTRAÇÃO / N° DE ÁVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A (log [10])	1/09	1002,51±654,95	218,31	0,003
	2/08	119,01±121,91	43,10	
ESTRÓGENOS (log [10])	1/09	921,79±346,74	115,58	0,6478
	2/08	840,29±262,83	92,92	
ANDRÓGENOS (log [10])	1/09	4,72±10,042	3,34	0,0047
	2/08	20,90±18,79	6,64	

TABELA – 2 Comparação entre a extração com PBS (1) com a extração PBS:Álcool Etílico (2) das fêmeas do grupo do Zoológico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	EXTRAÇÃO / N° DE ÁVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A (log [10])	1/06	1583,43±753,26	307,51	0,0032
	2/06	272,34±227,68	92,95	
ESTRÓGENOS	1/06	1018,04±338,25	138,09	1
	2/06	1018,04±338,25	138,09	
ANDRÓGENOS (log [10])	1/06	1,21±1,76	0,72	0,0047
	2/06	6,63±4,57	1,86	

ANEXO M

TABELA – 1 Comparação entre os machos e as fêmeas do grupo do Zoológico dentro do protocolo PBS:Álcool Etilico. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	SEXO / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p
RAZÃO E/A (log [10])	Fêmeas/06	272,34±227,68	92,95	0,1183
	Machos/08	119,01±121,91	43,10	
ESTRÓGENOS	Fêmeas/06	1018,04±338,25	138,09	0,2749
	Machos/08	840,29±262,83	92,92	
ANDRÓGENOS (log [10])	Fêmeas/06	6,63±4,57	1,86	0,0914
	Machos/08	20,90±18,79	6,64	

TABELA – 2 Noventa e cinco por cento de Intervalo de Confiança para a média com os dados transformados das aves do grupo do Criadouro. São Paulo – 2002.

FATOR (pg ou ng/g fezes)	SEXO / N° DE AVES	MÉDIA / DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	p	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
RAZÃO E/A (raíz quadrada)	Fêmeas/23	31,01±8,13	1,70	< 0,0001	27,49	34,52
	Machos/27	16,52±8,65	1,66	< 0,0001	13,10	19,94
ESTRÓGENOS (log [10])	Fêmeas/23	6,68±0,66	0,14	< 0,0001	6,39	6,96
	Machos/27	6,66±0,80	0,15	< 0,0001	6,34	6,98
ANDRÓGENOS (1/raíz quadrada)	Fêmeas/23	0,85±0,17	0,04	< 0,0001	0,78	0,93
	Machos/27	0,55±0,32	0,06	< 0,0001	0,43	0,68