

CLAUDIA CARVALHO DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE FÊMEAS DE
PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*, NATTERER,
1883), MANTIDAS EM CATIVEIRO, POR MEIO DA EXTRAÇÃO E
DOSAGEM DE ESTERÓIDES FECALIS**



T.1387
FMVZ
e.1



São Paulo
2004

CLAUDIA CARVALHO DO NASCIMENTO

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300026444

Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

2142

N.º CLASSIFICAÇÃO
3142
N.º TOMBO
023154

1390554

São Paulo
2004

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.1387
FMVZ

Nascimento, Claudia Carvalho do

Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais / Claudia Carvalho do Nascimento : C. C. Nascimento, 2004.

113 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Sirenia. 2. Hormônios sexuais. 3. Radioimunoensaio.
I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: NASCIMENTO, Claudia Carvalho

Título: Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Data: 25 / 06 / 04

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. VERA MARIA FERREIRA DA SILVA Instituição: INPA - AM

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. MARCELO A. DE A. VAZ GUIMARÃES Instituição: FMVZ - USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA Instituição: FMVZ - USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADA

*“ Se não houver frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houver folhas, valeu a intenção das sementes”*

Henfil

Dedicatória

Aos meus pais Cláudio e Lélia pelo amor e apoio incondicional e por sempre estarem ao meu lado.

A minha querida avó Neuza e avô Zeca (in memoriam) pelos esforços, suporte e amor que me fizeram chegar até aqui....Sem ela seria impossível trilhar este caminho.

Aos meus amados avós Syllas e Tica pelo carinho e dedicação.

Ao meu querido irmão Cláudio Roberto e minha cunhada Jucélia por terem me dado o melhor presente da minha vida, a Izabella.

A minha querida afilhada Ana Luíza por sempre me fazer sorrir e alegrar a minha existência.

À toda a minha Família por serem um porto seguro para minha vida.

E aos peixes-bois da Amazônia por terem transformado os meus sonhos em realidade .

Agradeço,

Ao Prof Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, pela oportunidade, orientação, suporte e incentivo na minha vida profissional. Pela sua compreensão e paciência nos meus momentos difíceis e principalmente por sempre acreditar na minha capacidade.

A Dra Vera Maria Ferreira da Silva, pela amizade e dedicação na minha formação pessoal. Por ter me mostrado a seriedade e um exemplo a seguir na pesquisa dos mamíferos aquáticos. Pelo suporte técnico-científico e financeiro, que sem estes seria impossível a realização do meu projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 01/11356-2) pela bolsa de estudos, que sem este apoio não seria possível à realização deste projeto.

Ao Programa Piloto de Proteção às Florestas Tropicais – Ministério da Ciência e Tecnologia (PPG-7 64.99.0438.00- Conservação e manejo do peixe-boi da Amazônia), pelo suporte financeiro necessário à realização deste estudo.

Ao Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Centro de Pesquisas e Preservação dos Mamíferos Aquáticos - Manaus Energia/S.A., pela parceria na realização deste projeto.

Ao IBAMA /Manaus, e ao Ministério da Agricultura – Manaus, pelas licenças e atenção dispensada para que este projeto fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães pela oportunidade e por participar, incentivar e acreditar nos meus projetos....

Ao Médicos veterinários José Anselmo d’Affonseca Neto, Stella Maris Lazzarini e Márcia Picanço pela amizade e supervisão das coletas durante o meu projeto.

Ao Dr. Fernando C. W. Rosas pela amizade e apoio ao meu projeto. A minha admiração, respeito.

Aos tratadores do Laboratório de Mamíferos Aquáticos: Chemerson, Raimundo, Marcelo, Daniel e Nazaré, e os estagiários e tratadores do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos Manaus Energia/S.A: Bruno, Jackeline, José Domingos, José Hugo, Ednaldo e Denildo.

Aos meus queridos amigos do coração: *Mariângela Zanini (Caipora)*, *João Carlos Gomes Borges*, *Flaviana Guião Leite*, *João Rossi*, *Carolina H. Riccó*, *Lílian Rangel de Castilhos*, *Débora C. Rodini*, *Alexandre Bastos (Medonho)*, *Maurício Talebi*, *Silvia Nery Godoy (Sofia)*, *Dalton M. Novaes*, *André T. Damasceno*, *Flávia N. P. Margalho (Minhoca)*, *Fernanda Camargo*, *Beatriz Couto*, obrigado pela paciência, carinho, incentivo e apoio incondicional nos meus momentos difíceis.

As minhas queridas amigas do Projeto BioPesca: *Carolina Pacheco Bertozzi*, *Valéria Ruoppolo*, *Juliana Marigo*, *Flávia Miranda*, *Janaína Andréia Ribeiro* e *Juliana Viotto S. Lima*, pelo carinho, amizade e por permitirem que eu faça parte de uma idéia tão linda tornando nossos sonhos em realidade.

À técnica laboratorial *Érika Cristiane Gutierrez Felipe* do Laboratório de Dosagens Hormonais (FMVZ USP), por todo suporte e dedicação para a execução deste trabalho. Agradeço também pelo carinho e amizade.

A minha querida prima *Fabiana de Carvalho Pedreira* e a todos os outros estagiários no Laboratório de Dosagens Hormonais FMVZ USP que contribuíram na realização de toda a fase laboratorial deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Mamíferos Aquáticos: *Gália Ely de Mattos*, *Andréia Catanhede*, *Fernanda Rosa Rodrigues*, *Renata Santoro Lima*, *Yara Rocha Camargo*, *Nildon*, *Zé Pena*, muito obrigado pelo convívio, carinho, amizade e todas as formas de ajuda que vocês me proporcionaram.

Aos queridos amigos da República Casa dos Artistas: *Guilherme (Massaranduba)*, *Heitor*, *Leandro (Gabiru)*, *Adamo*, *Paulo*, *Levi* e *Alexandre (Mapinguari)* muito obrigado pela estadia, pelos momentos divertidos, festas e passeios da paulicéia desvairada em Manaus.

Aos amigos pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal: *Tatiana*, *Priscila*, *Marie*, *Patrícia*, *Rogério*, *Vinícius*, *Eduardo*, *Regina*, *Karina*, *Paola*, *Luciana*, *Thiesa*, *Marcílio*, *Nélcio*, e *Adriana*, muito obrigado pelo convívio e amizade; especialmente ao *André Monteiro da Rocha* pelas idéias e incentivo no início da minha pós-graduação.

Aos queridos amigos do mar: *Msc. José Martins da Silva Jr.*, *Prof. Dr. Otto Bismarck F. Gadig*, *Dr. Ricardo Garla* e *M.V. Rodolfo Silva (Neneco)* e *Dr. Anthony R. Martin*, que contribuíram no meu caminho e formação, obrigado pelo carinho e amizade.

Aos amigos que contribuíram na minha formação em animais selvagens e que acreditaram no meu potencial: *Prof. Dra. Maria Denise Lopes, Profa. Dra. Mariângela Lozano Cruz, Prof. Dr. Stélio Pacca Loureiro Luna, Msc Adauto Luis Velloso Nunes, Msc Rodrigo H. Teixeira, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, Dr. Ubiratan Piovezan, Msc José H. Fontenelle, Prof. Dr. José Luis Catão Dias, Prof. Dra. Eliana Reiko Matushima, Prof. Dra. Sílvia Cortopassi, Dr. Jean Ramos da Silva, Msc. Fernanda Marvullo* meu respeito e minha admiração.

Ao suporte estatístico dado pelo meu amigo *Alexandre T. Damasceno*.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ USP, especialmente aos professores *Dr. Renato Campanarut Barnabé* e *Dr. José Antônio Visintin* pelo carinho e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ USP, *Thais, Silvia, Harumi, Alice* e a ex-funcionária *Daura* pela ajuda primordial em todos os momentos.

Aos *funcionários da Biblioteca* da FMVZ USP pela colaboração na pesquisa bibliográfica e pela formatação final deste trabalho.

Agradeço a todos os que *acreditaram* em mim e também aos que *duvidaram*....

"Minha vida é andar por este país para ver se um dia eu descanso feliz, guardando as recordações das terras onde passei. Andando pelos sertões e dos amigos que lá deixei. Chuva e sol, poeira e carvão, longe de casa sigo roteiro mais uma estação. E alegria no coração. Minha vida é andar... Mar e terra, inverno e verão, mostra o sorriso, mostra a alegria, mas eu mesmo não. E a saudade no coração. Minha vida é andar...."

(Luiz Gonzaga e Hervê Cordovil)

RESUMO

NASCIMENTO, C. C. Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais. [Reproductive assessment in captive females of Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), by fecal steroid extraction and quantification]. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

Neste estudo avaliou-se a função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidas em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (n=4) e no Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos – Manaus Energia S.A. (n=2), por meio da extração e quantificação de progestinas e estrógenos fecais. As amostras fecais foram colhidas duas vezes por semana durante doze meses, foram liofilizadas e processadas de acordo com o protocolo adaptado de Schwarzenberger et al (1991). Realizou-se a validação dos radioimunoensaios em fase sólida, progesterona e 17 β -estradiol para o uso em extratos fecais de peixe-boi da Amazônia. A duração média do ciclo ovariano (\pm EPM) definido por dois picos consecutivos de estrógenos fecais foi de $22,49 \pm 1,26$. A fase de estro teve duração média de $6,4 \pm 0,45$. Para verificar se as fêmeas mantidas em cativeiro apresentavam o padrão reprodutivo sazonal dos peixes-bois de vida livre sugerido por Best (1982), avaliou-se a influência das fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica. Não foi observada diferença estatística nas concentrações de progestinas fecais ao longo das fases do ciclo hidrológico, porém verificou-se que durante a fase de cheia apresentaram concentrações de estrógenos fecais superiores às outras fases, corroborando com os dados sugeridos por Best (1982). Com os resultados obtidos nesse estudo, pretende-se ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia, fornecendo mais uma ferramenta de estudo para auxiliar pesquisas e manejo reprodutivo, tendo como objetivo final a conservação da espécie.

Unitermos: Peixe-boi da Amazônia. Esteróides sexuais. Fezes. Radioimunoensaio.

ABSTRACT

NASCIMENTO, C. C. **Reproductive assessment in captive females of Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), by fecal steroid extraction and quantification.** [Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais]. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

This study has evaluated the reproductive function of six females of the Amazon manatee (*Trichechus inunguis*) kept in captivity at the Aquatic Mammals Laboratory – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (n=4) and Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos-Manaus Energia S/A (n=2) through extraction and quantification of fecal estrogens and progestins. Fecal samples were obtained twice a week for 12 months. Validation of the solid phase radioimmunoassay for progesterone and 17 β -estradiol was performed for using on Amazon manatees fecal extracts. Ovarian cycle mean duration (\pm SEM), defined by two consecutive peaks of fecal estrogens, was 22,49 \pm 1,26 days. Mean estrous phase duration was 6,4 \pm 0,45 days. To verify if the captive females showed the same seasonal reproductive pattern of wild manatees suggested by Best (1982), the influence of the hydrological cycle of the Amazon River Basin was analyzed. There was no statistical difference on the fecal progestins between phases, but during the flood phase it was verified that the estrogen fecal concentrations were increased, corroborating with Best (1982). These results show that the improvement of the non-invasive techniques for reproductive assessments increase the knowledge of reproductive physiology and is an important tool for scientific research, reproductive management, and species conservation.

Uniterms: Amazon manatee. Sexual steroids. Fecal. Radioimmunoassay.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem de água em amostras aleatórias de fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>), mantidas em cativeiro.....	57
Tabela 2 -	Concentração de progestinas (P4 ng/g fezes úmidas) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) submetidas à extração pelo protocolo Brown et al. (1994) utilizando fezes úmidas (Protocolo 1) e liofilizadas (Protocolo 2).	58
Tabela 3 -	Concentração de metabólitos de estrógenos (E2 pg/g fezes úmidas) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) submetidas à extração pelo protocolo Brown et al. (1994) utilizando fezes úmidas (Protocolo 1) e liofilizadas (Protocolo 2).	59
Tabela 4 -	Concentração de progestinas (P4 ng/g fezes) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) submetidas à extração pelos protocolos Schwarzenberger et al. (1991) adaptado utilizando fezes úmidas (Protocolo 3) e liofilizadas (Protocolo 4).	59
Tabela 5 -	Concentração de progestinas (P4 ng/g fezes secas) e metabólitos de estrógenos (E2 pg/g fezes secas) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) submetidas à extração pelo protocolo Schwarzenberger et al. (1991) adaptado utilizando fezes secas (Protocolo 4).	59
Tabela 6 -	Comparação entre os protocolos de extração de progestinas e estrógenos fecais de amostras aleatórias de peixe-boi da Amazônia.	60
Tabela 7 -	Concentração de progestinas fecais nas diversas fases de extração no protocolo desenvolvido por Schwarzenberger et al. (1991) adaptado, com diluição 1:10 em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).....	61
Tabela 8 -	Comparação entre as diversas fases de extração de progestinas fecais no protocolo desenvolvido por Schwarzenberger et al. (1991) adaptado, com diluição 1:10 em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	61
Tabela 9 -	Controle de Qualidade obtido nos ensaios de progestinas fecais em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	63
Tabela 10 -	Controle de Qualidade obtido nos ensaios nos ensaios de metabólitos de estrógenos fecais em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	63

Tabela 11 -	Valores basais, valores elevados e pico dos metabólitos de estrógenos fecais para cada fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	64
Tabela 12 -	Valores basais e elevados de progestinas fecais para cada fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	64
Tabela 13 -	Duração do estro e do ciclo estral (em dias \pm EPM) para fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	65
Tabela 14 -	Comparação das concentrações de progestinas fecais entre os manejos realizados com a fêmea de peixe-boi da Amazônia Boo, através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer. ..	71
Tabela 15 -	Comparação das concentrações de estrógenos fecais entre os manejos realizados com a fêmea de peixe-boi da Amazônia Boo através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer. ..	71
Tabela 16 -	Determinação das fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica, tendo como base os dados da estação hidrológica das Missões na região de Tefé (AM), de 1991 à 2004 (Dados Projeto Boto e Instituto Mamirauá).	73
Tabela 17 -	Concentrações médias e erro padrão da média de estrógenos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>), nas diversas fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia amazônica.	73
Tabela 18 -	Comparação das concentrações estrógenos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia nas diversas fases do ciclo hidrológico da bacia dos rios amazônicos, através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer.	74
Tabela 19 -	Concentrações médias de progestinas fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>), nas diversas fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica	76
Tabela 20 -	Comparação das concentrações estrógenos fecais da fêmea de peixe-boi da Amazônia Tukano, nas diversas fases do ciclo hidrológico da bacia dos rios amazônicos, através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer	78
Tabela 21 -	Metabólitos dosados no conjunto diagnóstico comercial DPCmedlab..	113

LISTA DE FIGURAS

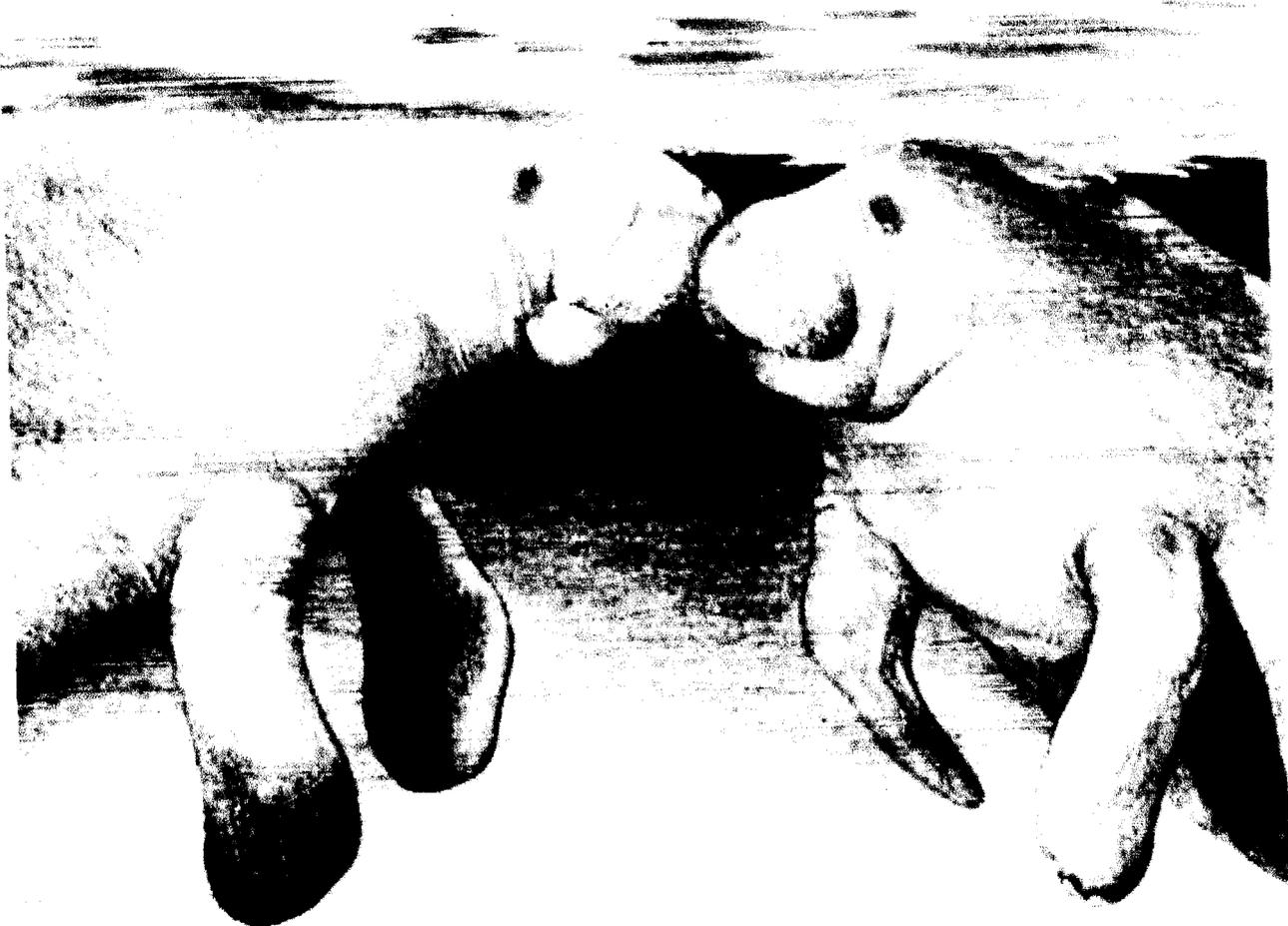
Figura 1 -	Peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).- Fonte: Perrin, D.	21
Figura 2 -	Mapa da distribuição do Peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) no Brasil e do peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>). Fonte: Sousa-Lima, 1999).	23
Figura 3 -	Vista lateral dos tanques do Laboratório de Mamíferos Aquáticos – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.....	43
Figura 4 -	Vista superior de um tanque do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos- Manaus Energia S/A.	43
Figura 5 -	Procedimento para coleta de fezes de peixe-boi da Amazônia.....	48
Figura 6 -	Fezes de peixe-boi da Amazônia.....	48
Figura 7 -	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progesterina fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) utilizando matriz íntegra.	62
Figura 8 -	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para metabólitos de estrógenos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) utilizando matriz íntegra.	62
Figura 9 -	Representação gráfica da duração do estro e ciclo estral em dias, em fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).	65
Figura 10 -	Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) Aira, com 7.5 anos de idade, entre março de 2002 à fevereiro de 2003.	66
Figura 11 -	Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>), Miri com 7.5 anos de idade, entre março de 2002 à fevereiro de 2003.	67
Figura 12 -	Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) Cunhataí, com 7,5 anos de idade, entre março de 2002 e fevereiro de 2003.	68
Figura 13 -	Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) Cambá, em cativeiro por 18 anos, entre março de 2002 e fevereiro de 2003.	69

Figura 14 -	Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) Boo com 28 anos de idade, entre março de 2002 e fevereiro de 2003.	70
Figura 15 -	Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) Tukano, com 18 anos de cativeiro, entre março de 2002 e fevereiro de 2003.	72
Figura 16 -	Influência do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica (Missões-Tefé, altura em metros) sobre as concentrações médias semanais de estrógenos fecais (E2 pg/g fezes secas) de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>), mantidas em cativeiro.	75
Figura 17 -	Influência do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica (Lago das Missões - Tefé, profundidade em metros) sobre as concentrações médias semanais de progestinas fecais (P4 ng/g fezes secas) de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>), mantidas em cativeiro.	77

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	OS SIRÊNIOS.....	20
2.2	O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA (<i>Trichechus inunguis</i>).....	21
2.3	COMPORTAMENTO.....	25
2.4	ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS SIRÊNIOS.....	26
2.4.1	MATURIDADE SEXUAL.....	31
2.4.2	GESTAÇÃO.....	33
2.4.3	SAZONALIDADE.....	35
2.5	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA POR MÉTODOS NÃO- INVASIVOS	38
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	ANIMAIS.....	42
4.2	DESCRIÇÃO DOS TANQUES.	42
4.3	HISTÓRICO DOS ANIMAIS.....	44
4.4	COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS FECALIS	48
4.5	LICENÇAS DE TRANSPORTE DAS AMOSTRAS FECALIS.....	49
4.6	PROCESSAMENTO DA AMOSTRA – EXTRAÇÃO HORMONAL.....	49

4.7	DOSAGEM HORMONAL.....	52
4.8	VALIDAÇÃO.....	52
4.9	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA.....	53
4.10	SAZONALIDADE	54
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5	RESULTADOS.....	57
5.1	DETERMINAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO.....	57
5.2	VALIDAÇÃO.....	62
5.3	PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS RADIOIMUNOENSAIOS.....	63
5.4	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA.....	64
5.5	SAZONALIDADE	73
6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	93
	ANEXOS	113



Introdução



1. INTRODUÇÃO

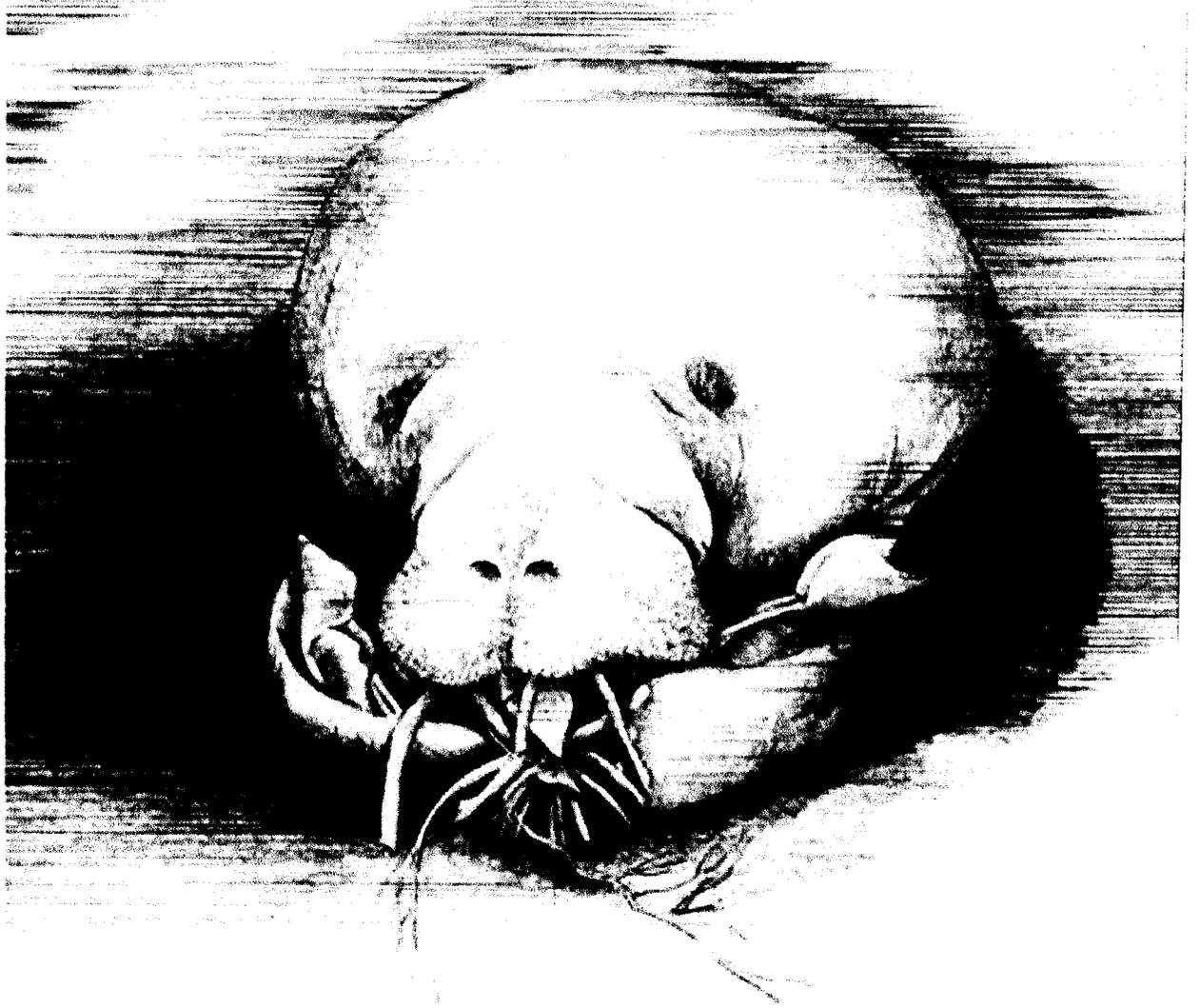
O peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) sofre uma grande pressão antrópica, sendo ainda utilizado pelos ribeirinhos como recurso alimentar. Durante a caça de subsistência, fêmeas e filhotes são mais vulneráveis. A espécie possui uma baixa taxa reprodutiva e pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva, principalmente no que se refere aos estudos de dosagens hormonais. Deste modo, o estudo da fisiologia reprodutiva é fundamental para determinação correta do atual potencial reprodutivo dos peixes-bois mantidos em cativeiro, além de ampliar o conhecimento e permitir a avaliação dos processos fisiológicos que ocorrem com peixes-bois de vida livre. O melhor entendimento do ciclo estral, aumentará as chances de reprodução, pois é possível identificar as flutuações hormonais sazonais, indicando os períodos sensíveis e propícios para cópula. Além destes fatores, o claro entendimento da fisiologia reprodutiva permite diagnosticar os indivíduos aptos ou não a um programa de reprodução em cativeiro, e em uma análise ampla pode demonstrar a viabilidade de uma população cativa. A compreensão destes padrões endócrinos e suas inter-relações com a função reprodutiva são essenciais para o sucesso da reprodução desta espécie em cativeiro.

O presente estudo teve como principal objetivo a realização da extração e quantificação de esteróides sexuais de amostras fecais por técnicas de radioimunoensaio (R.I.E.), de um grupo de fêmeas adultas de peixe-boi da Amazônia, mantidas em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CPPMA) – Manaus Energia/S.A, relacionando os valores obtidos ao estado



reprodutivo. As concentrações hormonais foram comparados ao ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica, para verificar se as fêmeas em cativeiro mantinham um perfil hormonal sazonal.

Com os resultados obtidos nesse estudo, pretende-se ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva do peixe-boi da Amazônia, fornecendo mais uma ferramenta de estudo para auxiliar futuras pesquisas que visem a incrementação de informações e técnicas, tendo como objetivo final a conservação da espécie .



Revisão de literatura



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS SIRÊNIOS

Os sirênios representam uma ordem única de mamíferos aquáticos herbívoros com inúmeras adaptações ao ambiente aquático. Domning e Hayek (1986), sugerem que a ordem Sirenia tenha surgido entre 45 a 50 milhões de anos atrás, no médio Eoceno, mas a diversificação tenha ocorrido no Mioceno (DOMNING, 1982).

A ordem Sirenia é filogeneticamente relacionada com as ordens Proboscidea (elefantes) e Hyracoidea (hyrax). Esta proximidade filogenética da superordem Paengulata (proboscídeos, sirênios e hyraxes) foi sugerida pela análise das seqüências de aminoácidos do cristalino (DE JONG; ZWEERS, 1980; MIYAMOTO; GOODMAN, 1986), por estudos morfológicos (NOVAREK; WYSS; MACKENNA, 1998), e pelo estudo de seqüências nucleotídicas (DE JONG, 1998; SPRIGER; KIRSCH, 1993; LAVERGNE et al., 1996; SHOSHANI; MACKENNA, 1998).

Os sirênios recentes estão incluídos em duas famílias: a Dugongidae, com uma única espécie *Dugong dugon* (dugongo) e a Trichechidae constituída por três espécies: *Trichechus manatus* (peixe-boi marinho), *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano) e *Trichechus inunguis* (peixe-boi da Amazônia) (NISHIWAKI; MARSH; 1985). A espécie *Trichechus manatus* é dividida em duas subespécies: *Trichechus manatus manatus* (peixe-boi das Antilhas) e *Trichechus manatus latirostris* (peixe-boi da Flórida) (DOMNING; HAYEK, 1986; MARSH; O'SHEA; BEST, 1986).



2.2 O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*)

Trichechus inunguis, o peixe-boi da Amazônia (Figura 1) é o único sirênio exclusivamente de água doce (BEST, 1984; CALDWELL; CALDWELL, 1985; DA SILVA, 1996; MARSH, O'SHEA; BEST, 1986; ROSAS, 1994).



Figura 1 - Peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*). - Fonte: Perrin, D.

O peixe-boi da Amazônia é o menor dos sirênios, medindo cerca de três metros de comprimento total e pesando aproximadamente 450 kg quando adulto. Possui uma coloração cinza escuro com manchas brancas ou róseas na região ventral características da espécie (CALDWELL; CALDWELL, 1985; HUSSAR, 1977, RONALD; SELLEY; AMOROSO, 1978; ROSAS, 1994), embora alguns indivíduos podem não apresentar essa mancha. Ao contrário das outras espécies da ordem Sirenia, não possui unhas (CALDWELL; CALDWELL, 1985; JEFFERSON,



LEATHERWOOD; WEBBER, 1993), seus dentes molares são menores e mais complexos, além do osso supraoccipital ser mais espesso (DOMNING; HAYEK, 1986). É totalmente herbívoro, não ruminante e alimenta-se de uma grande variedade de plantas aquáticas e semi-aquáticas (BEST, 1981; COLARES; COLARES, 2002). Preferencialmente permanece em águas calmas, lagos e lagoas com temperaturas variando entre 22°C e 30°C, com presença de vegetação aquática abundante (BEST, 1982).

Essa espécie é endêmica da Bacia amazônica distribuindo-se desde os rios na Colômbia, Equador e Peru, inclusive na desembocadura com o Atlântico e imediações da ilha de Marajó (Brasil), sendo a costa do Amapá citada como área de simpatria com o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) (BEST, 1984; DOMNING, 1981; ROSAS, 1994; TIMM; ALBUJA; CLAUSON 1986;).

No Brasil, esta espécie tem sido encontrada nos principais tributários do Amazonas como por exemplo, no baixo Tocantins, rios Tapajós, Nhamundá, Madeira, Negro, Xeruni, Branco e Purus. Não existem relatos nos altos rios Orinoco e Negro (BEST, DA SILVA, 1983), entretanto, raramente aparece nos altos rios Tocantins, Xingu e Tapajós (BERTRAM; BERTRAM, 1973, DOMNING, 1981). Também tem sido encontrado no rio Tacutu (Roraima) e nos rios Essequibo e Rupununi na Guiana (CATANHEDE, 2002) (Figura 2). Na Colômbia ocorre nos rios Amazonas, Putamayo, Caquetá (Japurá no Brasil) e baixo Apaporis. No Peru, já foi observado nos rios Napo, Tigre, Marañon, não tendo sido registrado a ocorrência no rio Madre de Dios na Bolívia. No Equador, os peixes-bois ocorrem nos rios Aguarico, Cuayabeno, Añangu, na confluência dos rios Grande e Cuyabeno e nos lagos Zancudococha, Inuya e Lorococha (TIMM; ALBUJA; CLAUSON, 1986).



Estudos filogeográficos do peixe-boi da Amazônia, empregando o D-loop como marcador molecular, e comparando-se seis áreas da Bacia amazônica revelou uma alta variabilidade genética, mostrando que, em geral, existe um alto fluxo gênico entre indivíduos nas diferentes áreas, não existindo populações reprodutivamente isoladas. Ainda foi encontrado um indivíduo da espécie *Trichechus inunguis* na região estuarina no Pará, proximoamente relacionado com os haplótipos de *Trichechus manatus*, sugerindo a manutenção de um polimorfismo ancestral (CATANHEDE, 2002).



Figura 2 - Mapa da distribuição do Peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) no Brasil e do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*). Fonte: Sousa-Lima (1999).



O peixe-boi da Amazônia consta na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como vulnerável (IBAMA, 1989; MMA, 2003) e do Apêndice I da CITES (2000). Encontra-se classificado na categoria "vulnerável dependente de conservação" na classificação da IUCN – The World Conservation Union (HILTON, 2000).

No Brasil, as seguintes medidas legais estão relacionadas à proteção do peixe-boi da Amazônia: Decreto nº 78.802 de 23/11/1976 - Acordo para a Conservação da Flora e da Fauna dos Territórios Amazônicos (Brasil e Peru); Decreto Legislativo nº 69 de 18/10/1978 - Tratado de Cooperação Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela); Decreto nº 3.179 de 21/10/1999 – Regulamentação da Lei de Crimes Ambientais e a Portaria SUDEPE nº N-11 de 21/02/1986 – Proibição da aça, pesca ou captura de pequenos cetáceos, pinípedes e sirênios.

A espécie é protegida desde 1973 no Peru, por meio de um decreto 934-73-AG e pelo Regulamento do Ordenamento Pesqueiro da Região Amazônica Peruana (R.M. nº 147-2001-PE) de 30/04/2001. No Equador está protegido de acordo com a Resolução nº 105 do Ministério do Ambiente (Registro oficial nº 5 de 28/01/200), proibindo todo e qualquer tipo de caça e atividade comercial por um período indefinido. Na Colômbia pela Resolução do INDERENA nº 574 de 1969 que estabelece a proibição da caça de maneira permanente para as duas espécies de peixe-boi.

Domning (1982) e Silveira (1988), citam que relatos antigos da caça do peixe-boi da Amazônia estão relacionados ao abate para o consumo da carne pelas populações humanas nativas, e o indicam como produto de exploração comercial,



estimando que cerca de 4.000 a 10.000 peixes-bois foram mortos no Brasil com propósitos comerciais entre 1935 e 1960.

Best (1984) e Reeves e Leatherwood (1996) ressaltam que a carne e a gordura do peixe-boi da Amazônia constitui um item alimentar comum das populações indígenas e dos caboclos ribeirinhos da região amazônica. Apesar da existência das medidas legais acima citadas, a caça comercial e de subsistência ainda persiste (BEST, 1982; BEST 1984; LAZZARINI et al., 1998; ROSAS, 1994). Na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (AM), estimativas indicam o abate de pelo menos 142 peixes-bois da Amazônia entre o fim de 1993 e início de 1996, numa área de 200.000 hectares (MARMONTEL; ROSAS, 1996).

2.3 COMPORTAMENTO

Diferentemente de alguns mamíferos aquáticos, os sirênios não formam grupos sociais estáveis, sendo considerados semi-sociais. Interações entre os indivíduos não se caracterizam por longos períodos ou permanente, sendo a relação mãe-filhote a única mais longa (HARTMAN, 1979; REYNOLDS, 1981), estimada para o peixe-boi da Flórida entre um e dois anos (HERNANDEZ, 1995; RATHUN et al, 1995; REID; BONDE; O'SHEA, 1995).

Observações do movimento, padrões de dispersão e a atividade dessa espécie na natureza são extremamente difíceis, devido ao seu comportamento arisco, mergulho discreto e pela turbidez das águas dos rios e lagos que habitam (BEST, 1981, 1982, 1983, DA SILVA, 1996; ROSAS, 1994).

Rosas (1994) considera os peixes-bois da Amazônia animais relativamente solitários, apresentando pouca ou nenhuma interação com os outros animais na



mesma área, sendo a única estrutura social duradoura a entre mãe e filhote, e que pode durar no mínimo dois anos (DA SILVA et al, 2000). Segundo Best (1984) ocorrem agregações durante o período reprodutivo e durante a estação de seca, quando os animais permanecem nas áreas mais profundas dos corpos d'água.

Os peixes-bois da Amazônia se movimentam sazonalmente entre lagos e rios, retornando para a mesma área de várzea durante a enchente e a cheia para se alimentar, evidenciando um certo grau de fidelidade por uma determinada área. Durante a vazante deslocam-se para os lagos mais profundos onde permanecem protegidos durante toda a estação seca (BEST, 1983). Mostra uma nítida preferência por áreas com abundância de vegetação flutuante mas também utilizam para alimentação áreas de igapó com profundidade de um a dois metros (BEST, 1981).

Outros estudos sobre comportamento foram conduzidos por Sousa-Lima et al. (1999, 2000 a, 2000 b, 2001, 2002) avaliando os sinais acústicos como uma forma de comunicação.

2.4 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS SIRÊNIOS

O entendimento dos processos reprodutivos é a base para o desenvolvimento de programas de reprodução em cativeiro em longo prazo, contribuindo de forma efetiva para conservação das espécies (ASA, 1996). O estudo reprodutivo do peixe-boi da Amazônia vem sendo realizado de três maneiras: análise de material biológico coletado de carcaças; monitoramento do histórico reprodutivo de indivíduos de vida livre marcados durante o seu período de vida (estudos longitudinais) e estudo de indivíduos no cativeiro (BEST, 1981, 1982; BEST; CATANHEDE, 2002; DA SILVA, 1983; DA SILVA; D'AFFONSECA NETO; RODRIGUES, 1998; DA SILVA et



al, 2000; RODRIGUES-CHACÓN, 2001; RODRIGUES, 2002; ROSAS, 1994, ROSAS; MARMONTEL, 1996).

Dados obtidos de carcaças, embora ainda sejam amplamente utilizados e forneçam importantes informações, podem ser interpretados erroneamente, pois uma série de fatores interferem na amostragem total. Por exemplo, a caça pode ser seletiva ou direcionada como ocorre com fêmeas prenhes de dugongos, já que estas são preferidas como presas pois apresentam uma camada de gordura mais espessa. Outro fato é que informações relativas a reprodução obtidas de carcaças dependem da estação do ano e da idade do animal (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999).

Estudos longitudinais de sirênios selvagens são baseados na identificação dos indivíduos com marcas naturais ou marcados, que podem ser facilmente visualizadas e fotografadas, sendo favorecido nos sítios de agregação e em águas claras (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999). Porém este tipo de estudo é muito difícil de ser realizado com o peixe-boi da Amazônia, não só devido o comportamento conspícuo da espécie, mas principalmente pelas más condições de visibilidade e turbidez da água dos rios que compõem a bacia amazônica.

Animais em cativeiro são uma pequena amostra da população selvagem. Nesta condição oferecem muitas vantagens, pois os animais são manejados diariamente possibilitando uma série de estudos (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999), contribuindo para o maior conhecimento da espécie e aplicação dos resultados em populações selvagens e vida livre.

O conhecimento sobre a biologia reprodutiva das quatro espécies de sirênios é variado. As subespécies de peixe-boi marinho são muito distintas (DOMNING; HAYEK, 1986) e os esforços foram concentrados no estudo do peixe-boi da Flórida,



sendo: (1) estudos longitudinais de observação da história de vida de mais de 700 animais selvagens identificados (O'SHEA; HARTLEY, 1995; O'SHEA; LANGTIMM, 1995; RATHBUN et al, 1995; REID et al., 1995); (2) na necropsia de mais de 2000 indivíduos obtidos entre 1976 e 1991 pelo United States Stranding Network (O'SHEA; ACKERMAN, 1995); a avaliação de 67 machos (HERNANDEZ et al., 1995) e 275 fêmeas (MARMONTEL, 1995) com idades estimadas; e (3) observações de peixes-bois em cativeiro incluindo o nascimento de 28 filhotes (ODELL et al., 1995). Em contraste, existem poucos dados publicados da subespécie de peixe-boi das Antilhas, que ocorre no litoral do Brasil (*Trichechus manatus manatus*) (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999).

Informações sobre a biologia reprodutiva dos dugongos provêm da análise de material coletado de mais de 1400 carcaças (BERTRAM; BERTRAM, 1973; MARSH; 1980, 1995), e de observações de comportamento (PREEN, 1989). Dugongos mantidos em cativeiro nunca se reproduziram (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999).

O estudo de peixes-bois da Amazônia em cativeiro já existe há muitos anos (BEST et al, 1982) e já foram registrados quatro nascimentos em cativeiro (DA SILVA et al., 2004). Rodrigues (2002) descreveu as características anatômicas e histológicas do aparelho reprodutor feminino de três animais de diferentes idades. Dados da biologia reprodutiva desta espécie na natureza são escassos, assim como são raros dados sobre o peixe-boi africano (*T. senegalensis*) sendo o trabalho de Nishiwaki (1984) uma referência importante sobre a espécie.

Os sirênios exibem um pequeno dimorfismo sexual e a distância entre a fenda genital e o ânus é a chave para se determinar o sexo. Nas fêmeas a fenda genital está próxima do ânus e nos machos a fenda está próxima à cicatriz umbilical. Ambos os sexos possuem duas mamas localizadas na inserção ventral das nadadeiras



peitorais. O tamanho das mamas varia de acordo com o estado fisiológico do animal (RODRIGUES, 2002).

Estudos detalhados sobre a anatomia e histologia do aparelho reprodutor feminino de fêmeas da ordem Sirenia foram realizados por Marsh, Heinsohn e Channels (1984) em dugongos, Marmontel (1988) em peixe-boi da Flórida e Rodrigues (2002) com peixe-boi da Amazônia.

Segundo Rodrigues (2002), a genitália externa de fêmeas de peixe-boi da Amazônia é constituída pelos grandes lábios vulvares, clitóris e vestibulo. Estando a porção mais externa do aparelho reprodutor feminino, localizado na porção caudal da cavidade abdominal. O hímen consiste numa dobra espessa de mucosa, de formato arredondado, com coloração esbranquiçada, localizada na extremidade superior do vestibulo atravessando-o obliquamente e obliterando a entrada da vagina. Esta estrutura é revestida por uma mucosa de superfície irregular devido à presença de numerosos lobos e pequenos sulcos. O útero é bicornual e está localizado entre a bexiga e o reto, como todas as espécies desta Ordem (RODRIGUES, 2002; ROMMEL; LOWENSTINE, 2001). O corpo uterino é pequeno, sendo característico dos sirênios e pode explicar o fato do desenvolvimento fetal ocorrer no interior dos cornos uterinos e não no corpo do útero (RODRIGUES, 2002), como proposto por Wislocki (1935). Em sirênios foram observadas alterações cíclicas do endométrio (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999; MARMONTEL, 1988; MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984), no qual a espessura desta camada e o tamanho, número e grau de enovelamento das glândulas endometriais variaram de acordo com a fase do ciclo reprodutivo. Rodrigues (2002) observou em uma fêmea de peixe-boi da Amazônia de seis anos de idade, a presença de muco no interior de algumas glândulas endometriais. Estas glândulas apresentavam-se relativamente



retas e o endométrio era mais espesso quando comparado com uma fêmea recém nascida.

A placenta é zonária, e as cicatrizes placentárias só foram observadas nos cornos uterinos de dugongos (MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984), e do peixe-boi da Flórida (MARMONTEL, 1988). Nos dugongos as cicatrizes placentárias permanecem ao longo da vida do animal, podendo ser utilizadas para estimar número mínimo de gestações que o animal já teve (MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984). O mesmo não foi encontrado para o peixe-boi da Flórida, pois nesta espécie, estas estruturas parecem ser efêmeras (MARMONTEL, 1988). pois esta estrutura não foi observado em uma fêmea com gestação conhecida. Portanto é preciso ter cuidado ao delinear o histórico reprodutivo pela cicatrizes placentárias, pois estas representam apenas os sítios de implantação fetal, não fornecendo garantias de que a gestação tenha sido levada a termo. Gestações ectópicas nunca foram registradas nesta ordem, pois a bolsa ovariana é completamente fechada, sendo improvável a ocorrência (RODRIGUES, 2002), bem como a migração trans-uterina (MARMONTEL, 1988; MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984), onde o ovário ativo corresponde ao corno distendido, cicatriz placentária ou feto.

Os ovários estão localizados na região lombar, na extremidade posterior da cavidade abdominal, posterolateral aos rins (RODRIGUES, 2002).

Corpos lúteos ou corpos albicans tem sido observados em ovário de fêmeas nulíparas de peixe-boi da Flórida e em dugongos (MARMONTEL, 1995; MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984;), sugerindo que estas fêmeas tenham vários ciclos estrais antes de conceberem. Este fato é sustentado no estudo realizado por Rodrigues (2002) com peixe-boi da Amazônia, no qual uma fêmea de seis anos apresentou os ovários ovalados com superfície irregular, principalmente no pólo



cranial, devido à presença de numerosos folículos ovarianos com diâmetros maiores do que os encontrados no restante da superfície do órgão. Nesta fêmea o ovário direito apresentou maior atividade que o esquerdo, sendo que os maiores folículos de Graaf (n= 13) foram encontrados no pólo cranial do ovário direito. Os diâmetros destes folículos de Graaf variaram de 2,7 a 8,6mm, ainda nesta localização foi encontrado um corpo hemorrágico indicando ovulação recente, porém não havia iniciado o processo de luteinização; e vários folículos atrésicos, corpos cicatriciais oriundos de folículos não rompidos e folículos rompidos (corpos albicans). Esta fêmea estava em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, desde de filhote, e não houve registro de gestação.

2.4.1 Maturidade Sexual

A determinação da idade de maturidade sexual é um parâmetro importante na avaliação da biologia populacional, porém é importante salientar a diferença desta com a idade da primeira concepção. Perrin e Reilly (1984) trabalhando com cetáceos desenvolveram um índice baseado no comprimento corporal e na idade, para se determinar a maturidade sexual por tratamentos matemáticos. Este método vem sendo utilizado para o peixe-boi da Flórida e dugongos (MARMONTEL, 1988, MARSH, 1995) porém não existem dados publicados com o peixe-boi da Amazônia, peixe-boi das Antilhas e o peixe-boi Africano.

Segundo Perrin e Reilly (1984) o critério mais usual para se determinar a maturidade sexual nas fêmeas de cetáceos é a primeira ovulação, evidenciada pela presença de corpo lúteo ou corpo albicans em um dos ovários. A maturidade sexual



para fêmeas de peixe-boi da Flórida foi estimada em cinco anos ou mais, embora algumas fêmeas estavam maduras aos dois anos e meio, mas geralmente não concebem antes dos sete anos de idade. Nesse estudo, a idade foi estimada pela contagem das camadas de crescimento do complexo do osso timpanoperiótico. (MARMONTEL, 1995). Odell et al. (1995), relataram a concepção de uma fêmea de 5,5 anos, mantida em cativeiro desde filhote. Já White e Francis-Floyd (1990) e Francis-Floyd et al. (1991), sugerem pela dosagem de progesterona e estrógeno sérico aliado à observação do comportamento, que a fêmea de peixe-boi da Flórida alcança a maturidade sexual entre cinco e seis anos de idade.

Os trabalhos de estimativa de maturidade sexual em dugongos são menos robustos do que os realizados com peixe-boi da Flórida. Já que a idade de maturidade sexual nessa espécie é variada. Em Townsville, Austrália, foi observado na natureza, uma fêmea nulípara de 9,5 anos de idade; porém em outras fêmeas, da mesma localidade, com 10 anos ou mais, todas possuíam ao menos uma cicatriz placentária no corno uterino, indicando gestação (MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984). Três fêmeas da Ilha de Mornington, Austrália, eram nulíparas com idades variando entre 15 a 17 anos e os dois ovários destes animais continham corpo lúteo ou corpo albicans. Mais recentemente uma fêmea da localidade de Daru, Papua Nova Guiné, concebeu o seu primeiro filhote aos 18 anos (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999).

Os machos de peixe-boi da Flórida atingem a maturidade sexual entre dois a três anos de idade. A espermatogênese nestes animais é sazonal. Um estudo histológico, mostrou que no inverno ocorre a regressão dos túbulos seminíferos, caracterizado por uma diminuição do diâmetro dos túbulos e a presença de células em estágio imaturo, sugerindo uma redução, mas não necessariamente uma



cessação, na habilidade de fecundar as fêmeas. O oposto foi observado nas outras estações do ano (HERNANDEZ et al., 1995). Estes autores sugerem que sejam realizadas pesquisas sobre os níveis hormonais sanguíneos e fecais para correlacionar com a maturidade sexual ou até com o estágio da espermatogênese, pois a testosterona é o centro controlador deste processo.

2.4.2. Gestação

Os Sirênios são geralmente uníparos (BANKS, 1997; MARMONTEL, 1988; MÜHLING, 1998; DA SILVA, D’AFFONSECA NETO; RODRIGUES, 1998, DA SILVA et al, 1998, DA SILVA, 1999, DA SILVA, 2002), e poliovulares (MARMONTEL, 1988; MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984), sendo que, excepcionalmente pode ocorrer o nascimento de gêmeos, registrado para o peixe-boi da Flórida (MARMONTEL, 1995; ODELL, et al., 1995; O’SHEA; HARTLEY, 1995; RATHBUN et al., 1995); dugongos (BERTRAM; BERTRAM, 1968) e para o peixe-boi das Antilhas (BANKS, 1997). Marmontel (1995), estimou uma incidência de 4% de nascimentos de gêmeos para o peixe-boi da Flórida. Isto leva a crer que a poliovulação neste grupo seja importante para fornecer um aporte de progesterona, pelos corpos lúteos, influenciando no crescimento máximo do endométrio uterino, preparando-se para a concepção (MARMONTEL, 1988; MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984). Marmontel (1995) relatou que no peixe-boi da Flórida pode-se observar 36,3 corpos lúteos por ovário em uma gestação.

Diversos métodos tem sido utilizados para estimativa do período de gestação dos sirênios. Odell et al. (1995) estimaram o período de gestação para o peixe-boi da Flórida entre 12 a 14 meses, com base no nascimento de 28 filhotes em cativeiro.



Rathbun et al. (1995) E Reid, Bonde; O'Shea (1995), obtiveram uma estimativa parecida a esta com observações de animais selvagens.

Da Silva et al (2004), Da Silva (2002) e Nascimento et al (2003), relataram três nascimentos de peixe-boi da Amazônia em cativeiro, sendo dois da fêmea Boo (27 anos de cativeiro) e um da Tukano (18 anos de cativeiro). Nascimento et al. (2003), colheram amostras de sangue destas fêmeas entre junho de 1998 a março de 2002. A quantificação hormonal foi realizada por radioimunoensaio em fase sólida, no Laboratório de Dosagens Hormonais – VRA-FMVZ-USP. No período anterior à gestação, as concentrações de progesterona plasmáticas encontravam-se basais (<0,02 ng/ml). No primeiro mês de gestação, foi observado aumento de 6,7ng/ml e 9,99ng/ml (Boo e Tukano respectivamente), seguido de um pico no segundo mês (Boo: 10,37ng/ml e Tukano: 13,58ng/ml). Após este pico, quantidades de hormônio foram decrescendo até o momento do parto, não sendo detectados no pós-parto imediato. As concentrações de progesterona plasmáticas, nas duas fêmeas, mantiveram-se elevadas durante aproximadamente 11 meses (média de 334 dias), indicando o tempo de gestação nestas fêmeas. As mesmas quantificações foram realizadas na terceira gestação da fêmea Boo (entre 2003-2004), sendo estimado 360 dias de gestação (NASCIMENTO; DA SILVA; OLIVEIRA, 2004). Este trabalho corrobora o que foi sugerido por Best (1982), que com base no número de filhotes recém nascidos estimou o período de gestação como cerca de um ano.

Marsh (1995), estimou o período de gestação dos dugongos em 13,9 meses, utilizando modelos matemáticos utilizando o período estimado para o peixe-boi da Flórida, porém a autora relata que esta estimativa é um tanto quanto imprecisa.



A proporção sexual dos neonatos de peixe-boi da Flórida é de 1:1 (O'SHEA e HARTLEY, 1995; RATHBUN et al., 1995), porém Marmontel (1995) avaliando carcaças com menos de um ano, verificou uma tendência ao nascimento de machos. Marsh (1995), sugere para os dugongos a relação de 1:1. Não existem dados publicados sobre esta relação para o peixe-boi da Amazônia e para o peixe-boi africano.

2.4.3 Sazonalidade

Os sirênios modernos estão restritos as regiões subtropicais e tropicais, e existem evidências de que sua atividade reprodutiva, seja sazonal difusa, pois estes tem a capacidade de diminuir a atividade reprodutiva quando o suporte de alimentos é baixo (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999).

Best (1982), sugeriu um ciclo reprodutivo sazonal para o peixe-boi da Amazônia, correlacionando a influência do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica com a taxa de nascimentos e a disponibilidade de alimentos. Best (1983) relata no seu estudo com os peixes-boi do Lago do Amanã, que os animais passaram por um jejum aparente, do final de agosto até a primeira semana de março, com exceção das duas últimas semanas de dezembro e início de janeiro, quando os níveis dos lagos subiram, porém continuando a vazante em seguida. Sugere ainda que a seca pode levar à emaciação e à parada na atividade reprodutiva, salientando que a destruição da Floresta Amazônica em larga escala, pode alterar e prolongar este período de seca.

O marcante ciclo sazonal das cheias (amplitude 10-15 metros) no sistema de drenagem do Rio Amazonas tem um profundo efeito na produção de macrófitas



aquáticas, conseqüentemente na alimentação dos peixes-bois. Com o aumento do nível das águas dos rios (dezembro à março), há um aumento na produção de macrófitas aquáticas, e os peixes-bois, dispersam-se para a várzea e igapós, áreas de alimentação. Durante a estação seca (julho a novembro), com a diminuição do nível dos rios, essas áreas são drenadas e ficam inacessíveis, então durante a vazante os peixes-bois iniciam uma migração para os locais mais profundos (BEST, 1982, 1983, 1984; COLARES; COLARES, 2002).

Na estação da cheia existe uma maior abundância de macrófitas aquáticas (PIEADADE; JUNK; LONG, 1991) com diferenças marcantes entre os teores de matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo, proteína e energia entre época de seca e na época de cheia (RODRIGUES-CHACÓN, 2001). Deste modo, na época de enchente dos rios, os peixes-bois migram para as regiões de várzea e igapó em busca de alimento, quando acumulam gordura, em função da grande disponibilidade de recursos alimentares (Best, 1982).

Segundo Best (1982) a atividade reprodutiva ocorre durante todo o ano, e os nascimentos ocorrem entre dezembro a julho, sendo o pico de nascimentos entre fevereiro e maio, quando o nível da água dos rios está alto.

A temperatura ambiente e a precipitação pluviométrica podem influenciar a atividade reprodutiva, Pimentel (1998) quantificou metabólitos de testosterona nas fezes de peixe-boi da Amazônia em cativeiro, e sugeriu que estes fatores estão intimamente relacionados.

Para o peixe-boi da Flórida (MARMONTEL, 1995) e dugongos (MARSH, 1995; MARSH; HEINSOHN; CHANNELS, 1984), existem evidências de sazonalidade embora a atividade reprodutiva não seja totalmente sincrônica entre as fêmeas. Ciclos estéreis são comumente vistos em dugongos (MARSH; HEINSOHN;



CHANNELS, 1984) e talvez possa ocorrer em peixe-boi da Flórida (MARMONTEL 1995; RATHBUN et al., 1995). Odell et al., (1995) observando comportamento reprodutivo de peixes-bois da Flórida relataram que as fêmeas em cativeiro apresentam comportamento de cópula sem resultar em gestação. Os nascimentos para esta espécie ocorrem em maior concentração na primavera e início do verão, sendo raro o registro de nascimentos no inverno. Esta concentração de nascimentos na primavera e início do verão coincide com a oferta de alimento e diminui os potenciais perigos do inverno para os filhotes (HARTLEY, 1995; MARMONTEL, 1995; ODELL et al., 1995; O'SHEA; REID, BONDE; O'SHEA, 1995; RATHBUN et. al, 1995).

A sazonalidade dos nascimentos em sirênios coincide com a produtividade das plantas aquáticas, provendo energia para as fêmeas no período final da gestação e durante a primeira fase de lactação. Além disto, filhotes recém nascidos, com poucas semanas de vida de dugongos selvagens e peixe-boi da Flórida em cativeiro, consomem plantas suplementando a dieta láctea, que possui baixos teores em fibras e carboidratos e altos teores de gordura (BOYD; LOCYER; MARSH, 1999).

Hernandez et al. (1995), com base em estudos histológicos dos testículos de peixe-boi da Flórida, sugerem um padrão reprodutivo sazonal, sendo notado uma forte relação entre a estação do ano e o grau de espermatogênese. Neste estudo notou-se que durante o inverno a espermatogênese foi sensivelmente diminuída e que o oposto ocorreu nas outras estações.



2.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA POR MÉTODOS NÃO-INVASIVOS

A fisiologia reprodutiva dos mamíferos aquáticos é geralmente delineada pelo exame direto (macro e microscópicos) das gônadas de animais mortos. Dados como maturidade sexual, período do estro, taxas de ovulação, duração da gestação, são extrapolados de estudos histológicos e dependem de um tamanho amostral grande (KIRBY, 1990). Atualmente com o advento das diversas técnicas de extração e dosagem hormonais, como o radioimunoensaio, os estudos sobre a fisiologia reprodutiva avaliando animais vivos em cativeiro e de fácil acesso, poderão ser mais específicos principalmente sobre os processos hormonais envolvidos (KIRBY, 1990).

A utilização de dosagens de metabólitos de hormônios esteróides excretados na urina e nas fezes, por sua vez permite o monitoramento longitudinal da função ovariana e a realização de diagnósticos de gestação de forma não invasiva em diversas espécies animais terrestres de vida livre ou mantidas em cativeiro, privando-os do estresse produzido pela contenção química e/ou física (LASLEY; KIRKPATRICK, 1991). Porém a obtenção de amostras fecais e urinárias de sirênios e cetáceos de vida livre, pode ser impraticável, sendo as informações provenientes de carcaças de extrema importância.

O diagnóstico de prenhez e/ou o monitoramento da função ovariana pela análise das concentrações de metabólitos de hormônios esteróides extraídos das fezes de animais herbívoros já foi utilizada em bovinos domésticos (DESAULNIERS et al., 1989), cavalos selvagens (KIRKPATRICK; SHILDELER; TURNER, 1990), éguas domésticas (SCHWARZENBERGER, et al., 1991), rinocerontes negros (SCHWARZENBERGER et al., 1996; SCHWARZENBERGER; FRANCKE; GOLTENBOTH, 1993), rinocerontes brancos (PATTON et al, 1999;



SCHWARZENBERGER et al, 1998), oryx (SHAW et al., 1995) fêmeas de elefante africano (FIEB; HEISTERMANN; HODGES, 1999). Estudos semelhantes também foram realizados em animais de dieta mista, como por exemplo babuínos (WASSER; MONFORT; WILDT, 1991) e carnívoros (BROWN et al., 1993, 1996; CZEKALA et al., 1994).

Estudos utilizando a dosagem de esteróides sexuais nas fezes de sirênios, por radioimunoensaio, foram realizados por Pimentel (1998), avaliando níveis de testosterona nos machos de peixe-boi amazônico; por Yamamoto (2001) avaliando os esteróides sexuais em peixe-boi das Antilhas e por Larkin (2000), avaliando níveis de metabólitos de estradiol, progesterona e testosterona nas fezes de peixe-boi da Flórida. Estes trabalhos foram realizados com êxito, demonstrando que a técnica de dosagem de esteróides sexuais nas fezes de sirênios, é uma técnica eficiente e confiável. Porém no estudo conduzido por Larkin (2000), não foi possível detectar a gestação no peixe-boi da Flórida baseando-se nas progestinas fecais, sugerindo a necessidade da determinação dos metabólitos de progesterona envolvidos.



Objetivos
Material e Método



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da função reprodutiva de seis fêmeas adultas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro, relacionada à atividade ovariana, por meio da extração e quantificação de progesterinas e estrógenos fecais, proporcionando uma avaliação longitudinal e não-invasiva, contribuindo com o programa de manejo reprodutivo e conservação da espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis de esteróides sexuais fecais de seis fêmeas adultas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidas em cativeiro.
- Relacionar as concentrações obtidas dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona ao estado reprodutivo.
- Comparar as concentrações hormonais ao ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica.
- Ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva da espécie.
- Fornecer ferramentas para a pesquisa em reprodução de peixe-boi.



4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Foram amostradas seis fêmeas adultas de peixe boi da Amazônia, com idades variando entre 7,5 a 28 anos, mantidas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (n=4) e no Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos - Usina Hidrelétrica de Balbina/ Manaus Energia S. A (n=2) (Figura 5).

4.2 DESCRIÇÃO DOS TANQUES

Durante o período de estudo, os peixes-bois do Laboratório de Mamíferos Aquáticos - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Figura 3) foram mantidos em três tanques com 10 metros de diâmetro e com 2,5 metros de profundidade (Tanques 1, 2 e 3) e em um tanque intermediário com 4,5 metros de comprimento por 2,7 metros de largura e com 1,1 metros de profundidade, de acordo com os manejos realizados pela equipe técnica responsável.

Os peixes-bois do Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos - Usina Hidrelétrica de Balbina/ Manaus Energia S. A (Figura 4) foram mantidos durante todo o período de estudo em um tanque de 10 metros de diâmetro e com 3,2 metros de profundidade.



Figura 4 - Vista lateral dos tanques do Laboratório de Mamíferos Aquáticos – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

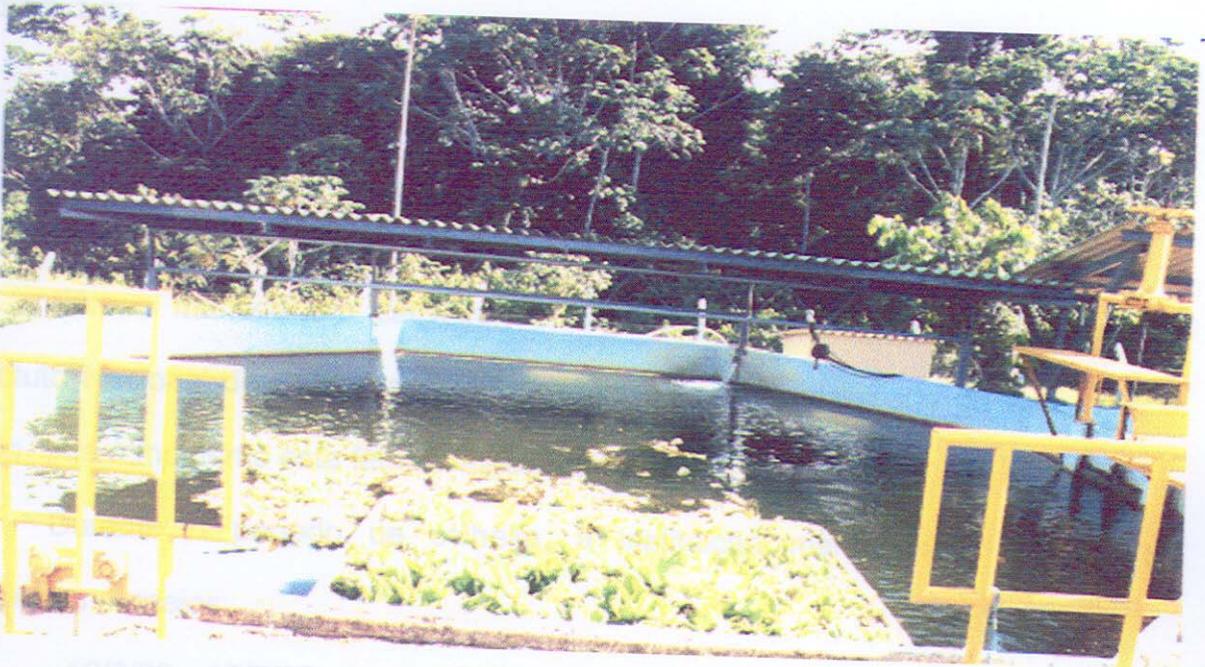


Figura 5 - Vista superior de um tanque do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos - Manaus Energia S. A.



4.3 HISTÓRICO DOS ANIMAIS

AIRA

Fêmea mantida em cativeiro no Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos (Balbina - AM) com idade estimada de sete anos e meio. Durante todo o período de estudo, foi mantida com a fêmea Miri (sete anos e meio), e os machos Carimbó (9 anos) e Broocke (10 anos). Até o momento da pesquisa esta fêmea não havia reproduzido.

MIRI

Fêmea com idade estimada de sete anos e meio, mantida em cativeiro nas mesmas condições de Aira. Até o momento da pesquisa esta fêmea não havia reproduzido.

CUNHATAÍ

Fêmea mantida em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia com idade estimada de sete anos e meio. Até o momento esta fêmea nunca reproduziu.

Durante o período de colheita, a instituição mantenedora realizou os seguintes manejos:

- 12/3/02 - 17/7/02: permanência no tanque 3 com a fêmea Cambá (18 anos) e com o macho Yanomami (25 anos)



- 17/7/02 - 6/11/02: permanência no tanque 3 com as fêmeas Cambá, Boo (28 anos), o macho Yanomami e com os filhotes Manaós (fêmea) e Tapajós (macho).

- 6/11/02 - 25/2/03: permanência na tanque 2 com a fêmea Cambá, e os machos Tupy (24 anos), Erê (4 anos), Mapixari (2 anos), Anamã (4 anos), Guarany (8 anos), Yanomami. No dia 29/01 o macho Tupy foi transferido de tanque.

CAMBÁ

Fêmea mantida há 18 anos em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, chegou adulta na instituição. Até o momento da pesquisa esta fêmea não havia reproduzido.

Durante o período de colheita, a instituição mantenedora realizou os seguintes manejos:

- 12/3/02 - 17/7/02: permanência no tanque 3 com a fêmea Cunhataí e com o macho Yanomami.

- 17/7/02 - 6/11/02: permanência no tanque 3 com as fêmeas Cunhataí, Boo, o macho Yanomami e com os filhotes Manaós e Tapajós.

- 6/11/02 - 25/2/03: permanência no tanque 2 com a fêmea Cunhataí, e os machos Tupy, Erê, Mapixari, Anamã, Guarany, Yanomami. No dia 29/01 o macho Tupy foi transferido de tanque.



BOO

Fêmea com idade estimada de 28 anos, mantida em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, desde 1984 quando chegou com idade estimada de menos de um ano de idade. Em seu histórico reprodutivo temos o nascimento de um macho em 8/04/1998 (Erê), e de uma fêmea em 12/9/2001 que nasceu morta. Após este acontecimento foram colocados 2 filhotes órfãos com esta fêmea, que os adotou e amamentou até dezembro de 2002.

Durante o período de colheita, a instituição mantenedora realizou os seguintes manejos:

- 7/3/02 - 17/7/02: permanência no tanque intermediário com os filhotes adotivos Manaós e Tapajós.

- 17/7/02 - 6/11/02: permanência no tanque 3 com as fêmeas Cunhataí, Cambá, o macho Yanomami e com os filhotes adotivos Manaós e Tapajós.

- 6/11/02 - dia 29/01/03: permanência no tanque 1 com os filhotes adotivos Manaós e Tapajós e com a fêmea Tukano (18 anos) e seu filhote Tuã.

- 29/01/03 - 27/2/03: permanência no tanque 1 com os filhotes adotivos Manaós e Tapajós e com a fêmea Tukano e seu filhote Tuã e com o macho Tupy.



TUKANO

Fêmea mantida há 18 anos em cativeiro no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, chegou adulta na instituição. Em seu histórico reprodutivo temos o nascimento de um filhote macho em 21/02/2002 (Tuã).

Durante o período de colheita, a instituição mantenedora realizou os seguintes manejos:

- 4/2/02 - dia 5/11/02: permanência no tanque 1 com o seu filhote Tuã.
- 6/11/02 - dia 29/01/03: permanência no tanque 1 com seu filhote Tuã e com a fêmea Boo e seus filhotes adotivos Manaós e Tapajós.
- 29/01/02 - 27/2/03: permanência no tanque 1 com seu filhote Tuã e com a fêmea Boo e seus filhotes adotivos Manaós e Tapajós e com o macho Tupy.



4.4 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

As amostras fecais foram colhidas duas vezes na semana, imediatamente após a defecação (Figura 5), quando o tanque era esvaziado para limpeza. As amostras foram devidamente identificadas quanto ao animal e a data, acondicionadas em sacos plásticos (Figura 6) e armazenadas em freezer a -20°C até serem processadas. As extrações e dosagens de metabólitos hormonais de esteróides sexuais (estradiol e progesterona) foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

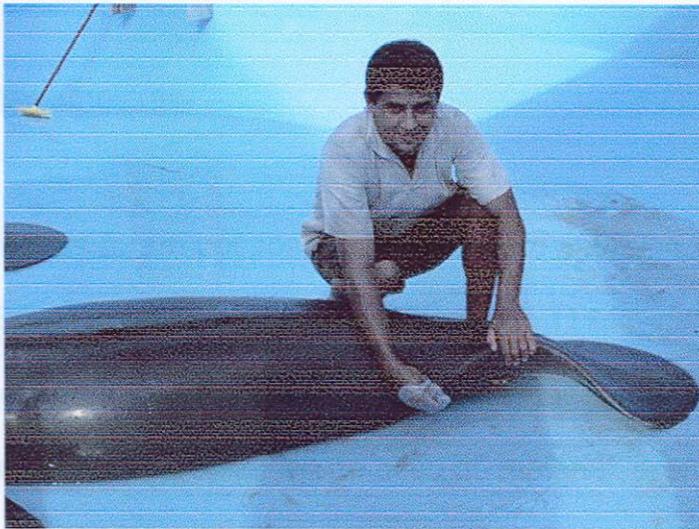


Figura 5 - Procedimento para coleta de fezes de peixe-boi da Amazônia.



Figura 6 - Fezes de peixe-boi da Amazônia.



4.5. LICENÇAS DE TRANSPORTE DAS AMOSTRAS FECALIS

- Número do Processo/DOC IBAMA – Manaus-AM: 02005.001443/02-10
- Números das Licenças de transporte das amostras fecais de peixe-boi da Amazônia, de Manaus com destino a São Paulo: 53NUFAS-RAN/2002; 105/2002; 24/2003.
- Guia de Transito Animal (GTA)- Ministério da Agricultura: n° 426654, 42667.
- Termo de ciência do IBAMA São Paulo: Processo n° 02027.003317/02-42

4.6 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA - EXTRAÇÃO HORMONAL

Preparação das amostras

As amostras foram pesadas, liofilizadas em aparelho giratório tipo *speed vac* (Speed Vac SC 110, Savant Instruments, Inc. NY, 11741-4306-USA), por 12 horas e pesadas novamente para obtenção da porcentagem de umidade. A etapa de liofilização garantiu a padronização do peso do material fecal que foi utilizado.

Determinação do protocolo de extração

A fim de se determinar o melhor protocolo de extração a ser adotado no presente trabalho, efetuou-se um período pré-experimental onde foram testados os seguintes protocolos descritos abaixo.



Protocolo 1 - Brown et al. (1994) – fezes úmidas.

As fezes congeladas foram processadas de acordo com a técnica descrita por Brown et al. (1994), onde a uma alíquota de 0,2g da amostra úmida foram adicionados 5ml de etanol 90% (90% etanol: água destilada). Após homogeneização em aparelho *vortex* (PHOENIX, MOD AT 56) por 15 minutos, as amostras foram aquecidas a 90°C em banho-maria (QUIMIS), dentro da capela do laboratório por até 25 minutos depois de iniciada a fervura. Durante esse tempo o etanol evaporado foi gradativamente repostado para que nenhuma amostra secasse, de forma que ao final desta etapa o volume inicial fosse mantido. Foram centrifugadas (QUIMIS) por 15 minutos a 500G e o sobrenadante foi recuperado. O “pellet” foi ressuscitado em 5 ml de etanol 90%, homogeneizado em aparelho *vortex* (PHOENIX, MOD AT 56) por 15 minutos e centrifugado novamente. Os dois sobrenadantes foram combinados, secos completamente no fluxo (LÁCTEA) sob ar comprimido. O extrato obtido foi ressuscitado em 1ml de metanol, homogeneizado por 1 minuto e levado ao banho-ultrassônico (Ultra Sonic Cleaner, USC-1450-Unique) por 15 minutos. Em seguida, o extrato foi armazenado em freezer (-20°C) onde permaneceu até a etapa de dosagem hormonal. Nesta etapa, as amostras foram diluídas (1/10) em tampão gelatina [NaPO₄ (13,8g), NaCl(9,0 g), ázida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH7, 0].

Protocolo 2 - Brown et al. (1994) - fezes liofilizadas.

Neste protocolo utilizaram-se fezes liofilizadas, procedendo ao protocolo acima descrito.



Protocolo 3 - Schwarzenberger et al. (1991) - fezes úmidas.

As fezes congeladas foram processadas de acordo com a adaptação da técnica descrita por Schwarzenberger et al. (1991).

Em um tubo de ensaio, foram colocadas 0,2g de fezes úmidas, 0,5ml de água destilada e 4ml de metanol, e a mistura foi colocada em um misturador mecânico (PHOENIX, MOD AT 56) por 30 minutos. Para remover lípides apolares, adicionou-se 3ml de éter de petróleo, e a mistura obtida foi agitada por 15 segundos (VWR SCIENTIFIC PRODUCTS). Após centrifugação a 1500G por 15 minutos, os tubos foram mantidos a -20°C durante 30 minutos. Então, 1ml da fração de metanol foi transferida para um criotubo e mantida a -20°C para análises subseqüentes de progesterona, utilizando-se a técnica de radioimunoensaio. Nesta etapa, as amostras foram diluídas (1/10) em tampão gelatina [NaPO_4 (13,8g), NaCl (9,0 g), ázida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH7, 0].

Para a dosagem de estradiol, 500 μl da fração de metanol foi separado em um tubo de ensaio e evaporado em banho Maria (QUIMIS) a 37°C com fluxo (LÁCTEA) sob ar comprimido (MSI 5,2ml/100), e depois foi ressuspendido em 500 μl de tampão gelatina [NaPO_4 (13,8g), NaCl (9,0 g), ázida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH7, 0]. Essa mistura foi armazenada -20°C para análises subseqüentes com radioimunoensaio.

Protocolo 4 - Schwarzenberger et al. (1991) - fezes liofilizadas.

Neste protocolo utilizaram-se fezes liofilizadas, procedendo ao protocolo acima descrito.



4.7 DOSAGEM HORMONAL

Para dosagem dos estrógenos e das progestinas fecais utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (COAT-A-COAT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona (P_4) e estradiol (E_2) no soro humano. Este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado ^{125}I .

Para todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme a rotina empregada no LDH.

4.8 VALIDAÇÃO

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC MEDLAB® para quantificação de metabólitos de estradiol e progesterona nas fezes de peixe-boi da Amazônia, empregando o método de Paralelismo utilizando matriz íntegra. Este método indica se o material está interferindo na ligação antígeno – anticorpo. Para tal, utiliza-se uma amostra de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão). A esta amostra adicionam-se valores conhecidos de P_4 e E_2 , a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão. Os resultados foram analisados por Regressão Simples, plotados e o coeficiente de explicação da variabilidade (R^2) foi superior a 0,95, significando que o modelo explicou mais de 95% dos dados apresentados.



4.9 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA

Para se determinar os valores basais, elevados e picos dos estrógenos fecais encontrados para cada fêmea, utilizou-se um processo matemático sucessivo, onde os valores encontrados que excedessem 1,5 desvio padrões, eram excluídos (Brown, 1996), todos os valores acima deste foram considerados como pico. Seguiu-se então, uma nova etapa onde os valores foram recalculados e o processo repetido até que os valores de cada etapa não excederam 1,5 desvios padrões. Ao término deste procedimento, para comparação das colunas criadas utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla Turkey-Kramer. No momento em que surgiu diferença estatística significativa, os valores iguais ou inferiores a este, foram considerados como os valores basais. Os valores compreendidos entre o pico e o basal foram considerados valores de elevação hormonal.

O período de estro foi considerado quando os valores de estrógenos fecais mantiveram-se elevados por, pelo menos, três dias consecutivos com a presença de um pico. E o ciclo estral foi verificado no período entre dois picos consecutivos de estrógenos fecais.

As progestinas fecais foram consideradas elevadas somando-se à média 1,5 desvio padrão. Como não foi possível afirmar a ocorrência de ovulação, os dados serão tratados como elevados ou não elevados.



4.10 SAZONALIDADE

Para avaliar se as fêmeas de peixe-boi da Amazônia mantidas em cativeiro apresentavam o padrão sazonal sugerido por Best (1982), comparamos as observações hormonais com o ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica.

As observações hormonais foram agrupadas por semanas do ano, e segundo as suas médias. As observações de cada hormônio, para cada fêmea, foram agrupadas nas quatro fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica. Estas fases foram determinadas a partir de valores médios semanais dos dados de nível da água coletados na estação hidrológica das Missões na região de Tefé (AM), de 1991 à 2004 (Dados Projeto Boto e Instituto Mamirauá), evidenciando o regime das águas que ocorre na bacia amazônica

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram primeiramente analisadas quanto a sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Sminov (teste KS) para verificação de normalidade dos resíduos e pelo teste de Bartlett, para verificação de homogeneidade das variâncias. Após este procedimento foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla Turkey-Kramer, para comparação entre médias.

Os dados referentes às concentrações hormonais, duração do estro e ciclo estral foram expressos em função das suas médias (\pm erro padrão da média) para as fêmeas da espécie estudada.



Os dados foram analisados utilizando-se os programas GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA, Licença: GTA508222-252, www.graphpad.com, 1998), e StatView (SAS Institute Inc. ISBN: 1-58025-162-5, 1998.)



Resultados



5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

Amostras aleatórias de 10 gramas de fezes de peixe-boi da Amazônia foram liofilizadas para obtenção de uma amostra mais concentrada. A média de porcentagem de água foi de 46,39% com desvio padrão de 3,24% (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de água em amostras aleatórias de fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro

Animal	Data da coleta	%água
Boo	3/4/02	48,97
Boo	21/4/02	43,94
Boo	24/4/02	42,02
Tukano	23/2/02	40,36
Tukano	22/3/02	48,21
Tukano	16/4/02	47,48
Cambá	23/3/02	48,78
Cambá	29/4/02	45,90
Aira	26/3/02	49,96
Miri	19/3/02	48,26
Média=		46,39 ± 3,24% DP

Os resultados expressos na tabela 2 representam a quantificação por radioimunoensaio de progesterinas de amostras fecais aleatórias de peixe-boi da Amazônia, submetidas às extrações pelo protocolo 1 (Brown et al., 1994- utilizando fezes úmidas), e pelo protocolo 2 (Brown et al., 1994 - utilizando fezes liofilizadas), respectivamente. As concentrações de metabólitos fecais de estradiol submetidas às extrações pelo protocolo 1 (Brown et al., 1994- utilizando fezes úmidas), e pelo



protocolo 2 (Brown et al.,1994 - utilizando fezes liofilizadas), encontram-se expressas na tabela 3

Tabela 2 - Concentração de progestinas (P4 ng/g fezes úmidas) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) submetidas à extração pelo protocolo Brown et al. (1994) utilizando fezes úmidas (Protocolo 1) e liofilizadas (Protocolo 2)

Animal	Data da coleta	P4 (ng/g fezes úmidas)	P4 (ng/g de fezes secas)
Aira	26/03	0,491	0,70
Cambá	23/3	0,06	0,31
Tukano	22/03	0,14	0,48
Boo	24/04	0,06	0,44
Tukano	23/02	0,56	1,17
Tukano	16/04	0,19	0,24
Miri	19/03	0,08	1,57
Cambá	29/04	0,13	0,54
Boo	21/04	0,06	0,61
Boo	03/04	0,11	0,72

Tabela 3 - Concentração de metabólitos de estrógenos (E2 pg/g fezes úmidas) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) submetidas à extração pelo protocolo Brown et al. (1994) utilizando fezes úmidas (Protocolo 1) e liofilizadas (Protocolo 2)

Animal	Data da coleta	E2 (pg/g de fezes secas)	E2 (pg/g de fezes úmidas)
Miri	19/03	0,00	101,60
Cambá	29/04	16,53	98,45
Boo	24/04	19,23	71,09

Os resultados expressos nas tabelas 4 e 5, respectivamente representam as concentrações de progestinas e estrógenos fecais das amostras submetidas aos protocolos de extração 3 (Schwarzenberger et al.,1991- adaptado utilizando fezes úmidas) e 4 (Schwarzenberger et al.,1991- adaptado utilizando fezes liofilizadas).



Tabela 4 - Concentração de progestinas (P4 ng/g fezes) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) submetidas à extração pelos protocolos Schwarzenberger et al. (1991) adaptado utilizando fezes úmidas (Protocolo 3) e liofilizadas (Protocolo 4)

Animal	Data da coleta	P4 ng/g de fezes	
		úmidas	secas
Aira	26/03	0,12	0,566
Cambá	23/3	0,06	0,187
Tukano	22/03	0,00	0,161
Boo	24/04	0,00	0,136
Tukano	23/02	0,32	0,762
Tukano	16/04	0,00	0,152
Miri	19/03	0,00	1,293
Cambá	29/04	0,00	0,319
Boo	21/04	0,08	0,305
Boo	03/04	0,05	0,44

Tabela 5 - Concentração de progestinas (P4 ng/g fezes secas) e metabólitos de estrógenos (E2 pg/g fezes secas) de amostras fecais aleatórias de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) submetidas à extração pelo protocolo Schwarzenberger et al. (1991) adaptado utilizando fezes secas (Protocolo 4)

Animal	Data da coleta	E2 pg/g de fezes	
		úmidas	secas
Aira	26/03	40,33	219,2
Cambá	23/3	53,04	97,35
Tukano	22/03	39,64	116,18
Boo	24/04	71,09	123,49
Tukano	23/02	509,28	368,78
Tukano	16/04	34,95	69,385
Miri	19/03	101,60	111,95
Cambá	29/04	98,45	111,68
Boo	21/04	11,39	57,645
Boo	03/04	12,20	1116,27



Ao aplicar-se o Teste -t verificou-se com alta significância estatística ($p < 0,05$) que o protocolo desenvolvido por Schwarzenberger et al. (1991) adaptado, utilizando fezes liofilizadas foi mais eficiente que o protocolo desenvolvido por Brown et al. (1993) para a extração de progestinas e estrógenos fecais do peixe-boi da Amazônia.

Tabela 6 - Comparação entre os protocolos de extração de progestinas e estrógenos fecais de amostras aleatórias de peixe-boi da Amazônia.

Comparação entre protocolos	Teste -t	Teste -t
	Progestinas fecais	Estrógenos fecais
Protocolo 1 X Protocolo 2	$p = 0,0001759$	$p = 0,09291$
Protocolo 2 X Protocolo 4	$p = 0,0000145$	$p = 0,00109$
Protocolo 3 X Protocolo 4	$p = 0,0043350$	$p = 0,11389$

Dentro do protocolo de extração 4 (Schwarzenberger et al., 1991- adaptado utilizando fezes liofilizadas), as progestinas fecais foram quantificadas nas diversas fases da extração (fase éter; fase metanol pura e fase metanol ressuspendido em éter) (Tabela 7). Ao aplicar o Teste-t (Tabela 8) verificamos que a fase metanol pura foi estatisticamente superior a fase éter ressuspendida em metanol, e não apresentou diferença estatística quando comparada com a fase metanol ressuspendida em tampão gelatina. Após este procedimento optou-se utilizar a fase metanol pura para quantificação das progestinas fecais.



Tabela 7 - Concentração de progestinas fecais nas diversas fases de extração no protocolo desenvolvido por Schwarzenberger et al. (1991) adaptado, com diluição 1:10 em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

Animal	Data da coleta	Metanol puro (ng/g fezes secas)	Éter-metanol (ng/g fezes secas)	Metanol-Tampão gelatina (ng/g fezes secas)
Cunhataí	19/08/02	0,18	0,00	0,15
Cambá	25/07/02	0,49	0,00	0,62
Boo	30/04/02	0,33	0,00	0,20
Boo	08/05/02	0,35	0,00	0,37
Boo	27/05/02	1,67	0,09	1,35

Tabela 8 - Comparação entre as diversas fases de extração de progestinas fecais no protocolo desenvolvido por Schwarzenberger et al. (1991) adaptado, com diluição 1:10 em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

Comparação entre fases	Teste-t
Fase éter-metanol x fase metanol puro	p= 0,039983
Fase metanol puro x fase metanol-tampão gelatina	p= 0,217656
Fase éter-metanol x fase metanol-tampão gelatina	p= 0,029853

5.2. VALIDAÇÃO

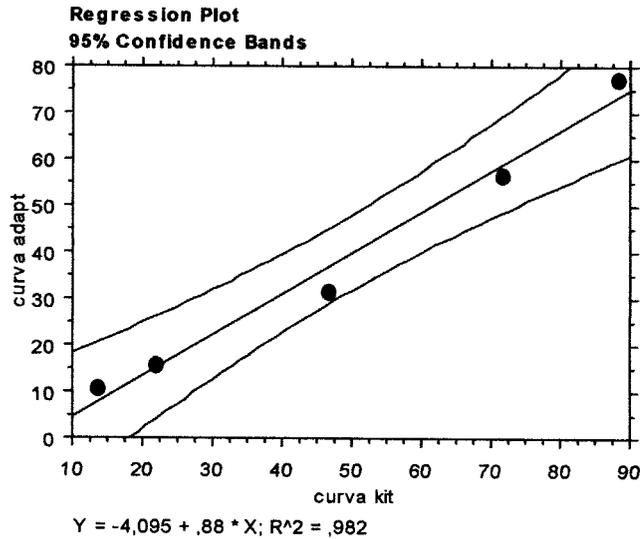


Figura 7 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) utilizando matriz íntegra.

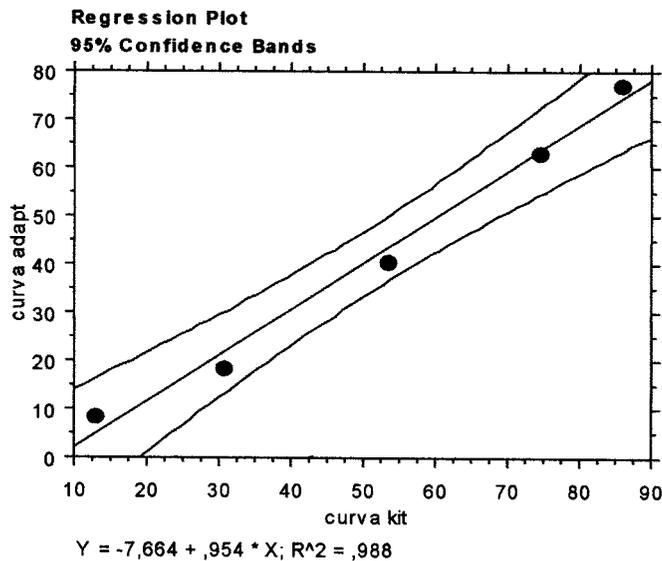


Figura 8 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para metabólitos de estrógenos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) utilizando matriz íntegra.



5.3. PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS RADIOIMUNOENSAIOS

O controle de qualidade dos ensaios foi realizado utilizando-se da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 15% e interensaio inferior a 4%. Eles estão representados nas tabelas 9 e 10. A sensibilidade mínima no ensaio para P₄ foi de 0,01ng/ml e para E₂ foi de 1,9pg/ml.

Tabela 9 - Controle de Qualidade obtido nos ensaios de progestinas fecais em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*).

Ensaio	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	35662,8	54%	0,33%	94,3(0,01)	1,69%	0,19%
2	39648,8	53%	0,48%	93,8(0,01)	7,49%	2,00%
3	42621,3	55%	0,46%	95,2(0,02)	4,50%	2,03%
4	42266,3	55%	0,43%	94,8(0,03)	10,71%	1,52%
5	37478,3	54%	0,45%	95,8(0,02)	5,21%	3,27%
6	36618,3	56%	0,87%	94,9(0,005)	3,74%	3,33%
CV Inter ensaio					1,59%	3,25%

Tabela 10 - Controle de Qualidade obtido nos ensaios nos ensaios de metabólitos de estrógenos fecais em fezes de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

Ensaio	CPM	Cap Lig.	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	total	B/B0	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	32480,8	50%	0,59%	91,8(1,9)	1,65%	5,11%
2	31077,8	50%	0,59%	91,7(2,6)	14,29%	0,32%
3	25173,3	52%	0,52%	94,6(3,2)	1,23%	6,53%
CV Inter ensaio					3,48%	0,79%



5.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA

Tabela 11 - Valores basais, valores elevados e pico dos metabólitos de estrógenos fecais para cada fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

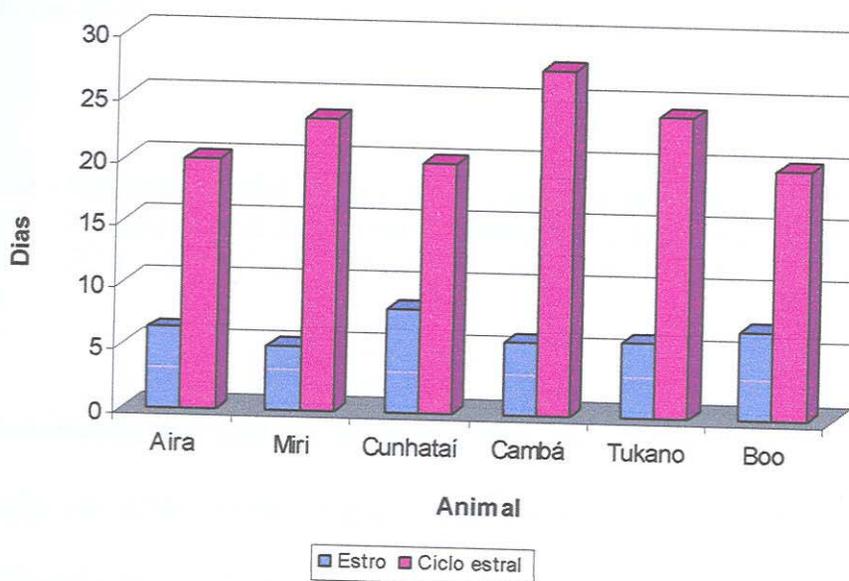
Animal	Basal (ng/g fezes secas)*	Elevação (ng/g fezes secas)	PICO (ng/g fezes secas)**
Aira	≤ 296,77	296,78 ≤ x ≤ 756,80	≥ 756,81
Miri	≤ 450,01	450,02 ≤ x ≤ 687,78	≥ 687,79
Cunhataí	≤ 386,55	386,56 ≤ x ≤ 598,02	≥ 598,03
Cambá	≤ 286,52	286,53 ≤ x ≤ 422,83	≥ 422,84
Tukano	≤ 66,90	266,91 ≤ x ≤ 349,92	≥ 349,93
Boo	≤ 435,67	435,68 ≤ x ≤ 555,33	≥ 555,34

Tabela 12 - Valores basais e elevados de progestinas fecais para cada fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

Animal	Basal (ng/g fezes secas)*	Elevação (ng/g fezes secas)**
	Valores inferiores	Valores superiores
Aira	≤ 21,18	≥ 35,47
Miri	≤ 23,64	≥ 39,05
Cunhataí	≤ 23,80	≥ 51,88
Cambá	≤ 31,97	≥ 64,91
Tukano	≤ 34,42	≥ 51,10
Boo	≤ 40,12	≥ 77,50

Tabela 13 - Duração do estro e do ciclo estral (em dias \pm EPM) para fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

Animal	Idade (anos)	Estro (dias)	Ciclo estral (dias)
Aira	7,5	6,40 \pm 0,40	20,00 \pm 1,47
Miri	7,5	5,00 \pm 0,00	23,33 \pm 6,64
Cunhataí	7,5	8,25 \pm 3,03	20,00 \pm 2,88
Cambá	\geq 18	5,75 \pm 1,37	27,66 \pm 8,21
Tukano	\geq 18	6,00 \pm 2,00	24,00 \pm 0,00
Boo	28	7,00 \pm 1,08	20,00 \pm 0,00
Média \pm EPM		6,4 \pm 0,45	22,49 \pm 1,26

Figura 9 - Representação gráfica da duração do estro e ciclo estral em dias, em fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)



AIRA

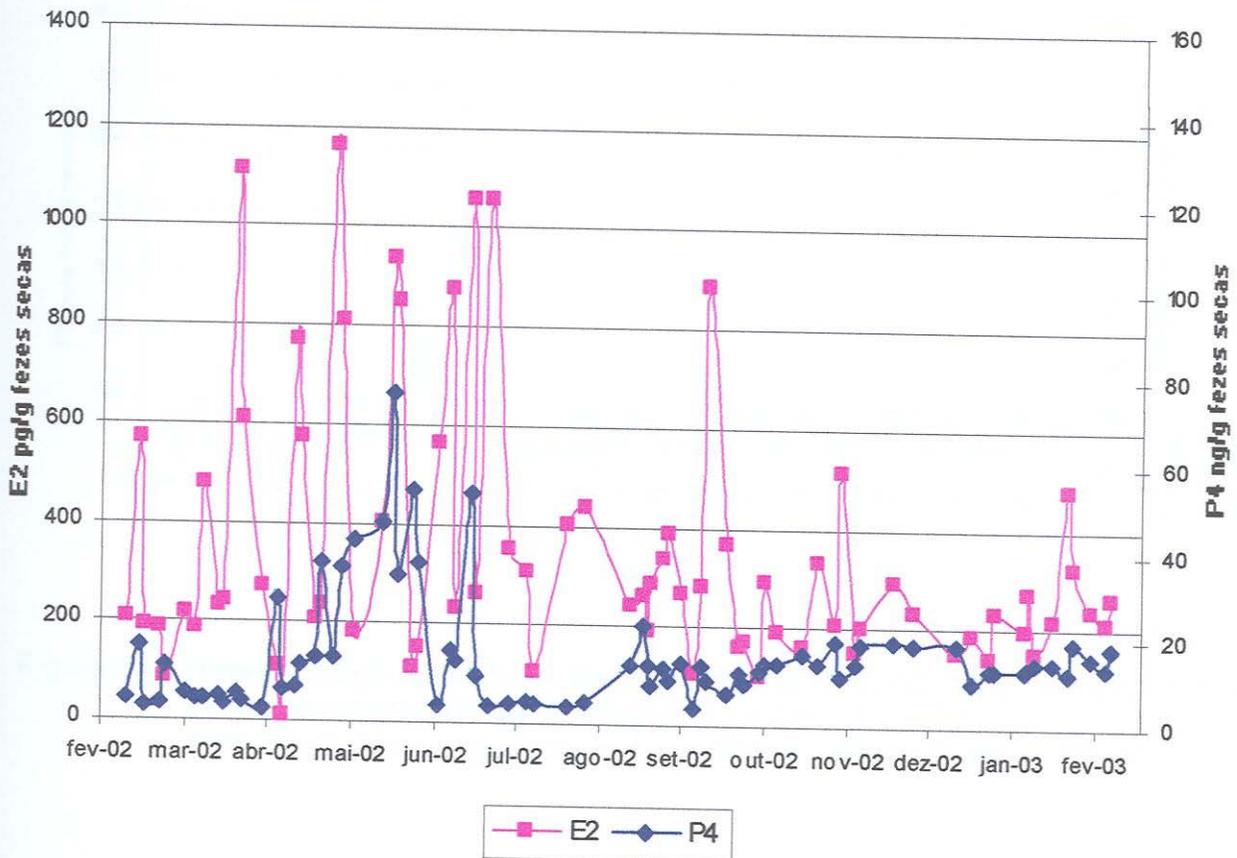


Figura 10 - Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) Aira, com 7.5 anos de idade, entre março de 2002 à fevereiro de 2003

A variação dos valores de metabólitos fecais de progesterona foi entre 2,66 à 76,11 ng/g de fezes secas e dos metabólitos fecais de estradiol foi entre 8,98 à 1164,2 pg/g de fezes secas.

A figura acima revela intensa atividade estrogênica entre os meses de abril a julho de 2002, apresentando nove picos neste intervalo. Entre os meses de maio a julho de 2002 observou-se a concentração das elevações de progestinas fecais.



MIRI

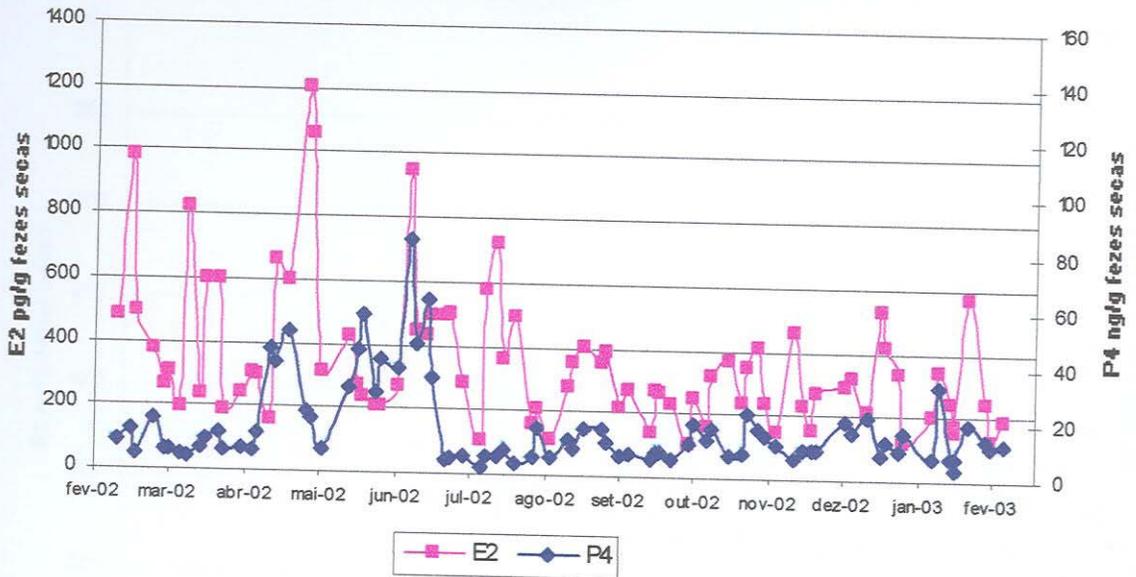


Figura 11 - Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), Miri com 7.5 anos de idade, entre março de 2002 à fevereiro de 2003

As concentrações de metabólitos fecais de progesterona variaram entre 2,31 a 83,24ng/g de fezes secas. e os valores de metabólitos fecais de estradiol entre 104,32 à 1205,8pg/g de fezes secas.

Observou-se atividade estrogênica entre os meses de março e agosto 2002, caracterizada pela presença de seis picos. A atividade luteínica, concentrou-se entre os meses de maio e julho de 2002, apresentando nove elevações nas concentrações de progestinas fecais.

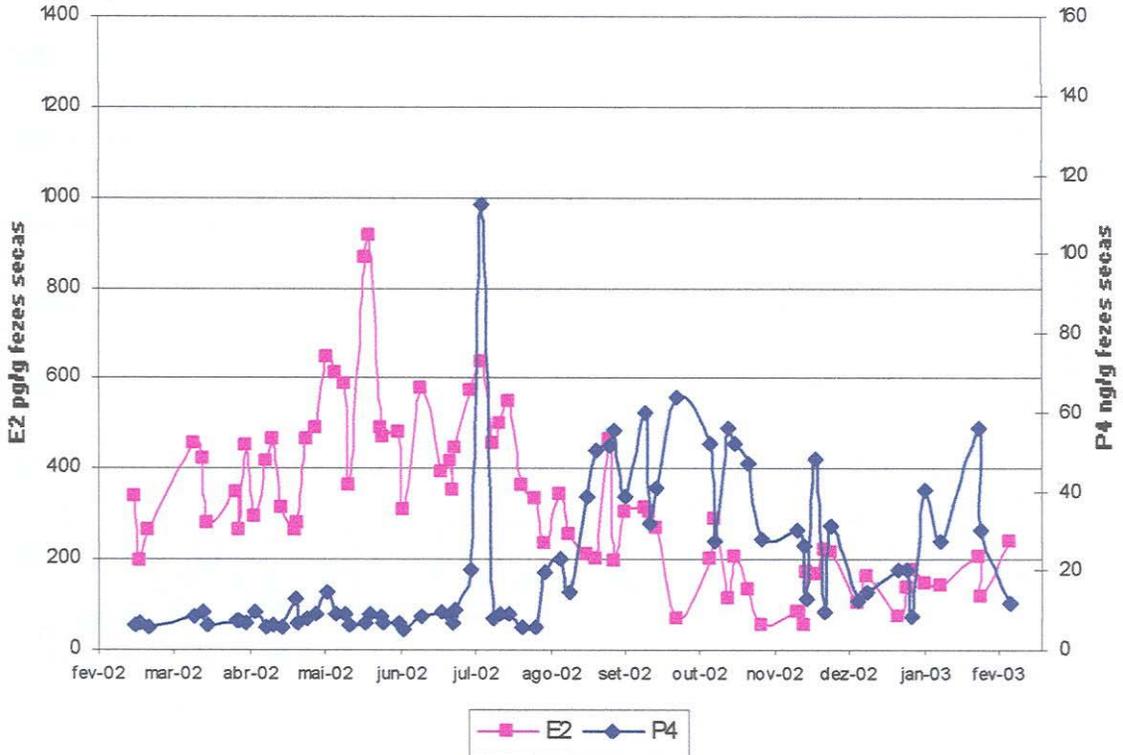
CUNHATAÍ

Figura 12 - Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) Cunhataí, com 7,5 anos de idade, entre março de 2002 e fevereiro de 2003

As concentrações de metabólitos fecais de progesterona variaram entre 4,78 e 112,23ng/g de fezes seca e as concentrações de metabólitos fecais de estradiol entre 53,35 e 914,70pg/g de fezes secas. A figura 12 revela atividade estrogênica entre os meses de maio e julho, apresentando neste intervalo, cinco picos. As elevações de progestinas, concentraram-se entre os meses de julho e novembro.

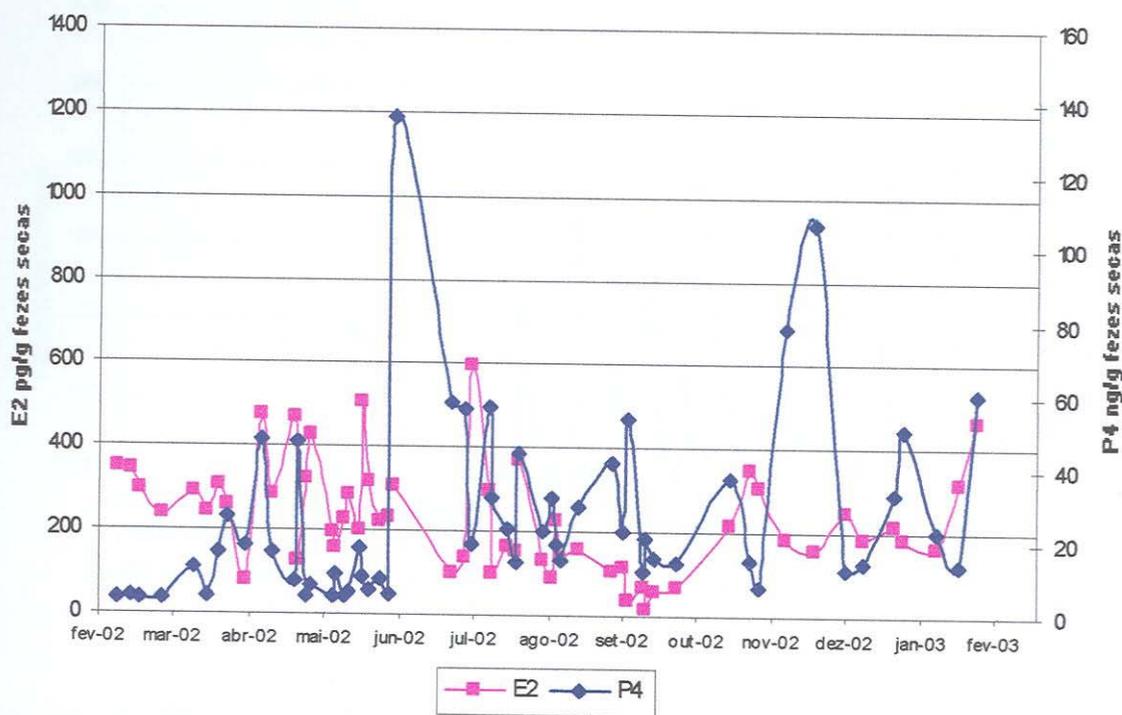
CAMBÁ

Figura 13 - Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) Cambá, em cativeiro por 18 anos, entre março de 2002 e fevereiro de 2003.

As concentrações de metabólitos fecais de progesterona variaram entre 4,05 e 136,15ng/g de fezes secas e as concentrações dos estrógenos fecais entre 13,25 e 596,40pg/g de fezes secas.

A figura 13 revela atividade estrogênica entre os meses de abril e julho, com cinco picos neste intervalo. As elevações de progestinas foram evidenciadas nos dias: 24/06/02, 29/11/02 e 10/12/02.



BOO

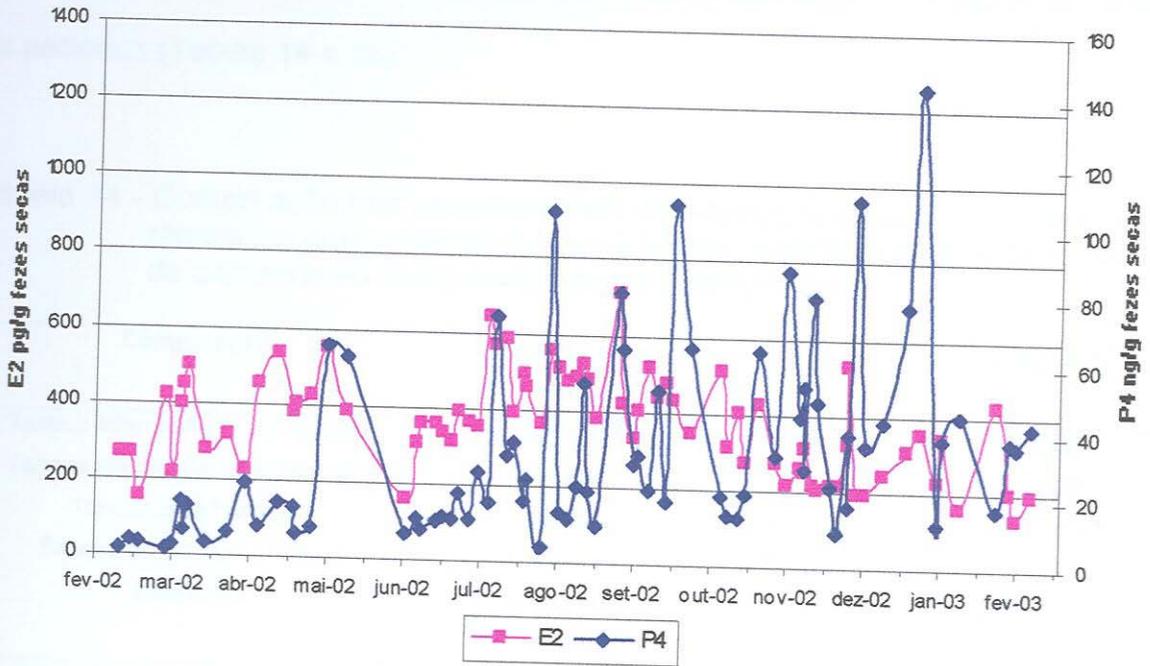


Figura 14 - Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) Boo com 28 anos de idade, entre março de 2002 e fevereiro de 2003

As concentrações de metabólitos fecais de progesterona variaram entre 1,76 e 143,54ng/g de fezes secas e os estrógenos fecais entre 130,68 e 708,65 pg/g de fezes secas. A figura 14 revela que as concentrações dos hormônios analisados, encontraram-se basais de 7/3/02 à 17/7/02 coincidindo com o período que ficou isolada no tanque intermediário. A retomada da atividade estrogênica ocorreu entre 29/7/02 até 18/9/02, quando ela foi manejada para o tanque 3. Esse período é caracterizado por quatro picos. A concentração das elevações de progestinas fecais foi observada entre os meses de agosto de 2002 a janeiro de 2003, com a ocorrência de oito elevações.



Para comprovar as diferenças da atividade folicular entre os manejos realizados com a Boo, aplicou-se o teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer, o qual demonstrou que existiu uma diferença estatística significativa entre os períodos (Tabela 14 e 15).

Tabela 14 - Comparação das concentrações de progesterinas fecais entre os manejos realizados com a fêmea de peixe-boi da Amazônia Boo, através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer

Comparação	Diferença entre médias	q	Valor de p
Tanque intermediário vs Tanque 3	-21,424	4,290	p<0,05
Tanque intermediário vs Tanque 1	-38,004	6,922	p<0,001
Tanque 3 vs Tanque 1	-16,580	3,117	p>0,05
Tanque vs Tanque 1 + Tupy	2,244	0,229	p>0,05
Diferença	Diferença entre médias	Intervalo de Confiança de 95%	
		De	Para
Tanque intermediário - Tanque 3	-21,424	-40,027	-2,820
Tanque intermediário - Tanque 1	-38,004	-58,453	-17,554
Tanque 3 - Tanque 1	-16,580	-34,114	38,601

*Se o valor de q for maior que 3.725 então o valor de p será menor que 0.05.

Tabela 15 - Comparação das concentrações de estrógenos fecais entre os manejos realizados com a fêmea de peixe-boi da Amazônia Boo através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer

Comparação	Diferença entre médias	q	Valor de p
Tanque intermediário vs Tanque 3	-100,70	5,163	p<0,05
Tanque intermediário vs Tanque 1	81,64	3,808	p<0,05
Tanque 3 vs Tanque 1	182,35	8,799	p<0,001
Tanque vs Tanque 1 + Tupy	219,17	5,750	p<0,001
Diferença	Diferença entre médias	Intervalo de Confiança de 95%	
		De	Para
Tanque intermediário - Tanque 3	-100,70	-173,35	-28,051
Tanque intermediário - Tanque 1	81,64	1,788	161,51
Tanque 3 - Tanque 1	182,35	104,98	259,72
Tanque vs Tanque 1 + Tupy	219,17	77,185	361,15

*Se o valor de q for maior que 3.725 então o valor de p será menor que 0.05.



TUKANO

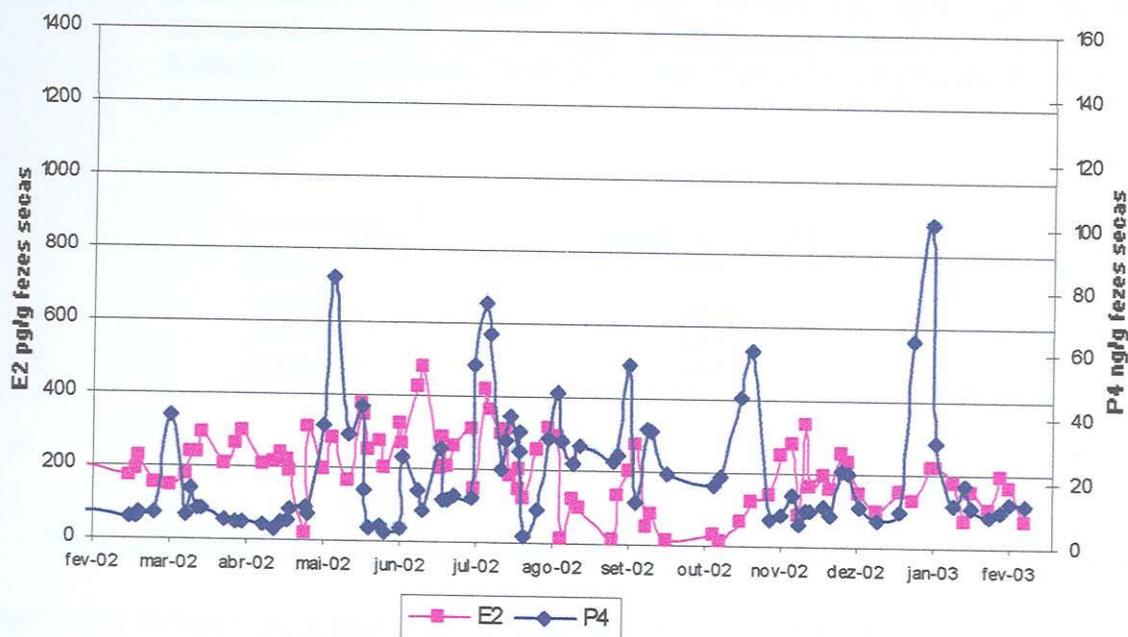


Figura 15 - Representação gráfica da flutuação dos metabólitos fecais de estradiol e progesterona da fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) Tukano, com 18 anos de cativeiro, entre março de 2002 e fevereiro de 2003

As concentrações de metabólitos fecais de progesterona variaram entre 2,35 e 101,05ng/g de fezes secas e as concentrações de estrógenos fecais variaram entre 13,25 e 477,89pg/g de fezes secas. A figura 15 revela atividade estrogênica entre os meses de junho e julho, com seis picos neste intervalo. A concentração das elevações de progesterona apresentou-se dispersa, com uma elevação no final de maio, três elevações no final de julho, uma no final de setembro, e uma no início de novembro de 2002, e duas em janeiro de 2003.



5.5 SAZONALIDADE

Tabela 16 - Determinação das fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica, tendo como base os dados da estação hidrológica das Missões na região de Tefé (AM), de 1991 à 2004 (Dados Projeto Boto e Instituto Mamirauá).

Fase	Semanas do Ano
Cheia	11-33
Vazante	34-38
Seca	39-47
Enchente	47-10

Para avaliação do efeito da variação do nível das águas sobre a atividade folicular das fêmeas de peixe-boi mantidas em cativeiro, foi realizada uma média \pm EPM para cada estação, para as fêmeas Miri, Aira, Cunhataí, Cambá. Excluiu-se as fêmeas Boo e Tukano pois estas apresentavam quadros fisiológicos particulares. (Tabela 17).

Tabela 17 - Concentrações médias e erro padrão da média de estrógenos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), nas diversas fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia amazônica

Animais	Ciclo Hidrológico			
	Cheia	Vazante	Seca	Enchente
Estrógenos Fecais (pg/g fezes secas)				
Aira	447,393	306,821	288,976	230,221
Cambá	273,058	141,163	137,232	247,161
Cunhataí	447,511	279,710	204,649	151,059
Miri	458,128	283,54	255,321	281,23
Média	406,522	252,862	221,545	227,566
EPM	36,383	30,789	26,959	22,593



Os resultados apresentados na tabela 17, mostram descritivamente que a média dos estrógenos fecais na fase de cheia é superior às outras fases. Para comprovar estatisticamente esta indicação, foi feito um teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer, para cada fase do ciclo hidrológico. O resultado desse teste está apresentado na tabela 18. Isto pode ser observado graficamente na Figura 16, onde as concentrações de estrógenos fecais são superiores na cheia.

Tabela 18 - Comparação das concentrações estrógenos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia nas diversas fases do ciclo hidrológico da bacia dos rios amazônicos, através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer

Comparação	Diferença entre médias	q	Valor de p
Cheia vs Vazante	153,66	4,236	P<0,05
Cheia vs Seca	184,98	5,099	P<0,05
Cheia vs Enchente	178,96	4,933	P<0,05
Vazante vs Seca	31,31	0,863	P>0,05
Vazante vs Enchente	25,29	0,697	P>0,05
Seca vs Enchente	-6,02	0,166	P>0,05
Diferença	Diferença entre médias	Intervalo de Confiança de 95%	
		De	Para
Cheia - Vazante	153,66	1,34	305,98
Cheia - Seca	184,98	32,66	337,29
Cheia - Enchente	178,96	26,64	331,27
Vazante - Seca	31,31	-121,00	183,63
Vazante - Enchente	25,29	-127,02	177,61
Seca - Enchente	-6,02	-158,34	146,29

Se o valor de q for maior que 4.199 então o valor de p será menor que 0.05.

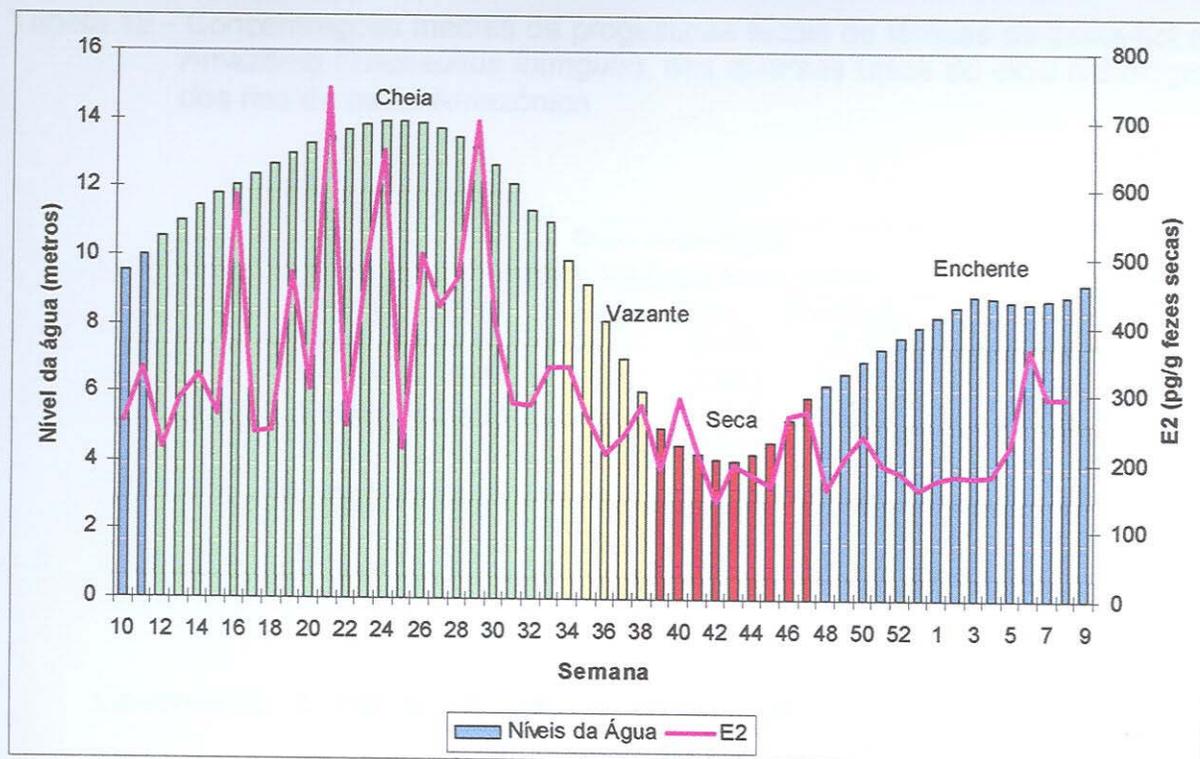


Figura 16 - Influência do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica (Missões-Tefé, altura em metros) sobre as concentrações médias semanais de estrógenos fecais (E2 pg/g fezes secas) de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro

Para avaliação geral do efeito do regime de águas sobre a atividade luteínica das fêmeas de peixe-boi mantidas em cativeiro, foi realizada uma média \pm EPM para cada estação, para as fêmeas Miri, Aira, Cunhataí, Cambá, excluimos as fêmeas Boo e Tukano, pois estas apresentavam quadros fisiológicos particulares, como demonstrado na tabela 19 e figura 17.



Tabela 19 - Concentrações médias de progesterinas fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), nas diversas fases do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica

Animais	Ciclo Hidrológico			
	Cheia	Vazante	Seca	Enchente
Aira	17,934	12,615	12,468	15,055
Cambá	23,230	26,624	22,335	39,723
Cunhataí	10,893	32,309	45,185	24,961
Miri	21,565	12,139	12,071	13,115
Média	18,405	20,922	23,015	23,213
EP	2,235	4,139	6,338	4,967

Observando a tabela 19, não é possível afirmar descritivamente se a diferença das médias de progesterinas fecais entre as diferentes fases do ciclo hidrológico é significativa. No teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer, o valor de p foi de 0,9249, não existindo diferença entre estas fases, comprovando que o regime de águas não influenciou nos níveis de progesterinas fecais das fêmeas de peixe-boi em estudo.

As médias semanais das concentrações de progesterinas fecais foram distribuídas em um gráfico com as médias semanais de profundidade do Lago das Missões (Tefé-AM), e observou-se que apesar das fases do ciclo hidrológico não diferirem, como demonstrado acima, pode-se visualizar a existência de elevações no terço final da cheia e no terço inicial da enchente (Figura 17).

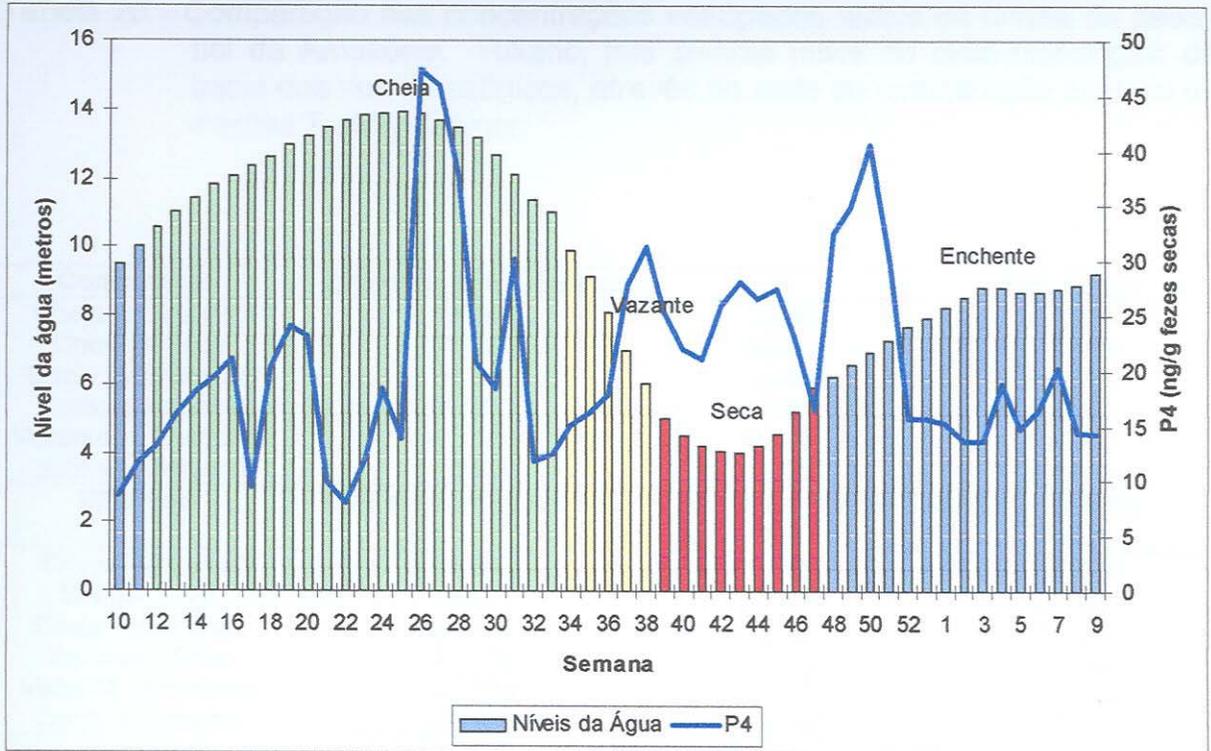


Figura 17 - Influência do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica (Lago das Missões - Tefé, profundidade em metros) sobre as concentrações médias semanais de progestinas fecais (P4 ng/g fezes secas) de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro

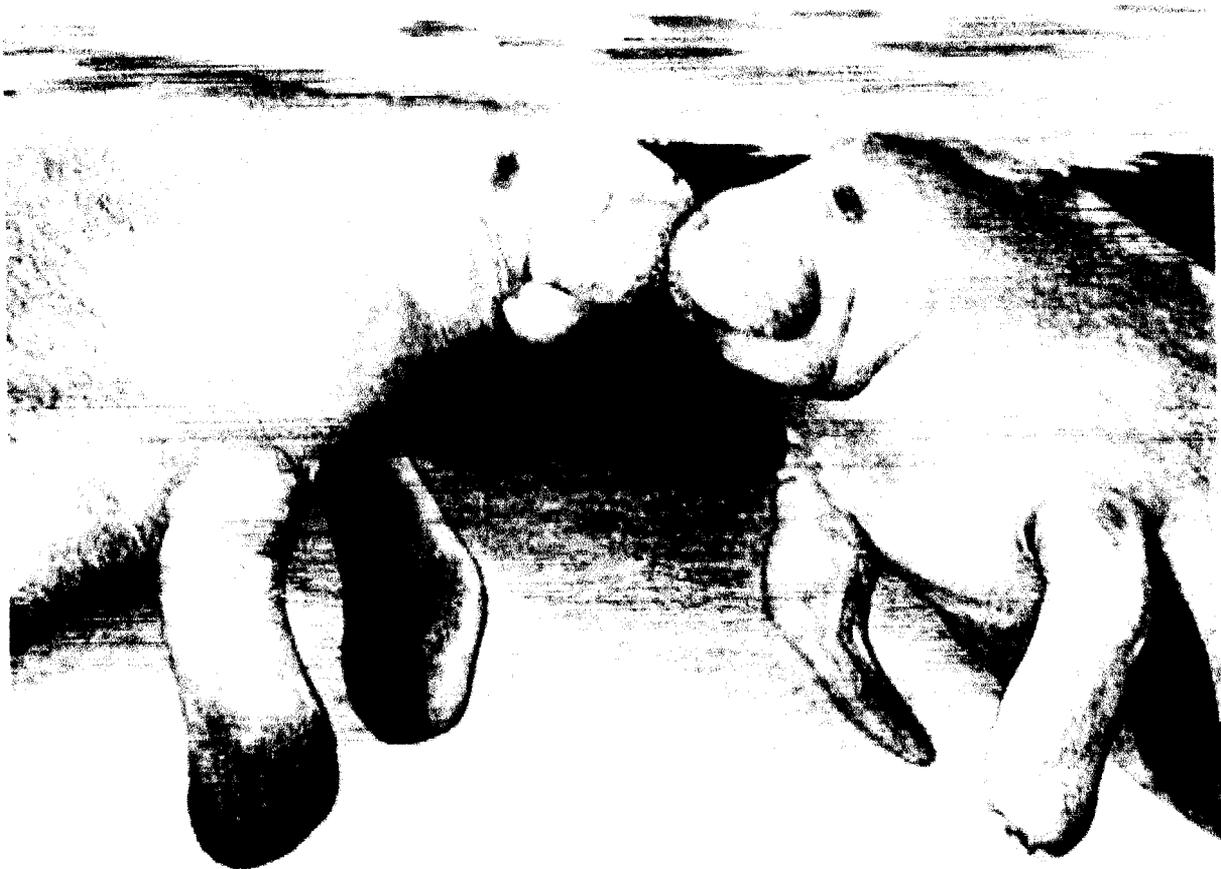
Para avaliar as diferenças da atividade folicular e luteínica da fêmea Tukano, em lactação, entre as diversas fases do ciclo hidrológico, aplicou-se o teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer, e demonstrou-se que a concentrações dos estrógenos fecais foram superiores na cheia quando comparado com as demais fases (Tabela 20), porém não houve diferença estatística entre as concentrações de progestinas ($p = 0,2995$).



Tabela 20 - Comparação das concentrações estrógenos fecais da fêmea de peixe-boi da Amazônia Tukano, nas diversas fases do ciclo hidrológico da bacia dos rios amazônicos, através do teste de comparação múltipla de médias Turkey-Kramer

Comparação	Diferença entre médias	q	Valor de p
Cheia vs Vazante	89,467	3,766	P<0,05
Cheia vs Seca	131,21	6,300	P<0,001
Cheia vs Enchente	64,349	4,055	P<0,05
Vazante vs Seca	41,738	1,451	P>0,05
Vazante vs Enchente	-25,119	0,988	P>0,05
Seca vs Enchente	-66,856	2,495	P>0,05
Diferença	Diferença entre médias	Intervalo de Confiança de 95%	
		De	Para
Cheia - Vazante	89,467	1,160	305,98
Cheia - Seca	131,21	53,794	337,29
Cheia - Enchente	64,349	5,356	331,27
Vazante - Seca	41,738	-65,204	183,63
Vazante - Enchente	-25,119	-119,59	177,61
Seca - Enchente	-66,856	-151,23	146,29

*Se o valor de q for maior que 3.717 então o valor de p será menor que 0.05.



Discussão



6 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi o de avaliar a função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia mantidas em cativeiro, relacionada à atividade ovariana, por meio da extração e quantificação de progesteronas e estrógenos fecais, proporcionando uma avaliação longitudinal e não-invasiva. Este tipo de abordagem foi realizada com o peixe-boi da Flórida (LARKIN, 2000) e em inúmeras outras espécies de animais (BROWN, et al., 1996; LASLEY; KIRKPATRICK, 1991; ROLLAND, et al., 2002; SAFAR-HERMANN, et al., 1987; SCHWARZENBERGER, FRANCKE; GOLTENBOTH, 1993; SCHWARZENBERGER et al., 1996, SCHWARZENBERGER et al., 1999; SHIDELER et al., 1993; VELLOSO et al., 1998).

O protocolo de extração foi determinado aliando eficiência, praticidade e baixo custo., em relação ao protocolo de extração desenvolvido por Larkin (2000), para os peixes-bois da Flórida. Com base nos resultados obtidos neste experimento, o conjunto diagnóstico comercial (DPC Medlab®) foi validado de forma satisfatória (Figuras 7 e 8) para o uso em extratos de fezes em fêmeas de peixe-boi da Amazônia assim como para outros animais (GRAHAM; BROWN, 1996, MORATO, 2001, VIAU, 2003).

A avaliação longitudinal da função reprodutiva foi baseada nas flutuações das progesteronas e estrógenos fecais, indicando períodos de atividade luteínica e folicular; no histórico reprodutivo e nas possíveis alterações relacionadas com os manejos realizados pela instituição mantenedora.

Apesar de mantidas em cativeiro por vários anos, foi possível observar, com a exceção das fêmeas Boo e TuKano, que a atividade folicular de todas as outras fêmeas analisadas coincidiu com o final do período de cheia do ciclo hidrológico dos



rios da bacia amazônica, como demonstrado na tabela 18 e figura 16. Por outro lado, a atividade luteínica não apresentou diferença estatística, porém graficamente nota-se uma elevação importante no terço final da cheia, níveis elevados aparentes na estação da vazante e seca inicial da enchente (Tabela 14 e Figura 17). Estas elevações das progesterinas fecais durante a estação da vazante, seca e enchente pode ser devido a presença de corpos lúteos persistentes. Rodrigues (2002) encontrou em uma fêmea de peixe-boi da Amazônia de seis anos treze folículos de Graaf no ovário direito e um corpo hemorrágico. Marmontel (1995) cita que na gestação do peixe-boi da Flórida foi encontrado uma média de 36,3 corpos lúteos. Deste modo estudos sobre o recrutamento e dinâmica folicular se fazem necessários para melhor compreensão deste processo.

Esta aparente sincronização pode ser causada pelas condições ótimas de alimentação existente na época da cheia, promovendo o acúmulo de gordura, e propiciando um estado fisiológico em que a fêmea consiga ciclar e manter uma gestação em condições limitadas de alimentação (BEST, 1982, 1983). A sazonalidade pode ser controlada pela disponibilidade de alimentos, uma vez que o processo reprodutiva possui um custo energético alto. (BRONSON, 1988). Em peixes-bois da Flórida Larkin (2000) observou dois picos reprodutivos anuais, relacionados disponibilidade de alimento e acesso ao estuário e água doce. Marsh, 1995, relata que o pico de nascimentos de dugongos também está relacionada com a disponibilidade de alimentos. Katugaha, Silva e Santiapillai (1999) reportam que nas duas espécies de elefantes, mesmo sendo animais poliétricos, concentram o período de nascimentos à condições ambientais favoráveis. Outras espécies, como as baleias, golfinhos e pinípedes apresentam estações de atividade e inatividade reprodutiva (BOYD; LOCKYER; MARSH, 1999), esta concentração da atividade



reprodutiva se expressa quando existe vantagem energética ou fisiológica, como a disponibilidade de alimentos, fotoperíodo, chuvas, entre outros fatores. Porém é necessário considerar que cada uma das fêmeas de peixe-boi analisadas neste estudo, possuiu um perfil endócrino único, pois fatores individuais como a interação social, histórico reprodutivo, resposta ao manejo e ao estresse de cativeiro atuaram de forma individual.

Valores de estrógenos fecais das fêmeas de peixe-boi da Amazônia em estudo, mantiveram-se elevados de 5 à 8 dias consecutivos (média = $6,4 \pm 0,45$ dias), caracterizando o período de estro. E o ciclo estral foi de 20 à 27 dias (média = $22,49 \pm 1,26$ dias). O ciclo estral do peixe-boi da Amazônia aproxima-se do peixe-boi da Flórida que possui um ciclo estral de 28 à 42 dias (LARKIN, 2000), e de outros herbívoros de grande porte como a vaca que possui um ciclo estral de 21 dias (JAINUDEEN; HAFEZ, 1995) e da égua de 19 à 22 dias (HAFEZ, 1995). Porém é quase um quarto da duração quando comparamos com o ciclo estral dos elefantes que é aproximadamente de 100 dias (BROWN et al., 1991).

A fêmea Tukano (Figura 15) apresentou concentrações dos estrógenos fecais superiores na fase cheia quando comparado com as demais fases (Tabela 20), porém não houve diferença estatística entre as concentrações de progestinas ($p = 0,2995$). Esta fêmea mesmo em lactação apresentou as flutuações hormonais semelhantes às quatro fêmeas avaliadas para sazonalidade, porém com concentrações inferiores quando em relação as outras fêmeas avaliadas para sazonalidade. Lopez, Satter e Witbank (2004), estudando vacas leiteiras relataram que a secreção de estradiol não é inibida durante a lactação, explicando a flutuação dos estrógenos fecais entre as fases do ciclo hidrológico.



A fêmea Boo apresentou um quadro endócrino particular, pois no início do experimento (7/03/02) até o dia 1/7/02, ficou isolada em um tanque intermediário, com dimensões reduzidas, amamentando dois filhotes adotivos, Manaós e Tapajós. Neste período as concentrações de progestinas e estrógenos fecais foram sensivelmente menores quando comparados após a transferência para o Tanque 3. Algumas hipóteses podem explicar este evento fisiológico nesta fêmea, como por exemplo estresse e a lactação.

É bem conhecido o efeito negativo do estresse sobre o desempenho reprodutivo, e que pode alterar os eventos hormonais e modificar a habilidade dos animais em expressar o ciclo estral normal (VARLEY, 1991), mas os exatos mecanismos que controlam esse efeito não estão bem esclarecidos (RAZDAN et al., 2001). Estressores ambientais (manejo, interação social, temperatura, condições das instalações) aumentam a secreção endógena de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a adrenal a produzir cortisol e esteróides sexuais, os quais inibem ou alteram a secreção de hormônios gonadotróficos, causando problemas de infertilidade ou baixa eficiência reprodutiva (FERIN, 1999; HENNESSY; WILLIAMSON, 1983; TSUMA et al., 1996; TSUMA et al., 1998).

Vários estudos têm evidenciado que as alterações hormonais, devido ao estresse crônico, causam problemas fisiológicos reprodutivos, tais como anestro, ciclo estral irregular, cistos ovariano, puberdade tardia, mortalidade embrionária, baixa taxa de ovulação (BARD et al., 1982; HENNESSY; WILLIAMSON, 1983; HJOLLUND et al., 1999; LOPEZ-CALDERON et al., 1990; TSUMA et al., 1991; VARLEY, 1991).

Os hormônios liberados em resposta ao estresse alteram as funções reprodutivas pelos três níveis do eixo hipotálamo – hipófise - gônada: no hipotálamo,



ocorre a inibição da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), na hipófise, ocorre alteração na liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), após a interferência com a liberação de GnRH, e finalmente ocorre o reflexo final nas gônadas alteração na liberação dos esteróides sexuais (RIVIER; RIVEST 1991),. O estímulo da adrenal induzido pelo estresse pode inibir a onda pré-ovulatória de GnRH-LH (DOBSON, et al. 2003). Em estudos com ratos machos Lopez-Calderon et al. (1990) verificaram uma supressão na liberação do LH e do FSH, devido à uma condição de estresse crônico. Outras evidências relacionadas ao efeito supressor dos glicocorticoides, vasopressina, ACTH, opioides e CRH sobre a secreção das gonadotrofinas também foi verificado em outras espécies (DOBSON; SMITH, 1995, FERIN, 1993; MOBERG, 1991, RIVEST; RIVIER, 1995). Talvez os glicocorticoides exerçam um efeito inibitório sobre a secreção dos esteróides pelas gônadas e altere a sensibilidade dos tecidos alvo para os esteróides sexuais (MAGIAKOU et al., 1997). Outros neurotransmissores podem estar envolvidos na resposta ao estresse, interferindo de maneira crucial no controle hipotalâmico da secreção de GnRH nas diferentes fases reprodutivas. Alguns podem ser estimulantes como a noradrenalina e o neuropeptídeo Y entretanto outros possuem um efeito inibitório, como os opioides e o ácido gama-amino-butírico (DOBSON et al., 2003)

Wolfe (2000), ressalta a importância de recintos adequados, com dimensões apropriadas para diminuição do estresse de cativeiro. Os fatores psicobiológicos devem ser levados em conta na avaliação da fertilidade (HJOLLUND et al., 1999, FERIN, 1999). Além disto práticas de enriquecimento dos recintos e tanques podem diminuir o estresse crônico causado pela monotonia de um recinto ou tanque. Esta



prática pode reduzir o efeito inibitório dos hormônios relacionados ao estresse sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (CARLSTEAD; SHEPHERDSON, 2000).

A partir do momento em que a fêmea Boo foi manejada para um tanque com dimensões maiores, as concentrações de progesterona e estrógenos fecais foram superiores às encontradas no tanque intermediário (Tabelas 14 e 15). Além das dimensões físicas, devem-se considerar as interações sociais, pois no tanque menor ela estava isolada com dois filhotes e no tanque maior passou a ter contato com duas fêmeas e um macho adultos. Mesmo os peixes-bois possuindo períodos curtos de interação social (LARKIN, 2000), estas são necessárias, mesmo sendo transitórias. Larkin (2000) sugere que pode ocorrer supressão da atividade hormonal em peixes-bois da Flórida induzidos por fatores relacionados à interação social. Talvez seja necessário um estímulo acústico, ou químico por feromônios ou a simples presença do macho para que as fêmeas de peixe-boi ciclem normalmente.

A outra hipótese a ser considerada é a questão da lactação, já que durante todo o período de estudo esta fêmea estava em lactação. Talvez a redução na concentração dos esteróides sexuais fecais sejam o reflexo deste fato, já que existe uma correlação inversa na produção de leite e a secreção de estradiol e conseqüentemente, na duração do estro (LOPEZ, SATTER; WITBANK, 2004). É possível que o estágio de lactação dos filhotes adotados por Boo explicaria as concentrações reduzidas dos estrógenos e progesterona fecais. Considerando que tanto a mudança de recinto quanto a lactação podem desencadear alterações fisiológicas importantes e que o acontecimento simultâneo destas duas condições, aliado as alterações hormonais, pode-se afirmar que a fêmea Boo apresentou alterações fisiológicas compatíveis a quadro de estresse.



Nascimento, Da Silva e Oliveira (2004), realizaram quantificações de progesterona plasmática, e foi observado um pico durante a enchente (17/01/03), voltando a valores basais em 18 dias, 4/2/03, retomando a valores altos depois de 10 dias (14/2/03), sustentando-se até o dia 3/2/04 quando deu à luz a um filhote macho em 3/02/04. Este perfil caracterizou um período de gestação de 351 ± 8 dias.

Ao observar as concentrações de progestinas fecais do início do período de gestação, verificamos que os valores permanecem basais, sugerindo que proporção das progestinas excretadas nas fezes durante a gestação são muito baixas; ou que o conjunto comercial de radioimunoensaio utilizado não foi eficiente para determinar as progestinas mais representativas durante o início da gestação. Schwarzenberger et al (2000), relatam que na gestação do rinoceronte indiano (*Rhinocerus unicornis*), os níveis de pregnanes excretados nas fezes aumentam após o terceiro mês de gestação. Talvez o mesmo ocorra nas fêmeas de peixe-boi, pois para correta avaliação seria necessário a análise de todas as fases da gestação e a determinação das progestinas encontradas em cada uma das fases.

Embora a resolução escala por minuto/hora seja perdida, a análise não invasiva de hormônios fecais ou presentes na urina é efetivo na definição e na monitoração durante longos períodos de eventos reprodutivos (MOREIRA, 2001).

Estudos com elefantes indicaram que concentrações baixas de progestinas fecais, é devido a presença de outras progestinas não quantificadas que são biosintetizadas e secretadas pelo corpo lúteo das fêmeas. (HEISTERMANN et al, 1997; HODGES et al, 1997) Estes autores descobriram metabólitos reduzidos do 5α , como 5α -pregnane-3,20 dione (5α -DHP) e o 5α -pregnane-3-ol-20-one (5α -P-3-OH), sendo a maior concentração de progestinas circulantes. Estes metabólitos possuem baixa reação cruzada com os conjuntos diagnósticos comerciais disponíveis,



explicando então a baixa concentração das progestinas. As mesmas progestinas de fêmeas de elefantes foram consideradas importantes por Greyling; Aarde; Potgieter (1997, 1998); Niemuller; Shaw; Hodges (1993), Hodges et al (1994), Hodges et al (1998), Dehnhard et al. (2001), em estudos de ciclo estral, de função luteínica, de receptores de progesterona endometriais. Talvez as fêmeas de peixe-boi da Amazônia apresentem metabólitos de progesterona excretados nas fezes semelhantes às fêmeas de elefantes. Desta forma o conjunto diagnóstico comercial em fase sólida (DPC MEDLAB[®]) utilizado para quantificação de progesterona, não se demonstra adequado, pois possui baixa reação cruzada com estes metabólitos (Anexo 1). Larkin (2000), obteve resultados semelhantes ao quantificar as progestinas das fezes de peixe-boi da Flórida, porém utilizando um conjunto diagnóstico comercial duplo anticorpo para quantificação de progesterona (ICN[®]).

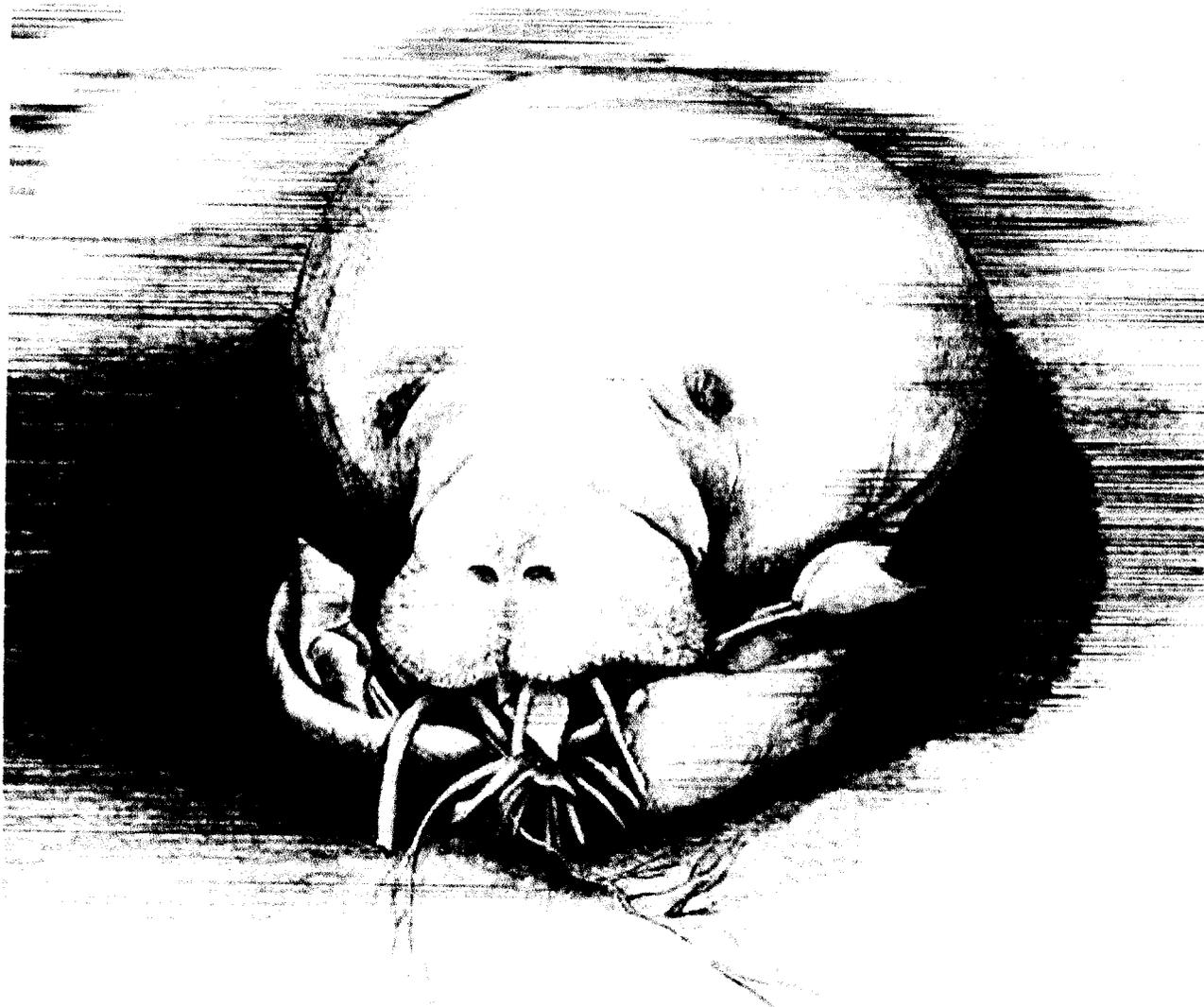
Deste modo, seria ideal a realização de um estudo para se determinar as vias de metabolização e excreção em peixes-bois, bem como a proporção destes metabólitos excretados nas fezes *versus* urina, administrando estradiol e progesterona radiomarcada, principalmente para o estudo da gestação nas fêmeas de peixe-boi da Amazônia. Porém ao se trabalhar com espécies selvagens ameaçadas encontramos limitações para conduzir este tipo de estudo. Apesar das dificuldades, muitos trabalhos foram publicados utilizando a infusão de esteróides radiomarcados, como no elefante africano (*Loxodonta africana*) (WASSER, et al., 1996), rinocerontes de Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis*) (HEISTERMANN et al, 1998), rinocerontes brancos (*Ceratotherium simum*) (HINDLE; HODGES, 1990) e com o cachorro selvagem africano (*Lyncaon pictus*) (MONFORT et al., 1997). Além destas espécies ameaçadas, existem outros estudos semelhantes com gato doméstico (*Felis catus*) (BROWN et al., 1994), babuínos (*Papio cynocephalus*)



(WASSER et al., 1994), e alguns animais domésticos como ovelha, cavalo e porco (PALME, et al., 1996), entre outros. Larkin (2000) não obteve sucesso ao tentar determinar os metabólitos de esteróides fecais de peixe-boi da Flórida, após a administração de progesterona estradiol radiomarcados.

A maioria dos metabólitos de esteróides fecais excretados são não conjugados (SCHWARZENBERGER et al. 1996) sendo os estrógenos excretados principalmente na forma de estrona e/ou 17α ou 17β estradiol. A maioria das progestinas fecais excretadas não estão sob a forma de progesterona, mas sim com 5α - ou 5β - pregnanediona ou pregnanes hidroxilados. Para identificação dos metabólitos utiliza-se a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), para posteriormente mensurar a imunorreatividade em um ensaio como o radioimunoensaio (RIE) ou enzimoimunoensaio (EIE).

Este foi o primeiro estudo hormonal longitudinal não-invasivo realizado com fêmeas de peixe-boi da Amazônia, e servirá como uma importante ferramenta nos programas de reprodução desta espécie em cativeiro, e para melhor compreensão dos eventos fisiológicos nos animais selvagens.



Conclusões



7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento, podemos concluir que:

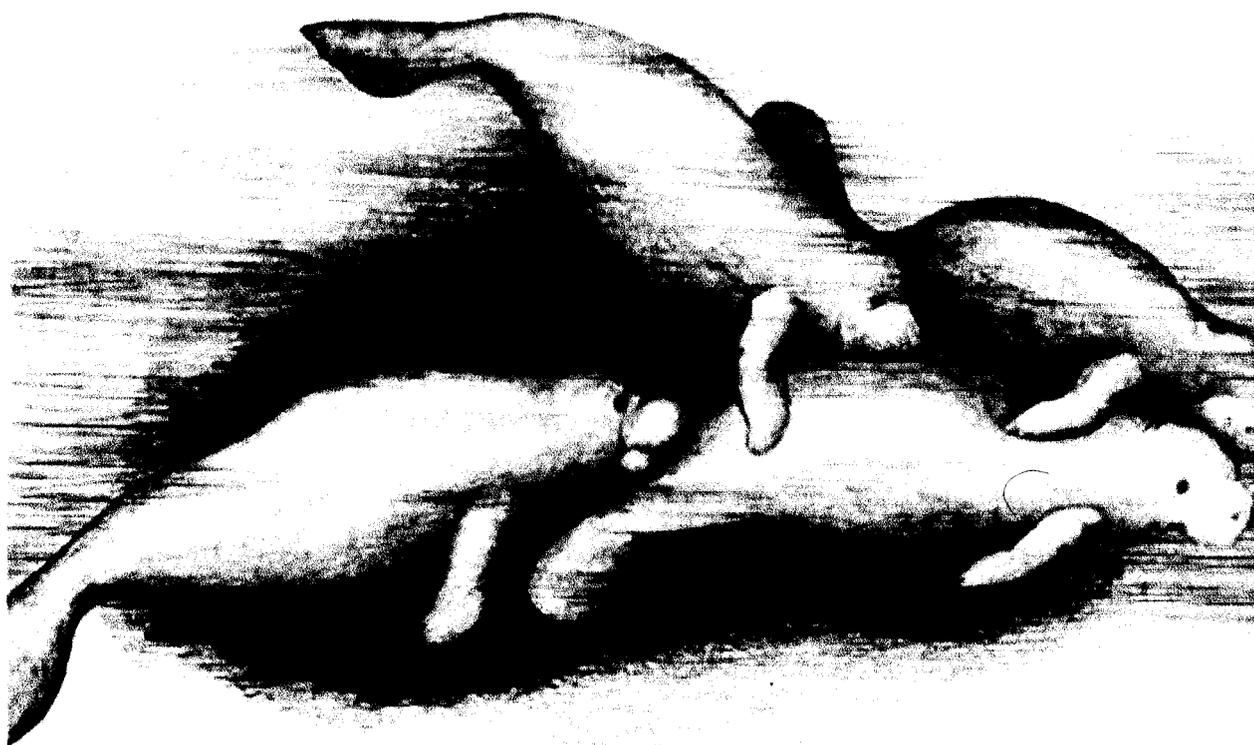
- ❖ Foi possível realizar uma avaliação longitudinal e não-invasiva da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia, mantidas em cativeiro, relacionada à atividade ovariana, por meio da extração e quantificação de progestinas e estrógenos fecais.
- ❖ O protocolo de extração de esteróides adaptado desenvolvido por Schwarzenberger et al (1991), utilizando fezes liofilizadas foi mais eficiente quando comparado às extrações realizadas com fezes úmidas e com o protocolo desenvolvido por Brown et al (1994) além de ser prático e ter um custo reduzido.
- ❖ Foi validado o conjunto diagnóstico comercial em fase sólida utilizado nos ensaios hormonais para o uso em extratos fecais de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), pelo método do paralelismo utilizando matriz íntegra.
- ❖ O monitoramento não invasivo da função reprodutiva foi eficiente na detecção de eventos reprodutivo como: estro ($6,4 \pm 0,45$ dias), ciclo estral ($22,49 \pm 1,26$ dias), fase folicular e períodos de elevações de progestinas.



- ❖ Mesmo após vários anos em cativeiro, a atividade folicular coincidiu com o período de cheia do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica, indicando uma possível sazonalidade da atividade reprodutiva.

- ❖ A atividade luteínica não apresentou diferença estatística quando comparadas entre as fases do ciclo hidrológico do Amazonas.

- ❖ Foi possível avaliar o efeito de agentes estressores sobre a atividade ovariana da fêmea Boo.



Referências

REFERÊNCIAS

- ASA, C. Reproductive physiology. In: KLEIMAN, D. G, ALLEN, M., THOMPSON, K. V., LUMPKIN, S. (Ed.). **Wild mammals in captivity: principles and techniques**. . Chicago: The University of Chicago Press, 1996. p. 390-417.
- BANKS, N. Captive manatee birth. **Sirenews**, n 28, p. 8, 1997.
- BARD, C. R.; KRAELING, R. R.; RAMPACEK, G. B.; FONDA, E. S.; KISER, T. E. Inhibition of ovulation and LH secretion in gilt after treatment with ACTH or hycortisone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 85-92, 1982.
- BERTRAM, G. C. L; BERTRAM, C. K. R. The modern Sirenian: their distribution and status. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 5, p. 297-338, 1973.
- BERTRAM, C. K. R. The Sirenia as aquatic meet producing herbivores. **Symposia of the Zoologica Society**, London, v. 21, p. 385-391, 1968.
- BEST, R. C. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: SIOLI, H. (Ed). **The Amazon. Limnology and landscape ecology of a might tropical river and its basin**, 1984, p. 371-411.
- BEST, R. C. Apparent dry-season fasting in Amazonian manatees (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, v. 15, n 1, p. 61-64, 1983.
- BEST, R. C., DA SILVA, V. M. F. Distribution of freshwater dolphins and manatees in the upper Rivers Negro and Orinoco. In: **BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 5., 1983, Boston. Abstracts..., 1983. p.9.**
- BEST, R. C.; GALLIVAN, G. J. E.; KANWISHER, J. W. Ecophysiology of amazonian manatee. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 15, n. 2-3, p. 193, 1982.



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

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

BOYD, I. L.; LOCKER, C.; MARSH, H. D. Reproduction in marine mammals. In: REYNOLDS, J. E., ROMMEL, S. A. (Ed), **Biology of marine mammals**. Washington, D. C.: Smithsonian Institution Press. 1999. p. 218-286.

BRONSON, F. H. Seasonal Regulation of Reproduction in mammals. In: KNOBIL, NEIL, J. (ED.). **The physiology of reproduction**. . New York : Raven Press. 1988 p.1831-1871.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetah: (*Acinonyx jubatus*) assessed by fecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 337-346, 1996.

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

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; HOWARD, J.; WELLS, S.; LANG, K.; COLLINS, L. RAPHAEL, B.; SCHWARTZ, R.; EVANS, M.; HOYT, T.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids. In: **CONGRESS OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS. – PROCEEDINGS...** 1993, .p.273-276.

BROWN, J. L. Cyclic patterns of luteinizing hormone, follicle-stimulation hormone, inhibin, and progesterone secretion in Asian elephant (*Elephas maximus*). **Journal Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, p. 49-57, 1991.



CALDWELL, D.K.; CALDWELL, M. C. Manatees *Trichechus manatus* (Linnaeus, 1758); *Trichechus senegalensis* (Link 1795) and *Trichechus inunguis* (Natterer, 1853). In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R (ED.) **Handbook of marine mammals: the sirenians and baleen whales**. London: Academic Press. 1985. v. 3, p. 33-66.

CARLSTEAD, K. ; SHEPHERDSON, D. Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J.A. (Ed.). **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. London: CABI Publishing. 2000. p. 337-334.

CATANHEDE, A. M. **Filogeografia de *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia) da Amazônia Brasileira**. 2002. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 2002.

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2000. Disponível : <www.cites.org>. Acesso em 25 de maio de 2004.

COLARES, I. G.; COLARES, E. Foods eaten by Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 67-72, 2002.

CZEKALA, N. M.; DURRANT, B. S.; CALLISON, L.; WILLIAMS, M; MILLARD, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v. 13, p. 119-128, 1994.

DA SILVA, V. M. F.. A new baby Amazonian mantee. *Sirenews*, n. 37, 2002.

DA SILVA, V. M. F.; DÁFFONSECA NETTO, J. A.; MATTOS, G. E.; SOUSA-LIMA, R. S.. Duração da lactação em peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*): estudo de caso de filhote nascido em cativeiro. **REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL. 9.**, Buenos Aires, **RESUMOS...** 2000. p. 39.



DA SILVA, V. M. F.; D'ÁFFONSECA NETTO; J. A.; FARACO, Z. R. C. R.; MATTOS, G. E. Conception and birth of the first Amazonian manatee *Trichechus inunguis* in captivity. **BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS**. 13. Maui. **ABSTRACTS...** 1999. p. 34.

DA SILVA, V. M. F.; D'AFFONSECA NETTO, J. A.; RODRIGUES, Z. M. C. Concepção e nascimento do primeiro filhote de peixe-boi da Amazônia em cativeiro. **REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL**. 8. Olinda. **RESUMOS...** 1998. p. 57.

DA SILVA, V. M. F. First Amazonian conceived and born in captivity. **Sirennews**, n30, p. 7, 1998.

DA SILVA, V. M. F. Os mamíferos aquáticos do Amazonas, sua organização social e comportamento. **Anais de Etologia**, v. 14, p. 263, 1996.

DE JONG, W. W., ZWEERS, A. Confirmação da relação entre os peixes-bois, hyrax e elefantes, por meio do estudo da proteína da lente dos olhos. **Acta Amazônica**, v. 10, n.4, p. 897-902, 1980.

DE JONG, W. W. Molecules remodel the mammalian tree. **Tree**, v. 13, p. 270-275, 1998.

DEHNHARD, M.; HEISTERMANN, M.; GORITZ, F.; HERMES, R.; HILDEBRANDT, T.; HABER, H. Demonstration of 2-unsaturated C₁₉-steroids in the urine of female Asian elephants, *Elephas maximus*, and their dependence on ovarian activity. **Reproduction**, v. 121, p. 475-484, 2001.

DESAULNIERS, D. M.; GOFF, A. K.; BETTERIDGE, K. J.; ROWELL, J. E.; FLOOD, P. F. Reproductive hormone concentrations in faeces during the oestrus cycle and pregnancy in cattle (*Bos taurus*) and muskoxen (*Ovibos moschatus*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, p. 1148-1154, 1989.



DOBSTON, H.; GHUMAN, S.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. **Reproduction**, v. 125, p. 151-163, 2003.

DOBSTON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.

DOBSTON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 451-461, 1995. Supplement.

DOMNING, D. P; HAYEK, L. C. Interespecific and intraespecific morphological variations in manatees (Sirenia- Trichechus). **Marine Mammal Science**. v. 2 n. 2, p. 87-144, 1986.

DOMNING, D. P. Commercial exploitation of manatees *Trichechus* in Brazil c. 1785-1973. **Biology Conservation**. p. 101-126, 1982.

DOMNING, D. P. Distribution and status of manatee *Trichechus spp* near mouth of the Amazonian river, Brazil. **Biology Conservation**, v. 19, p. 85-97, 1981.

FERIN, M. Stress and the reproductive cycles. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 6, p. 1768-1774, 1999.

FERIN, M. Neuropeptides: the stress response and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the female rhesus monkey. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 697, 106-116, 1993.

FIEB, M., HEISTERMANN, M., HODGES, J. K. Patterns of urinary and fecal steroids excretion during the ovarian cycle and pregnancy in the African elephant (*Loxodonta Africana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, p. 76-89, 1999.

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



GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. **Zoo Biology**, v. 15, p. 71-82, 1996.

GREYLING, M. D; FORD, M.; POTGIER, H. C.; VAN AARDE, R. J. Influence of gestation on uterine endometrial steroid receptor concentration in the African elephant, *Loxodonta africana* . **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 60-64, 1998.

GREYLING, M. D., VAN AARDE, R. J., POTGIER, H. C. Ligand specificity of uterine oestrogen and progesterone receptors in the subadult Africa elephant, *Loxodonta africana*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 199-204, 1997.

HAFEZ, E. S. E. Equinos. In: HAFEZ, E.S.E. (ED). Reprodução Animal. São Paulo. p. 366- 389, 1995.

HARTMAN, D. S. ecology and behaviour of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida. Special Publication. **The American Society of Mammalogists**, 280p., 1979.

HEISTERMANN, M.; AGIL, M.; BUTHE A.; HODGES, J. K. Metabolism and excretion of oestradiol-17 β and progesterone in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 157-172, 1998.

HJOLLUND, N. H. I.; JENSEN, T. K.; BONDE, P. J.; HENRIKESSEN, T. B.; ANDERSSON, A.; KOLSTAD, H. A.; ERNST, E.; GIWERCMAN, A.; SKAKKEBAEK, N. E.; OLSEN, J. Distress and reduced fertility: a follow-up study of first-pregnancy planners. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 1, p. 47-53, 1999.

HERNANDEZ, P., REYNOLDS, J.E., MARSH, H. E MARMONTEL, M. Age and seasonality in spermatogenesis of Florida manatees. In: O'SHEA, T.J.; ACKERMAN, B.B.; PERCIVAL, H F. (Ed.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**, U.S Department of Interior, 1995. p. 84-97.

HILTON, C. T. **IUCN red list of treathened Species**. Cambridge : IUCN, 2000. 61p.



HINDLE, J. E.; HODGES, J. K. *Metabolismo of oestradiol-17 β and progesterona in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 571-580, 1990.

HODGES, J. K.; HEISTERMANN, M.; BEARD, A.; VAN AARDE, R. J. Concentrations of progesterone and the 5 alpha-reduced progestins, 5 alpha-pregnane-3,20-dione and 3-alpha-hydroxy- 5 alpha- pregnan-20-one, in the luteal tissue and circulating blood and their relationship to luteal function in the African elephant, *Loxodonta Africana*. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 640-646, 1997.

HODGES, J. K.; VAN AARDE, R. J.; HEISTERMANN, M.; HOPPEN, H. O. Progestin content and biosynthetic potential of the corpus luteum of the African elephant (*Loxodonta africana*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 163-168, 1994.

HUSAR, S. L. *Trichechus inunguis*. **Mamamlian Species**, v. 72, p. 1-4, 1977

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Renováveis. **Plano de ação para os mamíferos aquáticos do Brasil**, Brasília, 1989. p. 34-49.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, E.S.E. (ED). **Reprodução Animal**. São Paulo. 1995.p. 319-334.

JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. Order Sirenia- manatees and Dugongs In: JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. (Ed). **Marine Mammals of the World - FAO species identification guide**, 1993, p. 204-213.

KATUGAHA, H. I. E.; DE SILVA, M.; SANTIAPILLAI, C. A long-term study on the dynamics of the elephant (*Elephas maximus*) population in Ruhuna National Park, Sri Lanka, **Biological Conservation**, v. 89, p. 51-59, 1999.



KIRBY, V. L. Endocrinology of marine mammals. In: DIERAUF, L. A. **Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation**. CRC Press, 1990. p.303-352.

KIRKPATRICK, J. F.; SHIDELER, S. E.; TURNER, J. W. pregnancy determination in uncaptured feral horses based on steroid metabolites in urine-soaked snow and free steroid in feces. **Canadian Journal of Zoology** , v. 68, p. 2576-2579, 1990.

LARKIN, I. L. V. **Reproductive endocrinology of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*): estrous cycle, seasonal patterns and behaviour**338 p. (Doctored) University of Florida, 2000.

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.

LAVERGNE, A.; DOUZER, E.; STICHLER, T.; CATZEFLIS, F. M.; SPRINGER M. S. Interordinal mammalian relationships: evidence for Paengulate monophyly is provide by complete mitochondrial 12 S rRNA sequences. **Molecular Physiology Evolution.**, v. 2, n.6, p. 245-258, 1996.

LAZZARINI, S. M., BARROSO, J. L., BEGROW, A. A caça de subsistência e comercial do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), no Estado do Amazonas – 1994 a 1997. **Reunião de Trabalho de Especialistas de Mamíferos Aquáticos da América do Sul**. 8. Olinda. Resumo... 1998. p. 105.

LOPEZ, H.; SATTER, L. H.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behaviour of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3-4, p. 209-223, 2004.

LOPEZ-CALDERON, A., GONZALES-QUIJANO, M. I., TRESQUERRES, J. A. F., ARIZNAVARETTA, C. Role of LHRH in the gonadotropiun response to restraint stress in intact rats. **Journal of Endocrinology**, v. 124, p. 241-256, 1990.



MAGIAKOU, M. A., MASTORAKOS, G., WEBSTER, E. E CHORUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Science** 816, p. 42-56, 1997.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – BRASIL. Instrução Normativa, nº 3, de 27 de maio de 2003

MARMONTEL, M. **The reproductive anatomy of the females manatee *Trichechus manatus latirostris* (Linnaeus, 1758) based on gross and histologic observations.** (Master Science). University of Miami, Florida, 91p., 1998.

MARMONTEL, M., ROSAS, F. C. W. El manati de Mamirauá: Plan de manejo para una especie amenazada en una reserva de desarrollo sostenible. In: **Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos da America del Sur, 7.**, Vina del Mar, 1996. p. 68.

MARMONTEL, M. Age and reproduction in females Florida manatees. In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1.** U.S. Department of interior, 1995 p. 98-119.

MARSH, H. The life history, pattern of breeding and population dynamics of the dugong. In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1.** U.S. Department of interior, 1995. p. 75-83.

MARSH, H; O'SHEA, T. J; BEST, R. C, Research on Sirenians. **Ambio**, v. 15, n. 3, p. 178-180, 1986

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



MARSH, H. Age determination of the dugong (*Dugong dugong*) and its biological implications. **International Whaling Commission Report**, v. 3, p. 181-201, 1980.

MIYAMOTO, M. M.; GOODMAN, M. Biomolecular systematics of eutherian mammals: phylogenetic patterns and classification. **Systematic Zoology**, v. 35, p. 230-240, 1986.

MOBERG, G. P. How behaviour stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. **Journal of Dairy Science**. v. 74, 304-311, 1991.

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

MORATO, R. G. **Reprodução assistida como ferramenta auxiliar no manejo de conservação de onça pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758)**. 2001. (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade São Paulo. São Paulo, 127p., 2001.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do Gênero *Leopardus***. 2001. 231f. (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

MÜHLING, P. Letter. **Sirenews**. v. 29, p. 2, 1998.

NASCIMENTO, C. C.; DA SILVA, V. M. F.; OLIVEIRA, C. A.. Pregnancy in Amazon manatees. Em fase de elaboração, a ser editado por Marine Mammal Science em 2005.

NASCIMENTO, C. C.; OLIVEIRA, C. A.; DA SILVA, V. M. F.; FELIPPE, E. C. G.; D’AFFONSECA NETO, J. A. The apparent period of pregnancy in Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) females kept in captivity base don plasmatic levels of progesterone. **Sirenews**, v. 39, p. 8, 2003.



NIEMULLER, C. A., SHAW, H. J., HODGES, J. K. Non-invasive monitoring of ovarian function in Asian elephants (*Elephas maximus*) by measurement of urinary 5 beta-pregnanetriol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 998, p. 617-625, 1993.

NISHIWAKI, M. E MARSH, H. Dugong: *Dugong dugon* (Muller 1776). In: RIDGWAY, S.H. E HARRISSON, S.R. (ED). **Handbook of marine mammals - the sirenians and baleen whales**. London: Academic Press, 1985. v.3, p. 1-31.

NISHIWAKI, M. Current status of the African manatee. **Acta Zoologica Fennica**, v. 172, p. 135-136, 1984.

NOVAREK, M. J.; WYSS, A. R.; MCKENNA, M. C. The mayor group of eutherian mammals. In: BENTON, M. J. (ED). **The phylogeny and classification of the tetrapods**. Oxford: Claredon, 1998. p. 31-71.

ODELL, D.K., BOSSART, G. D., LOWE, M. T., HOPKINS, T. D. Reproduction in west indian manatees in captivity. In In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**. U.S. Department of interior, 1995. p. 192-193.

O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**. U.S. Department of interior, 1995, 250 f.

O'SHEA, T. J., HARTLEY, W. C. Reproduction na early-age survival of manatees at Blue Spring, Upper St Johns Rivers, Florida. In: In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**. U.S. Department of interior, 1995. p. 157-170.



O'SHEA, T. J. LANGTIMM, Estimation of survival of adult Florida manatees in the Cristal River, at Blue Spring and on the Atlantic Coast. In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**. U.S. Department of interior, 1995. p. 194-222.

PALME, R., FISCHER, P., SCHLDORFER, H., ISMAIL, M. N. excretion of infused 14-C steroid via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**. V. 43, p. 43-63, 1996.

PATTON, M. L.; SWAISGOOD, R. R.; CZEKALA, N. M.; WHITE, A. M.; FETTER, G. A.; MONTAGNE, J. P.; RIECHES, R. G.; LANCE, V. A. reproductive cycle length and pregnancy in the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observation of mating behaviour. **Zoo Biology**, v. 18, p. 111-127, 1999.

PERRIN, W. F.; REILY, S. B. Reproductive patterns of dolphins and smalls whales of the family Delphinidae. **International Whaling Commission Reports**, v. 6, p. 97-133, 1984.

PIEIDADE, M. T. F.; JUNK, W. J.; LONG, S. P. The productivity of the C4 grass *Echinochloa polytachya* on the Amazon floodplain. **Ecology**, v. 72, p. 1456-1463, 1991.

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

PREEN, A. Observation of mating behaviour in dugongs (*Dugong dugong*). **Marine Mammal Science**, v. 5, p. 382-387, 1989.



RATHBUN, G. B.; REID, J. P.; BONDE, R. K.; POWELL, J.A. Reproduction in free-ranging Florida manatees. In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**. U.S. Department of interior, 1995. p. 135-156.

RAZDAN, P.; MWANZA, A. M.; KINDAHL, H.; HULTEN, F.; EINARSSON, S., Impact of post ovulatory food deprivation on the ova transport, hormonal profiles and metabolic changes in sows. **Acta Vet. Scand**, v. 42, p. 15-25, 2001.

REEVES, R.; LEATHERWOOD, S. Amazonian manatee, *Trichechus inunguis*, in Peru: Distribution, exploitation and conservation status. **Interciência**, v. 21, 1996.

REID, J. P.; BONDE, R. K.; O'SHEA, T. J. Reproduction and mortality of radio-tagged and recognizable manatees on the Atlantic Coast of Florida. In: O'SHEA, T.J., ACKERMAN, B.B. E PERCIVAL, H. F. (ED.) **Population biology of Florida manatees – Information and technology report 1**. U.S. Department of interior, 1995. p. 171-191.

REYNOLDS III, J. E., Aspects of the social behaviour and herd structure of semi-isolated colony of West Indian manatees, *Trichechus manatus*. **Mammalia**, v. 45, p. 431-461, 1981.

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

RIVEST, S.; RIVIER, C. the role of corticotrophin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. **Endocrine Reviews**. v. 16, 177-199, 1995.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GEARHART, S.; REIDARSON, T. R.; MCBAIN, J. F.; MONFORT, S.L Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). **Biology of Reproduction**, v. 28, 2004.



RODRIGUES, F. R. **Características histológicas do aparelho reprodutor feminino de *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883) (Mammalia: Sirenia)**, 2002. 114f. (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade do Amazonas. Manaus, 2002.

RODRIGUES -CHACÓN, Z. M. **Características alimentares e nutricionais do peixe-boi da Amazônia *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia em condições de cativeiro)**. 2001. (Doutorado) . Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade do Amazonas. Manaus, 2001.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; WASSER, S. K.; O'HARA, T. M.; KRAUS, S. D. Development of fecal steroid hormone metabolite analysis to study reproductive dysfunction and stress in the western north Atlantic Right Whale. **Florida Mammal Health Conference**. Gainesville, 2002. **Proceedings...** Disponível: www.vetmed.ufl.edu/flmmhc

ROMMEL, S. A; LOWESTINE, L. J. Gross and Microscopic Anatomy. In: DIERAUF, L. A, GULLAND, F.M.D. (Ed.). **Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation**. CRC Press, 2001. p.129-164.

RONALD, K.; SELLEY, L.J; AMOROSO, E.C. Biological synopsis of the manatee. Othawa Inst. Development Res. Centre, 1978. p. 172.

ROSAS, F.C.W. & MARMONTEL, M. Telemetria do peixe-boi da Amazônia na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.. **Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, I Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos**. Viña del Mar, **RESUMOS...**, 1996.

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



SAFAR-HERMANN, N.; ISMAIL, M. N.; CHOI, H. S.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E. Pregnancy Diagnosis in Zoo Animals by Estrogen Determination in Feces. **Zoo Biology**, v. 6, p. 189-193, 1987.

SCHWARZENBERGER, F, RIETSCHEL, W., VAHALA, J., HOTECKOVA, D., THOMAS, P., MALTZAN, J., BAUMGARTNER, K., SCHAFTENAAR, W. Fecal progesterone, estrogen and androgen metabolites for noninvasive monitoring of reproductive function in the female Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 3, p. 300-307, 2000.

SCHWARZENBERGER, F; RIETSCHEL, W.; MATERN, B.; SCAFTENAAR, W.; BIRCHER, P.; VAN PUIJENBROECK, B.; LEUS, K. Noninvasive reproductive monitoring in the okapi (*Okapia johnstoni*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n.4, p. 497-503, 1999.

SCHWARZENBERGER, F. ; WALZER, C.; TOMASOVA, K.; VAHALA, J.; MEISTER, J.; GOODROWE, K. L.; ZIMA, J.; STRAUB, G.; LYNCH, M. Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 173-190, 1998.

SCHWARZENBERGER, F.; SON, C. H.; PRETTING, R.; ARBETIER, K. Use of group-specific antibodies to detect fecal progesterone metabolites during the estrous cycle of cows. **Theriogenology** , v. 46, p. 23-32, 1996.

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.

SCHWARZENBERGER, F.; TOMÁSOVÁ, K.; HOLECKOVÁ, T.; MATTERN, B, MÖSTL, E. Measurement of fecal steroids in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassay for 20-oxo-pregnanones. **Zoo Biology**, v. 15, p. 159-171, 1996.



- SCHWARZENBERGER, F.; FRANCKE, R.; GÖLTENBOTH, R. Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrus cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 285-291, 1993.
- SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E.; PAMMER, J.; SCHMEHLIK, O. Concentrations of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, Trotter and Thoroughbreds mares. **Journal of Reproduction and Fertility** v.44, p. 489-499, 1991. Supplement.
- SHAW, H. J.; GREEN, D. I.; SAINSBURY, A. W.; HOLDT, V. W. Monitoring ovarian function in scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) by measurement of fecal 20-alpha-progestagen metabolites. **Zoo Biology**, v. 14, p. 239-250, 1995.
- SHIDELER, S. E.; ORTUNO, A. M.; MORÁN, F. M.; MOORMAN, E. A.; LASLEY, B., L. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogens and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1290-1298, 1993.
- SHOSHANI, J., MCKEENA, M. C. Higher taxonomia, relationships among extant mammals based on morphology with selected comparisons of results from molecular datas. **Molecular Physiology Evolution** v. 13, n.9, p. 572-584, 1998.
- SILVEIRA, E. K. P. O manejo dos manatis do caribe, *Trichechus manatus manatus* (Linné, 1778), e da Amazônia *Trichechus inunguis* (Natter, 1883), em cativeiro e alguns aspectos da sua história natural. **B. FBCN**, v. 23, p. 82-103, 1988.
- SPRINGER, M. S., KIRSCH, J. A. W. A molecular perspective on the phylogeny of placental mammals based on mitochondrial 12 S rRNA sequences, with special reference to the problem Paengulate. **Journal of Mammalian Ecology**., v 1, p. 149-166, 1993.



SOUSA-LIMA, R. S. Ontogeny of individually distinct vocal patterns in manatee. **BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS. 14.** Vancouver, **ABSTRACTS...v.3**, 2002.

SOUSA-LIMA, R. S.; PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. vocal discrimination of two species of manatees (*Trichechus inunguis* and *Trichechus manatus*). **Journal of the Acoustical Society of America**, v. 106, p. 2164. 1999.

SOUSA-LIMA, R. S., SILVA, V. M. F. Four-year consistency in individual vocal pattern of *Trichechus inunguis*. **BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS. 14.** Vancouver, **ABSTRACTS...v.3**, 2002, v3. p.201.

SOUSA-LIMA, R. S., SILVA, V. M. F. Lack of species-specific vocal recognition in Amazonian manatees – *Trichechus inunguis*. **Journal of the Acoustical Society of America**. v. 108 (5:2), p. 2542, 2000a.

SOUSA-LIMA, R. S., SILVA, V. M. F. Reconhecimento vocal específico em peixe-boi da Amazônia *Trichechus inunguis*. **REUNION DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS DE MAMÍFEROS ACUATICOS DE AMÉRICA DEL SUR Y 3º CONGRESO DE SOLAMAC. 9.** Buenos Aires. **RESUMOS... v. 1**, p. 127, 2000b.

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

TSUMA, V. T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; FOSBERG, M; , LUNDEHEIN, N. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. **Acta Vet. Scand.**, v. 39, p. 71-76, 1998.

TSUMA, V. T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; KINDAHL, H.; LUNDEHEM, N., Effect of food deprivation during early pregnancy on endocrine changes in primiparous sows. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 267-278, 1996.



- VARLEY, M. Stress and reproduction. **Pig News and Information**, v. 12, p. 567-571, 1991.
- VELLOSO, A. G.; WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; DIETZ, J. M. Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 96-107, 1998.
- VIAU, P. F. **Estudo da avaliação ovariana em fêmeas de onça pintada (*Panthera onca* Linnaeus, 1758), mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais.** 2003. 83f. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade de São Paulo, São Paulo, 83p. 2003.
- WALKER, L. A.; CORNELL, L.; DAHL, K. D.; CZEKALA, N. M.; DARGEN, C. M.; JOSEPH, B.; HSUEH, A. J.; LASLEY, B. L. Urinary concentration of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales (*Orcinus orca*), during ovarian cycles and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 5, p. 1013-1020, 1988.
- WASSER, S. R.; MONFORT, S. L.; SOUTHERSW, J.; WILDT, D. E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 213-220, 1994.
- WASSER, S. K.; PAPAGEORGE, S.; FOLEY, C.; BROWN, J. L. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant and patterns of fecal steroid concentration through the estrous cycle. **General Comparative Endocrinology**, v. 102, p. 255-262, 1996.
- WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E. Rapid extraction of faecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. v.92, p.415-423, 1991.

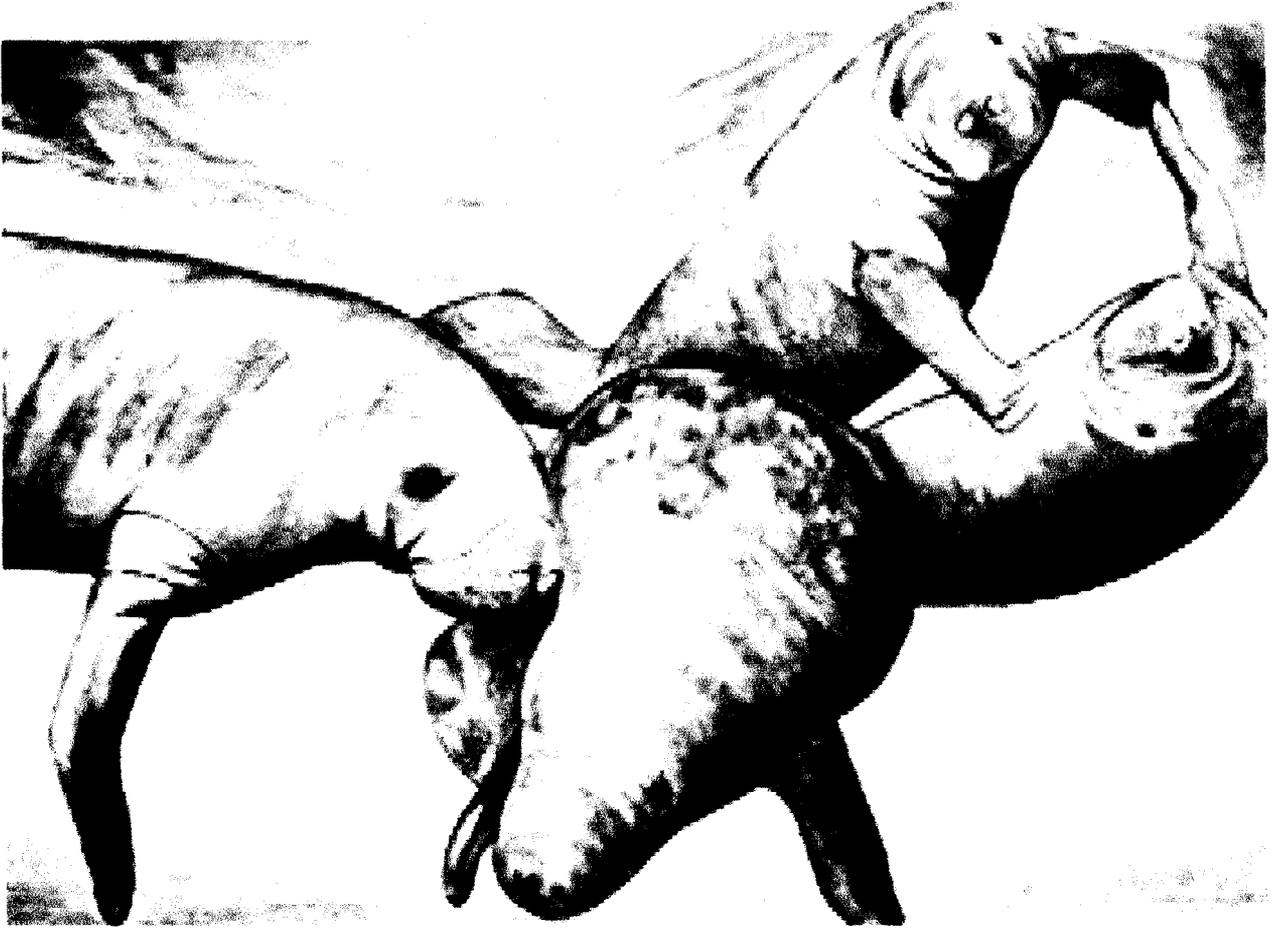


WHITE, J. R.; FRANCIS-FLOYD, R. Manatee biology and medicine. In: DIERAUF, L. A. **Handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation.** CRC Press, 1990. p. 601-623.

WISLOCKI, G. B. The placentation of the manatee. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology- at Harvard College**, vol54, n. 3, p. 159-178, 1935

WOLFLE, T. L. Understanding the role of stress in animal welfare: practical considerations. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J.A (ED.) **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.** London: CABI Publishing, 2000. p. 335-368, 2000.

YAMAMOTO, E. Y. **Adaptação da técnica de extração de esteróides fecais para avaliação da função reprodutiva do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758).** 2001. Projeto de Iniciação científica - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.



Anexo



Anexo

TABELA 21. Metabólitos dosados no conjunto diagnóstico comercial DPCMedlab®.

Progesterona Coat a Count DPC	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Progesterona
9,0	5 α Pregnanediona
3,4	17 α hidroxiprogesterona
3,2	5 β Pregnanediona
2,2	11-Deoxicorticosterona
0,9	Corticosterona
0,1	Pregnenolona
0,05	5 β -pregnane-3 α -ol-20-one
0,05	5-pregnane-3 β -ol-20-one-sulfato
Estradiol Coat a Count DPC	
% de reação cruzada	Esteróide
100	Estradiol 17 β
10,0	Estrona
0,80	Equilina
0,58	Sulfato de estrona