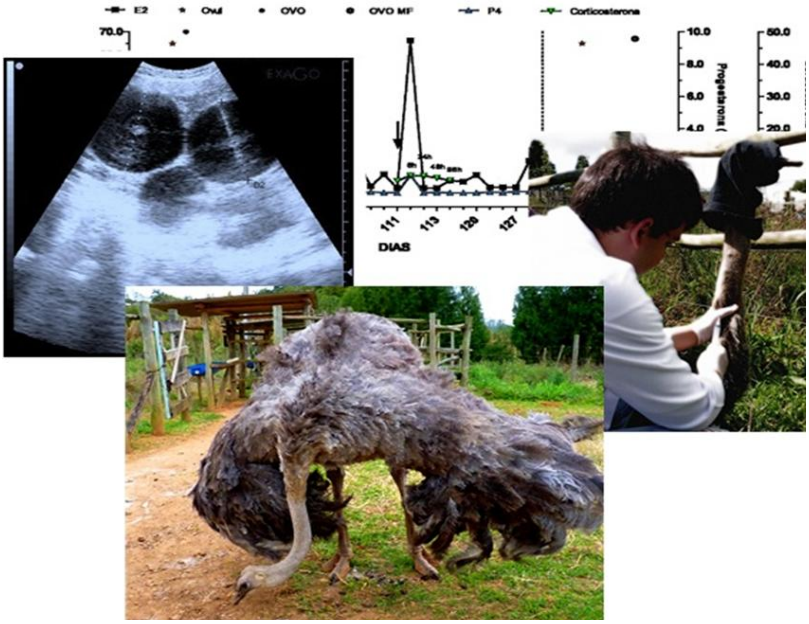
GUILHERME COSTA DE OLIVEIRA E SILVA

Análise ultrassonográfica, comportamental e produtiva dos efeitos do tratamento com análogo de GnRH em fêmeas de avestruz (*Struthio camelus*)



São Paulo

2012

GUILHERME COSTA DE OLIVEIRA E SILVA

Análise ultrassonográfica, comportamental e produtiva dos efeitos do tratamento com análogo de GnRH em fêmeas de avestruz (*Struthio camelus*)

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2616
FMVZ

Silva, Guilherme Costa de Oliveira e
Análise ultrassonográfica, comportamental e produtiva dos efeitos do tratamento com análogo de GnRH em fêmeas de avestruz (*Struthio camelus*) / Guilherme Costa de Oliveira e Silva. -- 2012.
155 p. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. Avestruz. 2. Reprodução. 3. Hormônios. 4. Ultrassom. 5. Análogo de GNRH. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise do efeito de dois diferentes tratamentos com análogo de GnRH nos níveis séricos de estradiol, progesterona e corticosterona, análise ultra-sonográfica de ovário e postura de ovos em avestruz (*Struthio camelus*)", protocolado sob o nº 1931/2010, utilizando 10 (dez) avestruzes, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Effect of two GnRH analog treatments in serum levels of estradiol, progesterone and corticosterone, ultrasonographic analysis of the ovarium and oviposition in ostriches (*Struthio camelus*)", protocol number 1931/2010, utilizing 10 (ten) ostriches, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FMVZ

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Guilherme Costa de Oliveira e

Título: Análise ultrassonográfica, comportamental e produtiva dos efeitos do tratamento com análogo de GnRH em fêmeas de avestruz *(Struthio camelus).*

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

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e às minhas irmãs Priscylla e Tânia, que sempre foram exemplos de vida para mim.

Aos meus futuros sogros Sra. Olga e Sr. Guilherme que sempre me apoiaram desde a graduação até hoje!

Aos amigos e familiares pelas muitas horas de alegria e felicidades.

E... a você, Daniela...

...que roubou meu coração...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães que de forma brilhante vem me ajudando durante todos esses anos.

Ao Sr. Akira Aoyama e seu filho Jorge Aoyama, por permitir realizar este estudo na propriedade de vocês.

À FAPESP pelo apoio concedido ao estudo.

A todos que ajudaram neste estudo, sinta-se abraçado como forma de expressar minha gratidão.

Gostaria de agradecer a todos do Departamento de Reprodução Animal pelos anos de convívio e aprendizado.

RESUMO

SILVA, G. C. O. **Análise ultrassonográfica, comportamental e produtiva dos efeitos do tratamento com análogo de GnRH em fêmeas de avestruz *(Struthio camelus).*** [Ultrasound, behavioral and productive analysis of the effects of GnRH analog treatment in female ostriches (*Struthio camelus*)]. 2012. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A falta de conhecimento sobre a reprodução do avestruz dificulta o desenvolvimento da sua criação comercial devido a uma baixa eficiência reprodutiva. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da aplicação de um análogo de GnRH (lecirelina - Gestran Plus®) na indução da ovulação em fêmeas adultas de avestruz. Primeiramente, um grupo de 10 fêmeas foi avaliado para determinação de seu status reprodutivo, por meio da mensuração das concentrações séricas de estradiol e progesterona (coletas de sangue 3x/semana); da observação do comportamento reprodutivo; da determinação do desenvolvimento ovariano por exame ultrassonográfico (a cada 21 dias); e pela postura de ovos. Após o término desta primeira fase, as fêmeas foram separadas em grupo controle (n = 3) e grupo tratado (n = 6). A cada semana, 2 fêmeas do grupo tratado eram selecionadas para a aplicação intramuscular de 1ml (25µl) de lecirelina, e os seus efeitos avaliados pela análise das concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona (0h, 6h, 24h, 48h e 96h pós-aplicação); pela verificação do desenvolvimento ovariano e ocorrência de ovulação através de exames ultrassonográficos (24h, 48h e 96h); pela observação de comportamento reprodutivo (0h, 48h e 96h) e pela postura de ovos. O tratamento foi repetido no mesmo animal a cada 21 dias e em cada tratamento realizado, 2 fêmeas do grupo controle eram submetidas às mesmas análises. Os resultados indicam que a aplicação de lecirelina foi capaz de induzir a ovulação em 77% dos tratamentos realizados, com postura de ovos normais em 50% das induções. Assim, o tratamento proposto foi considerado eficiente na indução da ovulação em fêmeas de avestruz desde que seja aplicado em fêmeas que apresentem ovário bem desenvolvido.

Palavras-chave: Avestruz. Reprodução. Hormônios. Ultrassom. Análogo de GNRH.

ABSTRACT

SILVA, G. C. O. **Ultrasound, behavioral and productive analysis of the effects of GnRH analog treatment in female ostriches (*Struthio camelus*).** [Análise ultrassonográfica, comportamental e produtiva dos efeitos do tratamento com análogo de GNRH em fêmeas de avestruz *(Struthio camelus)*]. 2012. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The lack of knowledge about the ostrich reproduction delays the development of the ostrich commercial breeding due to a low reproductive performance. The aim of this study was to evaluate the effect of the application of an analog of GnRH (Lecirelin - Gestran Plus®) for induction of ovulation in adult female ostriches. Initially, a group of 10 adult female ostriches were evaluated in order to determine their reproductive status, by measuring serum levels of estradiol and progesterone (blood sampling - 3 times a week), by the observation of reproductive behavior, by the evaluation of the ovarian development through ultrasound examination (repeated every 21 days) and by the egg laying data. After the end of the first phase, female ostriches were separated into a control group (n = 3) and a treated group (n = 6). Every week, two females from the treated group were selected to receive the treatment: an intramuscular application of 1 ml (25µl) of Lecirelin. The effect of the application was evaluated by the analysis of serum concentrations of estradiol, progesterone and corticosterone (0h, 6h, 24h, 48h and 96h post-application), by the verification of the ovarian development and the occurrence of ovulation through ultrasound examinations (24h, 48h and 96h), by the observation of reproductive behavior (0h, 48h and 96h) and by the egg laying data. The intramuscular application was repeated in the same animal every 21 days and two females from the control group were subjected to the same analysis during each treatment. The results indicate that the application of Lecirelin was able to induce ovulation in 77% of the treatments with normal egg laying in 50% of inductions. Thus, the treatment was found effective in inducing ovulation in female ostrich provided that it is applied in females who exhibit well developed ovary.

Key words: Ostrich. Reproduction. Hormones. Ultrasound. GnRH analog.

LISTA DE FIGURAS

Todas as imagens ou fotos apresentadas neste trabalho são do próprio autor e podem ser reproduzidas desde que citada a fonte.

Figura 1 – Contenção física de fêmea de avestruz com capuz para a coleta de sangue através da punção da veia jugular direita – Ibiúna/SP – 2011 48

Figura 2 – Aproximação do observador pelo lado de fora do piquete para realizar a avaliação e observação do comportamento reprodutivo de uma fêmea de avestruz – Ibiúna/SP – 2011 49

Figura 3 – Comportamento reprodutivo de uma fêmea de avestruz: A) posição de abaixar e bater de asas (ASA); B) abaixar e o balançar pendular da cabeça com bater de bico (BICO); C) Posição de aceitação de cópula (AC) – Ibiúna/SP – 2011 50

Figura 4 – Realização do exame de ultrassonografia ovariana em fêmea de avestruz. Notar posicionamento do transdutor na virilha da ave – Ibiúna/SP – 2011 54

Figura 5 – Imagens ultrassonográficas do oviduto das fêmeas P2 (A) e P4 (B) demonstrando a presença de ovo em desenvolvimento durante a realização do exame de ultrassom no tempo 24h do desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2012 73

Figura 6 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P2 demonstrando a presença de ovo em desenvolvimento em fase inicial durante a realização do exame de ultrassom no tempo 24h do desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2012 80

Figura 7 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P8 no exame do dia 2 (A) e no dia 44 (B) demonstrando queda no tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012 91

Figura 8 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P9 demonstrando a presença de ovo em desenvolvimento durante a realização do exame no dia 23 (A) e no dia 65 (B) da primeira fase – São Paulo/SP – 2012 93

Figura 9 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P12 no dia 44 (A) e no dia 65 (B) demonstrando queda no tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012 95

Figura 10 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P14 no dia 4 (A) e no dia 67 (B) demonstrando o tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012 97

Figura 11 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P15 no dia 46 (A) e no dia 67 (B) demonstrando a presença dos maiores folículos observados nesta fase do estudo – São Paulo/SP – 2012 99

Figura 12 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P16 no dia 6 (A) e no dia 46 (B) demonstrando diminuição no tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012 101

Figura 13 – Imagem ultrassonográfica do ovário e oviduto da fêmea P2 no dia 84 da segunda fase – São Paulo/SP – 2012 111

Figura 14 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P16 no dia 132 e no dia 136 da segunda fase – São Paulo/SP – 2012 115

Figura 15 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P1 e foto do piquete mostrando postura de ovo malformado no dia 92 – São Paulo/SP – 2012 117

Figura 16 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P3 no dia 140 e do ovário no dia 141 – São Paulo/SP – 2012 120

Figura 17 – Imagem ultrassonográfica do ovário e oviduto da fêmea P4 no dia 133 da segunda fase – São Paulo/SP – 2012 123

Figura 18 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P15 no dia 141 e no dia 143 durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012 130

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P1 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 67

Gráfico 2 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P2 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 68

Gráfico 3 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P3 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 68

Gráfico 4 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P4 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 69

Gráfico 5 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P5 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 69

Gráfico 6 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P6 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 70

Gráfico 7 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P1 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 74

Gráfico 8 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P2 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 75

Gráfico 9 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P3 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 75

Gráfico 10 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P4 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 76

Gráfico 11 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P5 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 76

Gráfico 12 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P6 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 77

Gráfico 13 – Média das concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona do grupo de fêmeas (n = 6) submetidas ao desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012 78

Gráfico 14 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P1 – São Paulo/SP – 2012 83

Gráfico 15 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P2 – São Paulo/SP – 2012 84

Gráfico 16 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P3 – São Paulo/SP – 2012 86

Gráfico 17 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P4 – São Paulo/SP – 2012 88

Gráfico 18 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P8 – São Paulo/SP – 2012 90

Gráfico 19 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P9 – São Paulo/SP – 2012 92

Gráfico 20 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P12 – São Paulo/SP – 2012 94

Gráfico 21 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P14 – São Paulo/SP – 2012 96

Gráfico 22 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P15 – São Paulo/SP – 2012 98

Gráfico 23 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P16 – São Paulo/SP – 2012 100

Gráfico 24 – Temperatura média, precipitação pluviométrica e duração do dia (fotoperíodo) verificados para região do estudo no ano de 2011 – São Paulo/SP – 2012 102

Gráfico 25 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a primeira fase – São Paulo/SP – 2012 105

Gráfico 26 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a primeira fase – São Paulo/SP – 2012 106

Gráfico 27 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P2 – São Paulo/SP – 2012 109

Gráfico 28 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P12 – São Paulo/SP – 2012 112

Gráfico 29 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P16 – São Paulo/SP – 2012 114

Gráfico 30 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P1 – São Paulo/SP – 2012 116

Gráfico 31 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P3 – São Paulo/SP – 2012 119

Gráfico 32 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P4 – São Paulo/SP – 2012 122

Gráfico 33 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P9 – São Paulo/SP – 2012 125

Gráfico 34 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P14 – São Paulo/SP – 2012 126

Gráfico 35 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P15 – São Paulo/SP – 2012 129

Gráfico 36 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012 134

Gráfico 37 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012 134

Gráfico 38 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol em cada momento do tratamento com análogo de GnRH no grupo CONTROLE e no grupo TRATADO – São Paulo/SP – 2012 136

Gráfico 39 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de estradiol no grupo CONTROLE em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012 137

Gráfico 40 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de estradiol no grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012 137

Gráfico 41 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona em cada momento do tratamento com análogo de GnRH no grupo CONTROLE e no grupo TRATADO – São Paulo/SP – 2012 138

Gráfico 42 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de progesterona no grupo CONTROLE em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012 139

Gráfico 43 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de progesterona no grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012 139

Gráfico 44 – Média ± DP da concentração sérica de corticosterona em cada momento do tratamento com análogo de GnRH no grupo CONTROLE e no grupo TRATADO – São Paulo/SP – 2012 140

Gráfico 45 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de corticosterona no grupo CONTROLE em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012 141

Gráfico 46 – B*ox and Whiskers* da concentração sérica de progesterona no grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012 141

Gráfico 47 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol da primeira fase e dos grupos controle e tratado na segunda fase do estudo – São Paulo/SP – 2012 143

Gráfico 48 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona da primeira fase e dos grupos controle e tratado na segunda fase do estudo – São Paulo/SP – 2012 143

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Controles de qualidade dos ensaios de RIE de estradiol – São Paulo/SP – 2012 65

Quadro 2 – Controles de qualidade dos ensaios de RIE de progesterona – São Paulo/SP – 2012 66

Quadro 3 – Controles de qualidade dos ensaios de RIE de corticosterona – São Paulo/SP – 2012 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Datas de tratamento com análogo de GnRH (lecirelina) e fêmeas de avestruz selecionadas para serem controle e tratadas a cada semana durante a segunda fase do estudo - São Paulo/SP – 2012 59

Tabela 2 – Médias e desvio padrão das concentrações séricas de corticosterona, progesterona e estradiol de todas as fêmeas (n = 6) durante os tempos de coleta do desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2012 70

Tabela 3 – Resultados dos exames ultrassonográficos de ovário e o comportamento reprodutivo apresentado pelas fêmeas de avestruzes no desafio de ACTH no tempo 24h – São Paulo/SP – 2012 72

Tabela 4 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de corticosterona, progesterona e estradiol de todas as fêmeas (n = 6) durante os tempos de coleta do desafio de GnRH – São Paulo/SP – 2012 77

Tabela 5 – Resultados dos exames ultrassonográficos de ovário e o comportamento reprodutivo apresentado pelas fêmeas de avestruzes no desafio de GnRH no tempo 24h – São Paulo/SP – 2012 78

Tabela 6 – Dados de produção de ovos no *Sítio Aoyama* no período de julho de 2010 a junho de 2011 – São Paulo/SP – 2012 103

Tabela 7 – Dados de produção de ovos no *Sítio Aoyama* no período de julho de 2011 a dezembro de 2011 – São Paulo/SP – 2012 103

Tabela 8 – Dados de produção de ovos no *Sítio Aoyama* no período de janeiro de 2012 a abril de 2012 - São Paulo/SP – 2012 103

Tabela 9 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol e progesterona durante a primeira fase nas 3 categorias comportamentais estabelecidas – São Paulo/SP – 2012 105

Tabela 10 – Coeficientes de correlação (r) encontrados entre o comportamento reprodutivo (ASA+BICO+AC), as concentrações séricas de estradiol & progesterona e a medida do maior folículo ovariano observado no exame ultrassonográfico ovariano durante a primeira fase do estudo – São Paulo/SP – 2012 107

Tabela 11 – Datas e resultados dos tratamentos realizados com análogo de GnRH durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012 132

Tabela 12 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol e progesterona durante a segunda fase nas 3 categorias comportamentais estabelecidas – São Paulo/SP – 2012 133

Tabela 13 – Coeficientes de correlação (r) encontrados entre o comportamento reprodutivo (ASA+BICO+AC), as concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona e a medida do maior folículo ovariano observado no exame ultrassonográfico ovariano durante a segunda fase do estudo – São Paulo/SP – 2012 135

Tabela 14 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona dos grupos CONTROLE e TRATADO durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012 142

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 21
2 **OBJETIVOS** 23
3 **REVISÃO DE LITERATURA** 24
3.1 O AVESTRUZ (*Struthio camelus*) 24
3.2 A ESTRUTIOCULTURA 26
3.2.1 A estrutiocultura no mundo 26
3.2.2 A estrutiocultura no Brasil 28
3.3 A REPRODUÇÃO DO AVESTRUZ 29
3.4 ULTRASSONOGRAFIA EM AVES 33
3.5 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE AVES EM GERAL E NO AVESTRUZ 35
3.6 ESTIMULAÇÃO HORMONAL POR GnRH 39
3.6.1 Aplicação de GnRH para desenvolvimento folicular e estimulação ovariana em aves 40
3.6.2 Aplicação de GnRH para a indução da ovulação 41
4 **MATERIAL E MÉTODOS** 43
4.1 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA 43
4.1.1 **Animais** 43
4.1.2 **Aplicação dos desafios hormonais** 44
4.1.3 **Análise estatística** 44
4.2 PRIMEIRA FASE: DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HORMONAIS E REPRODUTIVAS 46
4.2.1 Animais 46
4.2.2 Coletas de sangue e obtenção do soro sanguíneo 47
4.2.3 Observação e avaliação do comportamento reprodutivo 48
4.2.4 Dosagens hormonais: estradiol e progesterona 51
4.2.5 Exame ultrassonográfico do ovário 52
4.2.6 Dados meteorológicos e índices de postura 54
4.2.7 Análise estatística 55
4.3 SEGUNDA FASE: APLICAÇÃO DE TRATAMENTO COM ANÁLOGO DE GNRH 58

4.3.1 Animais 58
4.3.2 Aplicação do tratamento com análogo de GnRH 59
4.3.3 Dosagem hormonal: corticosterona 60
4.3.4 Análise estatística 61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
5.1 CONTROLES DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS 65
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA 67
5.2.1 Desafio de ACTH 67
5.2.2 Desafio de GnRH 74
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PRIMEIRA FASE 82
5.3.1 Resultados individuais da primeira fase 82
5.3.2 Resultados consolidados da primeira fase 102
5.3.2.1 Dados meteorológicos e de produção 102
5.3.2.2 Resultados Comportamentais, Hormonais e Ultrassonográficos 104
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA SEGUNDA FASE 108
5.4.1 Resultados individuais da segunda fase 108
5.4.1.1 Grupo controle 108
5.4.1.2 Grupo tratado 115
5.4.2 Resultados consolidados da segunda fase 131
5.4.2.1 Resultados dos tratamentos 131
5.4.2.2 Resultados comportamentais, hormonais e ultrassonográficos 133
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 145
7 CONCLUSÕES 146
REFERÊNCIAS 147

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a criação de avestruzes – chamada de Estrutiocultura – vem ganhando força e popularidade em todo o mundo (CARBÓ, 2003). Um dos motivos principais para esse crescente interesse se baseia na qualidade e na potencialidade econômica dos produtos originários dos avestruzes (PINHEIRO; PINHEIRO; SILVEIRA, 2002; CARBÓ, 2003; CARRER, 2004), que são sua carne (vermelha), seu couro, suas plumas (o Brasil é o principal mercado consumidor) e seus ovos. Outra característica que faz com que essa espécie seja uma interessante opção para criação é sua capacidade de adaptação às mais diversas condições climáticas e a necessidade de pequenas áreas para o manejo e produção, constituindo-se assim, uma boa alternativa para pequenas e médias propriedades (PINHEIRO; PINHEIRO; SILVEIRA, 2002).

Segundo Carrer et al. (2004), o Brasil é tido entre a comunidade da estrutiocultura mundial, como um dos países de maior potencial de crescimento desta atividade, com grande vocação natural e empresarial. Suzan e Garneiro (2007) atribuem o potencial brasileiro na estrutiocultura a fatores como a disponibilidade de espaço físico, clima adequado, mão-de-obra barata e à tradição agropecuária.

Buscando-se sempre formas mais adequadas e eficientes de aumentar a produtividade, os fenômenos reprodutivos das aves industriais têm sido motivo de intensos estudos e pesquisas ao longo das décadas (PINHEIRO; PINHEIRO; PINHEIRO, 2004).

De início, a simples seleção de indivíduos com as características desejadas era a forma utilizada para se alcançar um incremento na produtividade. Com o avanço tecnológico e o aprimoramento dos conhecimentos sobre os fatores genéticos e endócrinos, estes passaram a ser utilizados na orientação de programas de seleção e melhoramento de plantéis das aves industriais (PINHEIRO; PINHEIRO; PINHEIRO, 2004).

Em criações de avestruzes a ocorrência de baixos índices reprodutivos é um problema visto no mundo todo. Embora fêmeas adultas de avestruzes sejam capazes de produzir de 30 a 60 ovos por ano na maioria das criações, apenas

algumas fêmeas estabelecem essa taxa de produção de ovos (BRONNEBERG; TAVERNE; PIJPERS, 1999; DEEMING, 1999).

O desconhecimento sobre vários aspectos da reprodução dos avestruzes, como os fatores que influenciam a produção de ovos, os mecanismos fisiológicos e endócrinos da atividade ovariana e fatores que influenciam o início, a duração e o término do ciclo da produção de ovos dos avestruzes leva a uma baixa eficiência reprodutiva e dificulta o desenvolvimento dessa criação.

Por esta razão, é muito importante que sejam estudadas e conhecidas as suas características endócrino-reprodutivas, as quais podem elevar o desempenho da espécie a partir do momento em que sua fisiologia reprodutiva esteja bem elucidada. Esses conhecimentos possibilitarão uma melhor avaliação do potencial reprodutivo dos animais e permitirá, também, a aplicação de técnicas de reprodução assistida como o manejo hormonal do ciclo reprodutivo e a inseminação artificial na criação de avestruzes.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Descrever as concentrações séricas de estradiol e progesterona em fêmeas adultas de avestruz (*Struthio camelus*) durante a época reprodutiva, buscando-se analisar os perfis destes hormônios entre as fêmeas;

- Correlacionar as concentrações séricas de estradiol e progesterona com o comportamento reprodutivo e o desenvolvimento ovariano verificado por ultrassom;

- Avaliar o efeito do tratamento com análogo de GnRH (lecirelina) na indução da ovulação e na postura dos ovos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, estão descritos diversos aspectos da revisão de literatura no que tange a biologia, a criação e a reprodução em avestruzes, aspectos sobre o exame ultrassonográfico em aves e no avestruz, a fisiologia reprodutiva das aves e a estimulação hormonal em aves.

3.1 O AVESTRUZ (*Struthio camelus*)

O avestruz pertence a ordem dos *Struthioniformes* (ratitas), e se dividem em três outras subordens: Os casuares (casuares e emus), emas e kiwis. Ratitas são aves incapazes de voar, principalmente devido à falta de uma quilha sobre o esterno ('*ratis'* em latim significa 'navio sem quilha') e a degeneração completa do músculo peitoral (BRONNENBERG, 2008).

Originário da África, o avestruz pertence à família *Struthionidae*, que é composta por um único gênero (*Struthio*), uma única espécie (*S. camelus)* e 4 sub-espécies (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994; CARRER; KORNFELD, 1999):

- *Struthio camelus camelus* (Norte da África) - São maiores e possuem plumagem com grande densidade, cabeça quase sem penugem e pescoço avermelhado. Seus ovos são maiores e mais lisos do que os da África do Sul;
- *Struthio camelus massaicus* (África Oriental) - Ligeiramente maior que o da África do Sul. Possuem pescoço rosado que se torna vermelho na época de reprodução. Concentram-se principalmente no Quênia e Tanzânia;
- *Struthio camelus molybdophanes* (Somália) - São menores que os da África do Sul. Possuem pescoço e pernas com coloração cinza-azulada e tem uma região nua e córnea na cabeça;
- *Struthio camelus australis* (África do Sul) - Possuem pescoço cinza-azulado e a cabeça possui penugem.

Anteriormente, havia também uma quinta sub-espécie, *Struthio camelus syriacus* (Península árabe), mas foi caçado até a extinção em 1941 (CRAMP et al., 1977).

A IUCN Red List of Threatened Species™, cita o estado de conservação do *Struthio camelus* como "segura" ou "pouco preocupante" (LC: Least Concern).

O avestruz é a maior ave viva do mundo. Machos adultos tem peso entre 120 a 150kg e medem 2,5 a 3,0m de altura. Fêmeas adultas são menores que os machos, medindo 2,0 a 2,5m de altura e são mais leves, pesando entre 90 a 120kg (BRONNENBERG, 2008). Os avestruzes possuem 2 dedos nos pés e suas pernas são fortes e potentes alcançando a velocidade de 70 km/h (DEEMING, 1999). Elas possuem também excelente visão e podem distinguir movimentos até uma distancia de 3,5km, isso se deve ao fato do grande tamanho e da posição anatômica do seu globo ocular e ao seu longo pescoço (BRONNENBERG, 2008)

Os avestruzes são onívoros, alimentando-se principalmente de vegetação, podem viver mais de 80 anos e quando adultos apresentam dimorfismo sexual, que segundo Carrer et al. (2004) começa a ser notado por volta dos 12-14 meses de idade. O macho apresenta plumagem preta e as asas e cauda com pontas brancas e a fêmea e os jovens apresentam plumagem marrom-acinzentada (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994).

Geralmente as fêmeas são dóceis, mas os machos podem se comportar agressivamente em épocas de reprodução. O chute é a sua grande arma, podendo alcançar facilmente o rosto de uma pessoa, o que faz com devam ser tomadas muitas precauções no manejo do mesmo (FOWLER, 1986).

No meio comercial, o avestruz é dividido em 3 raças: "African Black", "Red Neck" e "Blue Neck", todos originários de cruzamentos entre as subespécies (CARRER; KORNFELD, 1999). A *African Black* é a raça mais utilizada em criações comerciais por possuírem um comportamento mais dócil que facilita o manejo e apresentarem melhor desenvolvimento de plumas e rendimento de carcaça (DEEMING, 1999).

3.2 A ESTRUTIOCULTURA

A seguir estão compiladas informações sobre a criação de avestruzes e seus aspectos no mundo e no Brasil.

3.2.1 A estrutiocultura no mundo

A domesticação do avestruz (*Struthio camelus spp*.) começou na África do Sul no início dos anos 1860. Os avestruzes eram capturados da natureza e mantidos num sistema semiextensivo. A criação de avestruz nessa época era principalmente para atender a demanda de plumas para a indústria da moda. No início do século 20 a demanda por penas aumentou e a estrutiocultura cresceu e em 1913, o plantel na África do Sul chegou a quase um milhão de aves (SMIT, 1963).

Entretanto no começo da Primeira Guerra Mundial a demanda por plumas declinou tremendamente, colocando em risco as criações de avestruz. Em 1945, uma cooperativa (Klein Karoo Landbouwkoöperasie - KKLK) foi fundada para regulamentar a venda de plumas (DRENOWATZ et al., 1995), e durante a década de 50, houve um desenvolvimento do mercado de couro do avestruz para ser utilizado em artigos de luxo. Em 1963, um abatedouro da KKLK foi inaugurado para a produção de carne seca (SMIT, 1963; DRENOWATZ et al., 1995).

Nas últimas décadas, a indústria do avestruz tem visto um renascimento, principalmente devido as mudanças nos objetivos da produção: o couro atrativo, a carne vermelha saudável (alto teor de proteína, baixos teor de colesterol e gordura). Embora a alta qualidade das plumas ainda seja fundamental para a indústria da moda e para a produção de espanadores, a demanda por carne e couro fez com que a criação de avestruz se expandisse ao redor do mundo (BRONNENBERG, 2008).

Embora a concentração de criação de avestruzes seja encontrada principalmente na África do Sul, a criação de avestruzes foi bem estabelecida em Israel, Austrália, Sudeste Asiático, América do Norte, América do Sul e mesmo em alguns países da Europa. Em países como o Reino Unido, Bélgica, Franca, Espanha, Portugal, Itália, Grécia, e alguns países escandinavos e da Europa

Oriental, a criação de avestruzes cresceu rapidamente na última década do século 20, aumentando muito o número de aves e de produtores, e como resultado desse crescimento os preços declinaram e o mercado ficou saturado (BRONNENBERG, 2008).

Recentemente, alguns países da União Europeia, no intuito de criar um mercado sustentável para o couro e a carne de avestruz, tem tentado estabelecer cooperativas de criações de avestruzes e criar instalações para o abate especializado. Hoje em dia, poucas criações relativamente "bem administradas" conseguem sobreviver na Europa, principalmente devido à concorrência com o mercado africano de alta qualidade e de baixos custos (BRONNENBERG, 2008).

Métodos de manejo em criações de avestruz variam ao redor do mundo e podem ser criações extensivas ou semiextensivas. Em alguns casos, observa-se até criações intensivas. Sistemas de alojamento, tamanhos de rebanho e densidade dos animais variam bastante entre as fazendas comerciais (BRONNENBERG, 2008).

Os avestruzes são conhecidos por serem reprodutores polígamos (JARVIS; JARVIS; KEFFEN, 1985; BERTRAM, 1992; SAUER; SAUER, 1996). Em fazendas de criação, é comum manter a proporção de 1 macho para 2 ou 3 fêmeas em cada piquete, mas alguns criadores preferem manter piquetes com colônias de reprodução (machos e fêmeas numa mesma proporção) e outros criadores preferem manter os animais em pares (um macho e uma fêmea) para uma correta determinação genética dos filhotes (BRONNENBERG, 2008).

Durante a estação reprodutiva os piquetes devem ser inspecionados todos os dias e os ovos devem ser coletados assim que encontrados no piquete. A maioria dos ovos é incubada artificialmente, pois os índices de produtividade, tais como, produção de ovos (produção de ovos/fêmea/ano) e fertilidade dos ovos (porcentagem de filhotes/número de ovos incubados) é geralmente mais altas quando comparado aos índices reprodutivos em incubações naturais (BERTRAM, 1992).

Avestruzes criados para produção de carne podem ser abatidos com 10 a 12 meses de idade e para produção de couro de alta qualidade a idade de 14 meses é a mais indicada (SALES, 1999).

3.2.2 A estrutiocultura no Brasil

A Portaria nº 36 do Ministério do Meio Ambiente através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de 15 de março de 2002, incluiu o avestruz (*Struthio camelus*) na listagem de fauna considerada doméstica. Atualmente os criadouros comerciais desta espécie necessitam de registro da sua unidade produtiva junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) seguindo normas específicas definidas na Instrução Normativa Conjunta nº 2, de 21 de fevereiro de 2003.

A estrutiocultura brasileira iniciou-se em 1995 com a importação dos primeiros reprodutores e, em 2001, o setor estrutiocultor brasileiro movimentou de 2 a 3 milhões de dólares, por força de um plantel de aproximadamente 50 mil aves (PINHEIRO; PINHEIRO; SILVEIRA, 2002). Nos anos seguintes, o plantel brasileiro cresceu rapidamente, partindo de 120 mil aves em 2003, para 175 mil em 2004 (CARRER et al., 2004), 335 mil em 2005 (MUNIZ, 2005) e para 430 mil aves em 2007 – que consolidava o Brasil com o segundo maior rebanho de avestruzes do mundo na época, atrás somente da África do Sul (MUNIZ, 2005; SUZAN; GARNEIRO, 2007). Ao longo dos últimos anos, com o aumento da desconfiança no agronegócio do avestruz, o rebanho brasileiro vem diminuindo rapidamente e estima-se que o plantel brasileiro tenha se reduzido a 80 mil aves em 2010 (BRUSTOLIN, 2011).

No surgimento da estrutiocultura no Brasil, a cadeia produtiva do avestruz apresentava um grande potencial de crescimento dentro do país, uma vez que o Brasil possui ampla disponibilidade de espaço físico, clima adequado, mão de obra barata e grande tradição agropecuária (SUZAN; GARNEIRO, 2007). Este potencial, apesar dos esforços das Associações e cooperativas, até agora não se tornou realidade, já que diversos gargalos ainda comprometem a consolidação da cadeia produtiva do avestruz no país (BARBOSA et al., 2007).

As dificuldades iniciam-se já nas propriedades rurais, que não recebem apoio técnico adequado, o que resulta em uma baixa produtividade e em altos custos de produção. Fora das propriedades, nos outros elos da cadeia produtiva, a situação

ainda é pior. É difícil encontrar abatedouros e curtumes aptos a trabalhar com avestruzes e a falta de uma regulamentação federal, impede que os produtos brasileiros cheguem ao principal mercado consumidor do avestruz: a União Europeia (EU). Para exportação é necessária a inserção do avestruz no PNCR - Programa Nacional de Controle de Resíduos - do MAPA, uma vez que este programa é uma obrigatoriedade para a exportação de produtos e gêneros alimentícios imposto pela UE (SUZAN; GARNEIRO, 2007). Apesar da cobrança das Associações e setores ligados à estrutiocultura ao longo dos últimos anos (2005 / 2006), até o momento a sua inserção ainda não foi realizada.

Para que o agronegócio do avestruz se torne uma atividade rentável, a visão sistêmica da cadeia produtiva é fundamental. É necessário o estabelecimento de regras e normas governamentais, investimentos em tecnologia e conhecimento, treinamento e qualificação profissional para reduzir os elevados custos de produção, etc. Além disso, deve-se trabalhar, também, o mercado consumidor através de campanhas de marketing que, no médio e longo prazo, consolidem a cultura de consumo dos produtos do avestruz e que confira a estes produtos um status comercial diferenciado, fortalecendo assim a estrutiocultura (BARBOSA et al., 2007).

3.3 A REPRODUÇÃO DO AVESTRUZ

Segundo Carrer et al. (2004) as idades de maturação sexual dos animais criados racionalmente são, em média, de 30-36 meses para os machos e 20-24 meses para as fêmeas. Tem-se conhecimento de fêmeas que iniciaram a postura aos 16-18 meses bem como outras que somente iniciaram-na aos 40 meses de idade.

Os avestruzes mantêm acentuada vinculação às condições ambientais silvestres da sua origem, portanto o ambiente tem grande influência na determinação de aspectos ligados ao desempenho produtivo, sobretudo na reprodução, criação de filhotes e animais jovens. Além da necessidade de condições nutricionais e de sanidade serem adequadas para a reprodução, fatores como

fotoperíodo, clima (índices de pluviosidade e temperatura) e estresse são importantes para um adequado manejo reprodutivo dessas aves (CARRER et al., 2004).

Devido às diversas características climáticas encontradas no Brasil, o período reprodutivo dos avestruzes no país varia de uma região a outra, dependendo das chuvas. Em áreas úmidas como a Região Centro-sul do país, a reprodução é concentrada na estação seca, entre junho e outubro. Já em zonas de semiárido ou de sertão, como no Nordeste brasileiro, a reprodução ocorre no final do ano (setembro a março), normalmente relacionada à época mais seca do ano (CARRER et al., 2004).

As avestruzes podem ser consideradas como reprodutores oportunistas, ou seja, os animais podem entrar em reprodução quando as condições ambientais se apresentam favoráveis (BRONNENBERG, 2008). Em Israel, os verões são quentes, longos e secos e os invernos geralmente amenos, fazendo com que as avestruzes possam produzir ovos o ano inteiro (DEGEN et al., 1994). Em áreas áridas da Namíbia, as avestruzes também são reprodutoras oportunistas, iniciando a produção dos ovos logo após o período das chuvas, quando a disponibilidade de alimento (pasto) aumenta. Embora a precipitação possa estimular a atividade reprodutiva e postura de ovos em curto prazo, a atividade reprodutiva é usualmente mais intensa antes da estação de chuvas, que na Namíbia se estende de agosto a novembro (SAUER; SAUER, 1966). Na África Oriental e Meridional a produção de ovos de avestruzes ocorre principalmente de julho a janeiro (JARVIS; JARVIS; KEFFEN, 1985). No Zimbábue, por exemplo, avestruzes selvagens são observados em reprodução de julho a janeiro, enquanto que na África do Sul, avestruzes domesticados (Black Neck) mantém a produção de ovos até pelo menos o final de fevereiro (JARVIS; JARVIS; KEFFEN, 1985). Nos Estados Unidos, a época reprodutiva varia de norte ao sul do país. No norte, as avestruzes podem apresentar sazonalidade e produzir ovos de maio a setembro e no sul, as aves podem produzir durante o ano todo como reprodutores oportunistas (HICKS, 1992).

De acordo com alguns pesquisadores (HICKS, 1992; DEGEN et al., 1994), as avestruzes são aves que se reproduzem em dias longos, ou seja, fotoperíodo dependentes. Degen et al. (1994) por exemplo, mostrou que a produção de ovos aumenta na primavera, quando os dias começam a ficar mais longos. A produção atinge o ápice durante os maiores períodos de luminosidade e a produção termina

quando os dias se tornam relativamente curtos. Jarvis, Jarvis e Keffen (1985) observaram que avestruzes selvagens no Zimbábue, produzem ovos independente da época de chuvas, sendo o fotoperíodo o principal fator regulador para a época reprodutiva. Sauer (1972), entretanto, afirma que o início da época reprodutiva coincide com os períodos de chuvas e da subsequente disponibilidade de alimento. Degen et al. (1994) considera que a disponibilidade de alimentos por longos períodos e não, necessariamente, o período de chuvas, por si só, é o principal fator que desencadeia a atividade reprodutiva em avestruzes.

Segundo Bronneberg (2008), o grau de influência dos fatores que afetam a reprodução em avestruzes (fotoperíodo, precipitação e disponibilidade de alimento, por exemplo) não pode ser satisfatoriamente mensurado com as informações disponíveis atualmente. Sendo assim, mais estudos são necessários para avaliar melhor os fatores que afetam a época reprodutiva em avestruzes, juntamente com estudos de monitoramento das alterações funcionais dos órgãos reprodutivos dessas aves.

O macho e a fêmea costumam acasalar-se duas ou três vezes por dia, sendo que a fêmea põe um ovo a cada 48 horas, até completar 15 a 20 ovos, cujo peso médio ideal, varia de 1100 a 1700 g (BRONNENBERG, 2008; PINHEIRO; PINHEIRO; PINHEIRO, 2004). Após uma pequena pausa, o ciclo de postura recomeça. Em média, num ano são colocados de 40 a 60 ovos (normalmente 2 a 3 ciclos de postura por ano) e, dependendo das condições podem ser postos até 100 ovos.

Jarvis, Jarvis e Keffen (1985) observaram que o número de ninhos em que os ovos eram depositados pelas avestruzes selvagens no Zimbábue (*S.c. australis*) variam consideravelmente durante uma estação reprodutiva, e que o intervalo entre as sequências de postura ocorrem aproximadamente em 6 semanas, mas o motivo pelo qual isso acontece não está esclarecido. As avestruzes selvagens do Zimbábue produzem uma média de 12 a 13 ovos por ninho, depositado por cerca de 3 fêmeas. Baseado na identificação das características dos ovos de cada fêmea foi verificado que uma fêmea normalmente contribui com a oviposição de 7 a 8 ovos em cada ninho, ou seja, produz 7 a 8 ovos numa sequência de oviposição (JARVIS; JARVIS; KEFFEN, 1985).

No Quênia e norte da Tanzânia, o número de ovos depositados num único ninho de avestruzes selvagens varia de 20 a 36 ovos, depositados por 4 a 5 fêmeas

(BERTRAM, 1979). Segundo Hurxthal (1979), em outro estudo nesta mesma região, foi verificada uma média de 35,5 e 47 ovos por ninho.

Jarvis, Jarvis e Keffen (1985) observaram que avestruzes criadas em cativeiro na África do Sul apresentaram sequências de postura que duram de 5 a 7 semanas, com intervalos entre os picos de postura de aproximadamente 6 semanas.

Índices de produtividade em avestruzes, como fertilidade dos ovos produzidos e taxa de eclosão, foram mensurados e descritos em diversos estudos por diversos autores ao redor do mundo (DEEMING, 1996; MORE, 1996; VAN SCHALKWYK; CLOETE; de KOCK, 1996; CLOETE; VAN SCHALKWYK; BRAND, 1998; IPEK; SAHAN, 2004). Estes estudos demonstram que o índice de fertilidade dos ovos de avestruzes é baixo e muito variável (<50% a até 85%), em contraponto aos índices de fertilidade encontrados nas aves de produção (> 85% de ovos férteis).

Segundo Carrer et al. (2004) são vários os sinais que indicam o início da estimulação reprodutiva nos animais jovens. Entre os machos pode-se destacar sinais como a dança do acasalamento (*kantling*), o canto, o andar pendular e a cauda erguida como indicativos de comportamento sexual e reprodutivo. Nas fêmeas se observa um único comportamento reprodutivo, conhecido como *display*: as fêmeas soltam as asas paralelas ao corpo, movimentando-as com pequenas chacoalhadas, levantando e abaixando a cabeça e abrindo e fechando o bico (CARRER et al., 2004). Em comunicação pessoal desse mesmo autor (Prof. Dr. Celso da Costa Carrer, ZAB – FZEA/USP), ele ainda relata que o desenvolvimento do *display* nas fêmeas jovens ocorre de maneira progressiva, sendo facilmente visualizadas etapas da evolução deste comportamento reprodutivo. Inicialmente a fêmea começa a abaixar as asas paralelamente ao corpo e depois ela começa também a levantar e abaixar a cabeça batendo o bico e, finalmente, assume a posição de aceitação da cópula (agachada).

Bubier et al. (1998) relatam que os avestruzes adultos criados em fazendas comerciais apresentam comportamento reprodutivo (corte) frente a humanos, e que esta apresentação do comportamento reprodutivo é mais intensa quando os animais são observados a uma curta distância, ou seja, com os observadores próximos dos animais avaliados.

3.4 ULTRASSONOGRAFIA EM AVES

A ultrassonografia em animais de produção tem provado ser uma ferramenta muito útil para os veterinários e pesquisadores em biologia reprodutiva e ciência animal (TAVERNE; WILLEMSE, 1989). Desde a sua introdução para o diagnóstico de prenhez em equinos (PALMER; DRIANCOURT, 1980) e em gatos (MAIHAC et al., 1980), muitas aplicações para diferentes propósitos reprodutivos tem sido desenvolvidas, não apenas em animais domésticos, mas também aplicados em zoológicos e em espécies selvagens (KÄHN, 1992; HILDEBRANDT; GÖRITZ, 1995) incluindo algumas espécies de aves (CARTEE et al., 1992).

McMillan (1994) relata que estudos ultrassonográficos em aves de companhia podem ser limitados pelo tamanho dos pacientes e pela presença de sacos aéreos. Entretanto, em aves de maior porte o ultrassom pode ser utilizado para caracterizar algumas alterações como a organomegalia. McMillan (1994) ainda relata que a visualização dos órgãos na cavidade celomática é difícil devido a presença dos sacos aéreos. Entretanto o ultrassom pode ser utilizado para observar folículos ovarianos em época de reprodução e pode ser útil em diagnóstico de ovos malformados e peritonites relacionadas a ruptura de ovos.

Hildebrandt et al. (1995) realizaram um estudo em que o exame ultrassonográfico foi utilizado para detecção de estruturas ovarianas em 33 aves de rapina em 7 diferentes espécies. O oviduto e o ovário foram visualizados em animais não anestesiados através da inserção da probe através da cloaca. Os autores afirmam que o ultrassom é uma ferramenta precisa, não traumática e pouco invasiva para a sexagem em espécies de rapinantes que não apresentem dimorfismo sexual.

Jensen e Durrant (2006) em estudo sobre a fisiologia reprodutiva em kiwi (*Apteryx mantelli*) utilizaram exames ultrassonográficos para avaliar o desenvolvimento do folículo recrutado para ovular. Através do acompanhamento da medida deste folículo por exame de ultrassonografia (10 a 76mm) foi possível elaborar a curva de crescimento folicular, o que possibilitou estimar a data prevista para ovulação e o dia da oviposição. Os autores comprovaram também, através da análise de metabólitos de esteróides fecais e do exame ultrassonográfico, a correlação entre as concentrações de estradiol e progesterona e o crescimento folicular ovariano.

O uso do ultrassom em avestruzes (*S. camelus spp.*) ainda não foi extensamente explorado (BRONNENBERG, 2008). Williams (1998) relata que, no que diz respeito ao exame do trato reprodutivo, folículos ovarianos podem ser visualizados na cavidade celomática e Wagner e Kirberger (2001) concluem que a presença de plumas e de sacos aéreos não limitam o uso da ultrassonografia transcutânea para a visualização de vísceras celomáticas no avestruz. Eles descrevem também as áreas a serem utilizadas para o exame ultrassonográfico em avestruzes e os órgãos que podem ser visualizados em cada área e ainda concluem que o exame ultrassonográfico é um exame simples, rápido, não invasivo e de fácil realização em avestruzes.

Bronneberg e Taverne (2003) demonstraram que a avaliação ultrassonográfica transcutânea é uma técnica não invasiva de fácil aplicação para monitorar a atividade ou inatividade ovariana em avestruzes. A técnica permite a visualização das estruturas ovarianas (folículos de diversos tamanhos, atrésicos e pós-ovulatórios) e acompanhar o desenvolvimento do ovo dentro do trato reprodutivo. Neste estudo os autores também verificaram que a avaliação ultrassonográfica *in vivo* foi capaz de identificar 58% dos folículos ovarianos presentes no ovário ao se comparar o número de folículos observados no exame ultrassonográfico com o número de folículos observados no ovário coletado *post mortem.*

Bronneberg utilizou a análise ultrassonográfica em avestruzes em mais 3 estudos (2007a, b, 2009). No primeiro, Bronneberg et al. (2007a) buscaram descrever e analisar as mudanças no número de folículos ovarianos grandes (6,1 a 9,0cm) e nas concentrações plasmáticas do hormônio luteinizante (LH) e do estradiol (E2) em relação aos índices de produção de ovos em fêmeas adultas de avestruzes, no segundo para acompanhar o ciclo da postura de 1 ovo em avestruz. No segundo, Bronneberg et al. (2007b) estudaram o ciclo de postura de um ovo em fêmeas adultas de avestruz, investigando a relação temporal entre a ovulação, a formação do ovo, a oviposição e as alterações nas concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e LH. No terceiro estudo, Bronneberg et al. (2009) buscou avaliar a dinâmica folicular apresentada durante um ciclo de postura de um ovo, através da mensuração das variações de volume dos folículos ovarianos > 30mm e as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona apresentadas.

Com relação à avaliação ultrassonográfica ovariana, Bronneberg et al. (2007b) descrevem que o folículo ovulado é detectado pela primeira vez 2 horas após uma oviposição e a que ovulação ocorreu sempre brevemente após uma oviposição em fêmeas em que o intervalo entre as posturas foi de 48 horas. Também puderam observar através do exame ultrassonográfico, que o ovo em desenvolvimento permanecia por 9 horas na porção proximal (infundíbulo, magno ou istmo) e por 39 horas na porção distal (glândula da casca) do oviduto.

3.5 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE AVES EM GERAL E NO AVESTRUZ

Segundo Deeming (1999), enquanto vários estudos do sistema reprodutivo das aves domésticas vêm sendo realizados e publicados na literatura, muito poucas informações são disponíveis sobre o sistema reprodutivo dos avestruzes. Questões básicas permanecem sem resposta e fazem com que certas áreas de pesquisa permaneçam sem evolução por carecerem dessas informações, particularmente no que diz respeito às características reprodutivas das fêmeas. O mesmo autor ainda relata que, a minoria das pesquisas relacionadas à reprodução dos avestruzes foi direcionada ao trato reprodutivo feminino e numerosos livros e artigos simplesmente reportam que, anatomicamente e fisiologicamente, o trato reprodutivo feminino dos avestruzes é semelhante ao padrão geral aviário.

A fisiologia reprodutiva dos avestruzes, assim como a de outras espécies animais, é um processo complexo, regulado, principalmente, por hormônios produzidos por glândulas endócrinas, os quais interagem entre si através de um sistema de *feedback* (CARRER et al., 2004). Estes hormônios são responsáveis pela regulação do comportamento sexual, pelas características sexuais secundárias e pela gametogênese (CARRER et al., 2004)

O hormônio responsável pelo controle da reprodução é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado pelo hipotálamo (DEEMING, 1999). Em mamíferos há apenas um tipo de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) enquanto que nas aves são encontrados dois tipos desse hormônio: GnRH-I e GnRH-II, que são semelhantes ao hormônio mamífero variando apenas em algumas substituições de aminoácidos na sua estrutura (DEEMING, 1999). Ambos hormônios

aviários já foram encontrados em avestruzes (DEEMING, 1999). Acredita-se que o GnRH-I tenha uma participação maior no controle endócrino da reprodução das aves (ETCHES, 1996; DEEMING, 1999).

As gonadotrofinas aviárias, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), possuem similaridades físicas e químicas com as gonadotrofinas mamíferas, mas nem todas as funções atribuídas a esses hormônios mamíferos podem ser atribuídas também aos seus homólogos aviários (ETCHES, 1996). Como exemplo disto, pode-se observar que a principal função “estimulatória” não é atualmente atribuída ao hormônio folículo estimulante (FSH) e nenhum dos tecidos ovarianos nas aves sofrem luteinização (ETCHES, 1996). Por não haver uma nomenclatura mais racional para as gonadotrofinas aviárias os termos FSH e LH continuam a ser utilizados pela semelhança estrutural encontrada com as gonadotrofinas mamíferas (ETCHES, 1996).

O LH e o FSH juntos estimulam o crescimento e a maturação das gônadas, os testículos nos machos e o ovário esquerdo nas fêmeas (DEEMING, 1999). De forma geral, acredita-se, também, que os dois hormônios (FSH e LH) regulam o crescimento folicular e mantêm a hierarquia dos folículos maduros (ETCHES, 1996).

A função do FSH nas aves ainda não está claramente elucidada (ETCHES, 1996), mas Deeming (1999) afirma que o FSH, especificamente, estimula o amadurecimento dos folículos no ovário das fêmeas e nos machos é responsável pelo desenvolvimento das células de Sertoli nos testículos.

O hormônio luteinizante (LH) é tido como o mais ativo estimulador da esteroidogênese nas aves (ETCHES, 1996), sendo que, nos machos, o LH estimula a produção de andrógenos pelas células de Leydig dos testículos e nas fêmeas estimula a produção de progesterona, andrógenos e estrógenos pelas células da teca e da granulosa nos ovários (ETCHES,1996; DEEMING, 1999). O LH também é reconhecido como o responsável pela ovulação nas aves domésticas (ETCHES, 1996). Nas fêmeas jovens de galinhas domésticas, o pico de concentração de LH é observado de 3 a 5 semanas antes da postura do primeiro ovo, enquanto que nos machos a concentração máxima de LH é encontrada somente após o alcance da maturidade sexual (ETCHES, 1996). Degen et al. (1994) num estudo buscando-se avaliar os níveis séricos do hormônio luteinizante (LH) e dos hormônios esteróides (testosterona e estradiol) em machos e fêmeas adultos de avestruz descreveram que, nos avestruzes, os níveis séricos de LH são aproximadamente três vezes

maiores nos machos do que nas fêmeas, sendo que a variação sazonal nos dois sexos segue o mesmo padrão, apesar da diferença de concentração encontrada. Os mesmos autores demonstraram, também, que os níveis de LH elevam-se antes do início da postura dos primeiros ovos, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Os hormônios esteroides produzidos pelas gônadas - dos quais os mais importantes são o estradiol e a progesterona nas fêmeas e a testosterona nos machos - possuem uma variedade de efeitos que incluem a diferenciação sexual, o desenvolvimento das características sexuais secundárias, funções no comportamento, metabolismo, produção de gametas, muda de penas e inibição da secreção de LH por *feedback* (DEEMING, 1999). Além dessas funções, o estradiol estimula o fígado a produzir vitelogenina, que alcança a corrente sanguínea e posteriormente irá se depositar nos folículos ovarianos formando a gema e atua na mobilização do cálcio para formação da casca do ovo (DEEMING, 1999). A progesterona atua na secreção do albúmen e é responsável pela indução do pico de LH para ocorrer a ovulação (BAHR; JOHNSON, 1991). Ao contrário de mamíferos, as células da granulosa são a principal fonte de progesterona e de pequenas quantidades de androgênios, enquanto que as células da teca produzem androgênios e estradiol. É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, porque não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, uma estrutura associada a prenhez nos mamíferos (BAHR; JOHNSON, 1991).

Nas fêmeas jovens de galinhas domésticas, a concentração plasmática dos estrógenos aumenta por volta de 3 a 5 semanas antes da postura do primeiro ovo e ocorrem picos posteriormente ao pico de LH (ETCHES, 1996). A concentração de progesterona dessas aves permanece em níveis basais até uma semana antes do início da postura, quando a sua produção é rapidamente acelerada para os níveis que são característicos das galinhas poedeiras (ETCHES, 1996).

Segundo Degen et al. (1994), nas fêmeas adultas de avestruzes, os níveis plasmáticos de estradiol apresentam elevação a partir do início do período de postura e tem o pico de sua concentração juntamente com a época de maior produção de ovos, permanecendo a concentração elevada durante toda a fase de postura. Nos machos, os níveis plasmáticos de testosterona mostram um aumento antes do pico de produção de ovos, consecutivo ao aumento dos níveis plasmáticos de LH (DEGEN et al., 1994).

Bronneberg et al. (2007a) buscaram descrever e analisar as mudanças no número de folículos ovarianos grandes (6,1 a 9,0cm) e nos níveis plasmáticos do hormônio luteinizante (LH) e do estradiol (E2) em relação aos índices de produção de ovos em fêmeas adultas de avestruzes, dentro e fora da estação reprodutiva. Para tal, os autores realizaram exames ultrassonográficos do ovário e coletas de sangue mensais em 9 fêmeas adultas de avestruz com idade entre 11 e 14 anos. Através deste estudo, puderam observar que: (1) a presença de folículos ovarianos grandes e níveis plasmáticos elevados de LH eram observados 1 mês antes da primeira oviposição e do estabelecimento da estação reprodutiva; (2) A concentração plasmática de estradiol eleva-se com o início da temporada de produção de ovos; (3) o número de folículos ovarianos grandes e as concentrações plasmáticas de LH e E2 permaneciam elevados durante toda a temporada de produção de ovos; e (4) o número de folículos ovarianos grandes e as concentrações plasmáticas de LH e estradiol decrescem simultaneamente à última postura de ovo da época reprodutiva. Através dos dados deste estudo, Bronneberg et al. (2007a) concluíram que as mudanças no número de folículos ovarianos grandes e nos níveis plasmáticos de LH e estradiol ocorrem em sincronia com a produção de ovos e que este fato fornece evidências de que as mudanças morfológicas e endocrinológicas observadas durante a reprodução dos avestruzes são similares às mudanças que ocorrem em outras espécies sazonais de aves.

Em um segundo artigo, Bronneberg et al. (2007b) estudaram o ciclo de postura de um ovo em fêmeas adultas de avestruz, investigando a relação temporal entre a ovulação, a formação do ovo, a oviposição e as alterações nos níveis plasmáticos de progesterona, estradiol e LH. Para tal, foram estudadas 10 fêmeas adultas de avestruz em época reprodutiva e que sabidamente estavam em postura. Nestas fêmeas, foram realizados exames ultrassonográficos transcutâneos a cada 3 horas e foram colhidas amostras de sangue para dosagem hormonal a cada 1 hora durante um período de pelo menos 48 horas, que é o tempo normal do intervalo entre posturas. Com relação aos níveis hormonais encontrados, os autores relatam que a concentração plasmática de progesterona (P4) nas fêmeas em que ocorreu a ovulação (n=8), apresentam níveis consistentes e bem caracterizados: de níveis basais, por volta de 0,1ng/ml em média, os níveis de P4 começam a elevar-se 12 horas antes da oviposição, alcançam um pico médio de 3,5ng/ml no momento 3 horas antes da oviposição (5h antes da ovulação) e retornam a níveis basais 3 horas

e 30 minutos após a postura do ovo. Com relação às mudanças nos níveis do LH e do estradiol em fêmeas que ovularam, os autores relatam que seus níveis também descrevem um padrão de ascensão e queda em relação ao tempo de ocorrência da oviposição e da ovulação. Entretanto, relatam que há uma maior variação no nível basal destes hormônios entre os indivíduos e os picos são menos visíveis do que os apresentados pela progesterona. Nas fêmeas que não ovularam (n=2) durante o estudo, não foram observadas elevações e picos nos níveis de progesterona, LH ou estradiol. Os autores concluíram que durante o ciclo de postura de um ovo em avestruzes, os eventos reprodutivos (como a ovulação, o desenvolvimento do ovo no oviduto e a oviposição) e as mudanças nas concentrações hormonais (LH, P4 e E2), ocorrem e se desenvolvem em períodos bem demarcados de tempo durante o ciclo de postura de um ovo no avestruz.

3.6 ESTIMULAÇÃO HORMONAL POR GnRH

Tratamentos com hormônios gonadotróficos exógenos têm sido utilizados para melhorar os índices reprodutivos de numerosas espécies de mamíferos domésticos.

Em aves, poucos experimentos utilizando hormônios exógenos têm sido realizados especificamente para estimular o desenvolvimento ovariano e melhorar a reprodução (BENNETT, 2002). A maioria dos trabalhos existentes em aves busca apenas o entendimento da fisiologia reprodutiva ovariana e nos mecanismos que controlam a hierarquia folicular (BENNETT, 2002).

A aplicação de GnRH exógeno foi realizada em vários estudos com aves para investigar somente os efeitos do GnRH na produção de LH e FSH, com relativamente poucos estudos baseados nos efeitos desse hormônio na estimulação ovariana (BENNETT, 2002). Dentre estes estudos é possível afirmar que uma única aplicação de 5 - 20µg de cGnRH sintético é capaz de aumentar significativamente os níveis de LH em galinhas (WILSON et al., 1989), perus (BURKE; COGGER, 1977) e codornas (HATTORI; ISHII; WADA 1986). Entretanto, a resposta é variável entre as espécies e dependente dos estágios reprodutivos (BENNETT, 2002). O uso de análogos de GnRH sintéticos, com trocas na sequência de aminoácidos, provoca um

aumento maior na liberação endógena de LH e que se mantém por mais tempo (STERLING; SHARP, 1984).

3.6.1 Aplicação de GnRH para desenvolvimento folicular e estimulação ovariana em aves

Johnson e Van Tienhoven (1981) trataram galinhas poedeiras com GnRH-I sintético e mostraram que a progesterona e o LH aumentaram suas concentrações para níveis pré-ovulatórios em resposta a uma única aplicação de GnRH.

Poucos artigos científicos são encontrados relatando tentativas de se estimular o desenvolvimento ovariano em aves com GnRH exógeno, sendo que a maioria não foi bem sucedida (BENNETT, 2002). Reeves, Harrison e Casey (1973), por exemplo, não encontraram diferença no peso ovariano ou no desenvolvimento folicular entre aves tratadas com uma aplicação diária GnRH mamífero e aves controle após duas semanas de tratamento. Burke e Cogger (1977), não observaram aumento no peso do ovário ou oviduto ou da glândula pituitária de fêmeas de perus que não estavam em postura após tratamento com 10 - 30µg/BID de cGnRH-I por 6 dias. Sterling e Sharp (1984) trataram, diariamente, galinhas poedeiras durante 12 dias com uma dosagem de 1 - 100µg com GnRH suíno ou com análogo de GnRH (buserelina) e observaram que não houve mudança no peso ou morfologia do ovário ou oviduto.

A liberação endógena do GnRH é conhecida por ser pulsátil, com cada pulso durando 15 a 60 minutos num intervalo de 1 a 3h (SHARP; GOW, 1983). Essa característica faz com que seja muito difícil mimetizar artificialmente o padrão pulsátil de liberação do GnRH que ocorre em aves. A resposta do LH a uma administração única de GnRH mamífero, cGnRH ou análogo de GnRH é imediata e tem uma curta duração, incapaz de induzir estágios iniciais de desenvolvimento ovariano em aves (BENNETT, 2002). Análogos de longa duração (SHARP et al., 1986) e implantes de liberação lenta (BURKE; COGGER, 1977) tem sido utilizados na intenção de contornar esse problema. Nestes dois estudos, o LH retornou ao nível basal após alguns dias de tratamento, o que pode indicar uma perda da sensibilidade da glândula pituitária devido ao uso prolongado do GnRH exógeno.

Já em um estudo com periquitos australianos, Costantini et al. (2009), utilizando um análogo de GnRH (buserelina) em uma base bioabsorvível de silicone para liberação lenta, comparou a taxa de postura de ovos e a concentração de metabólitos de esteroides nos excretas entre um grupo tratado com o implante de GnRH de liberação lenta (mantidos em fotoperíodo longo), com 2 grupos controle (fotoperíodo longo e curto) e observou que a postura de ovos se iniciou precocemente e em maiores taxas no grupo tratado, e este também apresentou maiores concentrações de metabolitos de esteroides nas excretas.

Robbe et al. (2008) conseguiu antecipar o início da atividade reprodutiva e a postura em canários utilizando um análogo de GnRH (lecirelina) aplicado em juntamente com uma base cremosa para liberação lenta.

Estes achados demonstram que implantes de GnRH de liberação lenta podem ser eficazes na indução do desenvolvimento ovariano em aves.

3.6.2 Aplicação de GnRH para a indução da ovulação

Idealmente em aves, uma bem sucedida estimulação ovariana deve terminar na ovulação do folículo F1. Com o avanço do conhecimento para se estimular o desenvolvimento ovariano e folicular, torna-se necessário, também, desenvolver métodos para a indução da ovulação. Existem vários artigos publicados na literatura a respeito da ovulação em aves. A maioria deles objetiva elucidar os mecanismos envolvidos na ovulação nas aves e, para isso, são utilizados diversos hormônios para induzir uma ovulação precoce em aves normais ou para induzi-la em aves nas quais o mecanismo da ovulação está sendo bloqueado por restrição alimentar ou hipofisectomia por exemplo. Dentre os hormônios que já foram estudados para induzir a ovulação em aves está o GnRH e seus análogos (BENNETT, 2002).

O GnRH aviário e mamífero têm sido utilizados com sucesso para induzir a ovulação em galinhas, no tempo esperado ou prematuramente. Doses de 5 a 10µg induzem a ovulação precoce ou no tempo esperado na maioria das aves tratadas. Doses mais altas (20-40µg) geralmente resultam em uma ovulação precoce antecipando em mais de 6h a ovulação (BENNETT, 2002).

Johnson, Dickerman e Advis (1984) e Johnson, Johnson e Van Tienhoven (1984) utilizaram dois tipos de GnRH, mamífero e o cGnRH-I para induzir a ovulação precoce em galinhas poedeiras, e foi bem sucedido com os dois tipos de tratamento. Foi verificado também que quando as aves eram tratadas previamente a primeira ovulação de uma sequência de ovos, todas as aves ovularam prematuramente. Entretanto, quando tratadas antes da segunda ovulação, quase todas as ovulações ocorriam no período estimado. Isso pode estar relacionado à uma incapacidade/refratariedade do folículo F1 em iniciar a produção e a secreção de progesterona após uma ovulação anterior. Segundo Johnson, Dickerman e Advis (1984) a resposta da hipófise ao GnRH exógeno é a mesma nas duas ocasiões, mas a resposta ovariana ao LH pode ser diferente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo apresentou duas fases experimentais que foram realizadas durante a época reprodutiva dos avestruzes no Brasil (CARRER et al., 2004) no período de 11 de julho a 02 de dezembro de 2011. A primeira fase consistiu no acompanhamento dos animais para descrição das características reprodutivas, hormonais e fisiológicas e na segunda fase realizou-se o tratamento com análogo de GnRH para indução da ovulação. Realizou-se, também, um pequeno experimento visando à validação fisiológica dos ensaios hormonais utilizados neste estudo após o fim do mesmo. Para facilitar a compreensão das fases experimentais e do ensaio de validação fisiológica, O material e métodos de cada fase experimental e do ensaio de validação fisiológica serão descritos separadamente nas subseções a seguir.

4.1 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA

Foi executado um pequeno experimento visando a Validação Fisiológica dos ensaios hormonais utilizados neste estudo. Para tal realizou-se um desafio de ACTH e um desafio de GnRH. Nas seções a seguir serão explicados, sucintamente, os delineamentos dos desafios propostos.

4.1.1 Animais

Para os desafios propostos foram utilizadas 6 fêmeas adultas de avestruzes. As condições de manejo e manutenção dos animais são descritas na seção **4.2.1 Animais**.

4.1.2 Aplicação dos desafios hormonais

Para a realização dos desafios hormonais, as fêmeas eram contidas fisicamente e era feita a coleta de uma primeira amostra de sangue para posterior dosagem hormonal (tempo 0h). Logo após esta coleta, procedia-se a aplicação do hormônio do respectivo desafio e novas coletas de sangue eram realizadas nos intervalos de 1h, 3h, 5h, 7h e 24h pós-aplicação. Os procedimentos para coleta, obtenção do soro sanguíneo e seu armazenamento seguiram a metodologia descrita na seção **4.2.2 Coletas de sangue e obtenção do soro sanguíneo**.

No dia seguinte à aplicação do medicamento (tempo 24h), além da coleta de sangue foi realizado também a observação e avaliação do comportamento reprodutivo e o exame ultrassonográfico do ovário das fêmeas conforme descritos na seção **4.2.3 Observação e avaliação do comportamento reprodutivo** e na seção **4.2.5 Exame ultrassonográfico do ovário**.

No desafio com ACTH foi realizada a aplicação intramuscular de 1ml (1mg / 100UI) de ACTH tetracosactídio (Synacthen®, NOVARTIS PHARMA SA – Bruxelas, Bélgica) e no desafio com GnRH foi aplicado 1ml (25µg) do análogo de GnRH lecirelina (Gestran® Plus, Tecnopec Cons. Com. Repres. Ltda., São Paulo/SP). O intervalo entre os desafios foi de aproximadamente 1 mês, sendo que o período em que ocorreram os desafios foi de março a abril de 2012.

Para cada desafio proposto foram realizadas as dosagens de estradiol, progesterona e corticosterona em todas as amostras coletadas, seguindo as metodologias de dosagem descritas na seção **4.2.4 Dosagens hormonais: estradiol e progesterona** e na seção **4.3.3 Dosagem hormonal: corticosterona**.

4.1.3 Análise estatística

Para a comparação das médias da concentração sérica de estradiol nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h do desafio de ACTH foi utilizado o teste de Friedman de amostras repetidas seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$), já que os dados não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de progesterona nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h do desafio de ACTH foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados transformados ($Log_{10}X$), seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para a comparação das médias da concentração sérica de corticosterona nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h do desafio de ACTH foi utilizado o teste de Friedman para amostras repetidas seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$), já que os dados não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de estradiol nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h do desafio de GnRH foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados originais, seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais obedeceram a uma distribuição normal e possuíam homogeneidade de variâncias.

Para a comparação das médias da concentração sérica de progesterona nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h do desafio de GnRH foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados transformados ($Log_{10}X$), seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para a comparação das médias da concentração sérica de corticosterona nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h do desafio de GnRH foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados transformados ($Log_{10}X$), seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação as concentrações dos hormônios (estradiol, progesterona e corticosterona) em cada desafio foi utilizado o teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$), nos dados transformados ($Log_{10}X$), já que os dados originais não obedeceram às premissas de normalidade (36 pares de amostra).

As análises estatísticas e gráficos de resultados foram realizados com o auxílio do programa Graphpad Prism versão 5.04 para Windows® (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.).

4.2 PRIMEIRA FASE: DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HORMONAIS E REPRODUTIVAS

Durante esta fase os animais estudados foram avaliados quanto às alterações dos seus *status reprodutivo*s ao longo do tempo através de observação e análise de comportamento reprodutivo, da avaliação da concentração sérica de estradiol (E2) e progesterona (P4), da realização de exames ultrassonográficos do ovário e pela anotação dos índices de postura. Esta fase foi realizada no período de 11 de julho a 16 de setembro de 2011.

4.2.1 Animais

Foram estudadas dez (n=10) fêmeas adultas de avestruz (*Struthio camelus*) do criatório comercial “Sítio Aoyama” localizado na cidade de Ibiúna, estado de São Paulo (-23º 47' 22.79" de Latitude e -47º 13' 40.85" de Longitude).

As fêmeas eram mantidas em casal (um macho para cada fêmea) em piquetes retangulares (150 a 250m^2) com pasto de capim Coastcross e Braquiária. Nos piquetes havia uma pequena área coberta (2,5mx2, 5m) onde era oferecida ração comercial específica para avestruzes em reprodução (R.T.B. Indústria e Comércio de Rações Ltda.), divididos entre o período da manhã/tarde. Era oferecida suplementação de volumoso quando necessária (alfafa fresca e hortaliças de folha escura). O fornecimento de água *ad libitum* era realizado em bebedouros próprios para avestruzes adultos. Os ovos de cada piquete eram coletados diariamente quando observada a postura e identificados imediatamente com a data da coleta e número do piquete de origem. Posteriormente, os ovos eram limpos e destinados prontamente à venda, já que no ano de 2011 o criatório não realizou a incubação dos ovos.

A seleção das fêmeas estudadas foi feita através de uma pré-avaliação realizada no mês anterior ao início do estudo (junho/2011). A pré-avaliação tinha como objetivo a coleta de dados que permitissem estabelecer a condição reprodutiva (*status* reprodutivo) de cada fêmea do plantel. Para tal, num primeiro

momento foi realizada visita à propriedade para a coleta do histórico de posturas de todas as fêmeas que poderiam fazer parte do grupo experimental (n = 17). Após avaliação destes dados, verificou-se certa inconsistência nos dados tabulados, como, por exemplo, mudanças de casais entre piquetes e trocas da fêmea do casal não corretamente anotadas, o que comprometia uma seleção dos animais através desta avaliação e impossibilitou a elaboração de um histórico de postura de cada fêmea.

Por conseguinte, foram realizadas outras três visitas a propriedade para se avaliar diretamente a "condição reprodutiva momentânea" de cada fêmea, através da realização de exame ultrassonográfico do ovário e da observação de comportamento reprodutivo. Isto permitiu que o *status* reprodutivo momentâneo de cada fêmea fosse estabelecido. A partir daí, procedeu-se a seleção de 10 fêmeas que seriam representantes fidedignas da diversidade encontrada nos criatórios de avestruzes no Brasil (boas e más reprodutoras) para compor o grupo experimental.

4.2.2 Coletas de sangue e obtenção do soro sanguíneo

As coletas de sangue das fêmeas estudadas eram realizadas todas as segundas, quartas e sextas-feiras, no período da manhã. As coletas tinham início entre 9:30 e 11:00 da manhã, variando de acordo com a rotina na propriedade. Para se coletar todas as amostras do dia (n = 10), levava-se por volta de 40 minutos até 2 horas, tempo este que variava de acordo com a realização ou não de exames ultrassonográficos do ovário.

Para a coleta, os animais eram contidos fisicamente com auxílio de um cambão próprio para avestruzes e capuz. Após a contenção do animal, era colhida amostra de sangue (10ml) por punção da veia jugular direita (Figura 1) e o sangue obtido era então acondicionado em tubos Vacutainer® para sorologia (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes, Franklin Lakes, New Jersey, E.U.A.) e identificados. Terminada a coleta de sangue, as amostras eram colocadas em uma caixa térmica para transporte, onde eram mantidas em repouso, à sombra e em temperatura ambiente por 2 até 4 horas para a efetiva retração do coágulo. Após esse período, as amostras eram centrifugadas por 5 minutos a 1924G para a

separação do soro sanguíneo. O soro obtido era separado em quadruplicatas em tubos plásticos do tipo Eppendorf® de 1,5ml e era anotada em planilha a quantidade obtida, seu grau de hemólise e formação de “gel” no soro pós-centrifugação através de cruzes (-: ndn; +: pouco; ++ médio; +++: alto). As amostras, então, eram identificadas com o número do animal, número de lote e a seguir eram congeladas e armazenadas a –20ºC no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP até a realização das dosagens hormonais.

Figura 1 – Contenção física de fêmea de avestruz com capuz para a coleta de sangue através da punção da veia jugular direita – Ibiúna/SP – 2011

4.2.3 Observação e avaliação do comportamento reprodutivo

A observação do comportamento reprodutivo dos animais estudados era realizada nos dias de coleta por volta de 1 hora antes do início dos procedimentos. A técnica empregada para avaliação do comportamento reprodutivo das fêmeas de avestruz seguiu a proposta desenvolvida por Silva (2008) em estudo anterior, que será brevemente descrita a seguir.

O observador se aproxima do animal estudado pelo lado de fora do piquete e, por um período de 2 a 5 minutos avalia algumas características do comportamento reprodutivo (*display*) das fêmeas (Figura 2).

Figura 2 – Aproximação do observador pelo lado de fora do piquete para realizar a avaliação e observação do comportamento reprodutivo de uma fêmea de avestruz – Ibiúna/SP – 2011

A avaliação do comportamento reprodutivo consiste na atribuição de notas de intensidade (0 a 3) para o critério chamado de ASA (Figura 3A), que se baseia na característica de “abrir e bater as asas” e para o critério BICO, baseado na observação do comportamento de “abaixar e balançar pendular da cabeça batendo o bico” (Figura 3B). As notas são definidas de acordo com a porcentagem do tempo da observação em que o animal apresenta as características de cada critério: (0) nenhum comportamento; (1) menos de 50% do tempo observado; (2) entre 50% e 75% do tempo; (3) mais que 75% do tempo. A visualização do comportamento de “aceitação de cópula“ (AC) é avaliada como (1) presente ou (0) ausente (Figura 3C).

O estabelecimento destes critérios teve como base as informações na literatura encontradas a respeito do aparecimento, evolução e desenvolvimento do comportamento reprodutivo (display) em fêmeas de avestruz (CARRER et al., 2004) e também da informação de que avestruzes adultos mantidos em criatórios

comerciais comumente demonstram comportamento reprodutivo perante aos seres humanos (BUBIER et al., 1998).

Figura 3 – Comportamento reprodutivo de uma fêmea de avestruz: A) posição de abaixar e bater de asas (ASA); B) abaixar e o balançar pendular da cabeça com bater de bico (BICO); C) Posição de aceitação de cópula (AC) – Ibiúna/SP – 2011

Para realizar as análises comparativas e as correlações entre o comportamento reprodutivo e as outras variáveis do estudo - como os níveis hormonais e os resultados ultrassonográficos - as notas atribuídas a cada critério comportamental estabelecido foram somadas (*ASA+BICO+AC)*. Isto permitiu que as amostras coletadas fossem separadas em categorias de acordo com o comportamento reprodutivo, a saber:

- Amostras de fêmeas Sem Comportamento (SC)

  - ASA + BICO + AC = 0

- Amostras de fêmeas com Comportamento Baixo (CBX)

  - ASA + BICO + AC ≤ 3

- Amostras de fêmeas com Comportamento Alto (CA)

  - ASA + BICO + AC ≥ 4 até 7

4.2.4 Dosagens hormonais: estradiol e progesterona

Os esteroides sexuais estradiol (E2) e progesterona (P4) foram mensurados pela técnica de Radioimunoensaio (RIE), no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. Em ambos os casos, utilizaram-se conjuntos comerciais para dosagem em soro sanguíneo de seres humanos, pré-validados laboratorialmente para uso em avestruzes (BRONNEBERG et al., 2007a; SILVA, 2008).

Para a dosagem do estradiol foi utilizado o conjunto Estradiol Coat a Count® (Siemens, Los Angeles, CA, E.U.A.). Para a realização do ensaio de estradiol, foi necessário realizar previamente a extração das amostras de soro com éter etílico. O protocolo utilizado seguiu o recomendado e comumente utilizado na rotina do LDH, e está descrito abaixo:

1) Pipetar 1ml de soro em tubo de ensaio de 15ml;
2) Adicionar 5ml de éter etílico PA;
3) Vórtex por 2min;
4) Descansar por 5min;
5) Vórtex por 2min;
6) Descansar por 30min;
7) Tomando-se o cuidado para que não ocorra mistura dos sobrenadantes, submergir o tubo de ensaio em cuba de gelo seco com metanol;
8) Após o total congelamento da solução líquida com formação de botão esbranquiçado no fundo do tubo, verter o sobrenadante em outro tubo de ensaio de 15ml;
9) Realizar a secagem da solução em banho maria (60ºC/15min);
10) Ressuspender o extrato obtido em 250µl de solução PBS;
11) Vórtex por 20min;
12) Extrato pronto para dosagem;
13) Após dosagem corrigir o resultado do ensaio hormonal dividindo a dose pelo fator de concentração (valor dosagem ÷ 4);

Após cada bateria de extração, os extratos obtidos foram acondicionados em tubos plásticos de 1,5ml do tipo Eppendorf® e mantidos refrigerados, por no máximo 48h, até a realização dos ensaios de estradiol por RIE.

Todas as amostras coletadas foram dosadas em duplicata e os resultados expressos em *pg/ml* (picogramas por mililitro) para o estradiol e corrigidos pelo fator de concentração. A metodologia do ensaio seguiu o recomendado pelo fabricante do conjunto comercial de RIE. A quantidade de ensaios para dosagem de estradiol, assim como seus controles de qualidade (coeficiente de variação inter e intraensaio, sensibilidade, ligações não específicas, capacidade de ligação, contagens por minuto e os coeficientes de variação alta e baixa), serão apresentados para todas as dosagens realizadas no experimento na seção 5.1 CONTROLES DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS.

Para progesterona foi utilizado o conjunto Progesterone Coat a Count® (Siemens, Los Angeles, CA, E.U.A.). Todas as amostras coletadas foram dosadas em duplicata diretamente no soro sanguíneo e os resultados expressos em *ng/ml* (nanogramas por mililitro). . A metodologia do ensaio seguiu o recomendado pelo fabricante do conjunto comercial de RIE. A quantidade de ensaios para dosagem de progesterona, assim como seus controles de qualidade (coeficiente de variação inter e intraensaio, sensibilidade, ligações não específicas, capacidade de ligação, contagens por minuto e os coeficientes de variação alta e baixa), serão apresentados para todas as dosagens realizadas no experimento na seção 5.1 CONTROLES DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS.

4.2.5 Exame ultrassonográfico do ovário

Os exames ultrassonográficos (US) eram realizados no próprio piquete dos animais, posteriormente à coleta de sangue. Para manter o horário das coletas e não atrapalhar as demais atividades da propriedade os exames de ultrassonografia ovariana eram divididos entre os dias da semana: 3 fêmeas as segundas, 4 fêmeas as quartas e 3 fêmeas nas sextas-feiras. Deste modo, na primeira semana do estudo, todos os animais do experimento foram examinados e, a partir daí, eram

reavaliados a cada 21 dias (2 semanas sem exames de US) até o fim da primeira fase.

A técnica utilizada no exame US do ovário do avestruz deste experimento foi uma versão simplificada da metodologia descrita por Bronneberg e Taverne (2003), brevemente descrita a seguir: o exame era feito posicionando-se o transdutor, com gel de acoplamento, diretamente na pele da região ventroabdominal aptérica da ave, bem detrás da virilha. Primeiramente era realizada uma avaliação geral da região no sentido craniocaudal e dorsoventral e posteriormente um exame mais minucioso era realizado para permitir a contagem e a medição de todos os folículos ovarianos (10 - 90 mm) e identificar outras estruturas presentes no ovário (folículos pós-ovulatórios e folículos atrésicos) e no oviduto (ovo em desenvolvimento). Os citados autores utilizaram a frequência de 3,5MHz para permitir um maior alcance das ondas ultrassonográficas (20 cm), e uma frequência mais alta (5 MHz) quando houvesse a necessidade de uma visão mais detalhada. A medição dos folículos (maior diâmetro obtido) era realizada durante o exame através do comando *FREEZE* e das ferramentas de medição padrões do aparelho sendo todo o exame gravado em vídeo para a posterior confirmação das medidas e número de folículos encontrados.

Nos exames US realizados neste experimento foi utilizado um aparelho de ultrassonografia veterinário portátil a bateria, acoplado a um transdutor convexo de frequência variável de 2,5 a 5,5MHz (ECM EXAGO / Noveko International Inc.® Angoulême - França). Primeiramente era realizada a avaliação no lado esquerdo do animal e terminado o exame neste lado a mesma avaliação era realizada a partir do lado direito do animal. Durante o exame buscou-se avaliar o grau de desenvolvimento ovariano através da observação da presença de folículos ovarianos grandes e hierarquizados (> 40mm) sendo que os maiores folículos encontrados em cada lado eram medidos utilizando-se o comando *FREEZE* e as ferramentas de medição do aparelho. Para caracterizar o desenvolvimento ovariano de cada fêmea, foi atribuída a expressão “bem desenvolvido” para aquelas que possuíam folículos ovarianos em boa quantidade e maiores do que 75mm, “pouco desenvolvido” para as que possuíam folículos em menor quantidade e menores do que 75mm e “não desenvolvido” para aquelas em que não foram visualizados folículos ovarianos exame.

As imagens dos maiores folículos medidos e o *cineloop* (128 quadros sequenciais – 5s de vídeo que ilustram o aspecto geral do ovário) de cada exame realizado foram armazenados em *pendrive* e transferidos para um computador pessoal.

O tempo gasto no exame ultrassonográfico de cada animal variava entre 10 a 20 minutos dependendo do grau de desenvolvimento ovariano e da quantidade de estruturas a serem avaliadas no exame. Também era registrada a presença de estruturas como ovo em formação no oviduto (considerado como confirmação de ovulação) e a presença de folículos em atresia no ovário. A figura 4 demonstra a realização de um exame ultrassonográfico durante o experimento.

Figura 4 – Realização do exame de ultrassonografia ovariana em fêmea de avestruz. Notar posicionamento do transdutor na virilha da ave – Ibiúna/SP – 2011

4.2.6 Dados meteorológicos e índices de postura

As condições meteorológicas (sol, sol com nuvens, nublado, chuva fraca e chuva intensa) no momento das coletas de sangue e as observações de comportamento foram anotadas em planilha pelo pesquisador nos dias de estudo. Em dias com chuva, não era realizada a observação de comportamento, pois os

animais permaneciam em decúbito e não demonstravam comportamento reprodutivo algum. Os exames ultrassonográficos previstos também não eram realizados se houvesse chuva, sendo realizados no próximo dia de coletas.

Dados climáticos como temperatura mensal média e precipitação para Ibiúna no ano de 2011 não puderam ser disponibilizados pelos órgãos governamentais competentes devido a problemas técnicos na coleta dos dados da estação meteorológica que perduram até o momento. Por conta disso, estes dados foram coletados da estação meteorológica de São Roque, cidade mais próxima a Ibiúna. Estes dados podem ser acessados através do site do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas do Governo do Estado de São Paulo (<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>).

O tempo de duração do dia (fotoperíodo) foi calculado para o dia 15 de cada mês de 2011 por software *online* (<http://www.solartopo.com/daylength.htm>) para a latitude e longitude da propriedade.

O histórico de posturas da propriedade era mantido através da anotação das datas de coleta de ovo por piquete. Nestas anotações foram verificadas diversas inconsistências, já que não foram registrados adequadamente, por exemplo, mudanças de casais de piquete. Isto impediu uma adequada recuperação dos dados de produção de ovos por fêmea.

Deste modo, os dados de produção da propriedade foram reorganizados de forma a se obter a produção mensal de ovos de todas as fêmeas da propriedade a partir de julho de 2010 até o início do estudo (julho de 2011). Durante a realização do período experimental os dados de coleta de ovos foram anotados corretamente nas planilhas de controle e foi possível obter as datas de coleta de cada ovo de cada fêmea da propriedade no decorrer do período experimental. Posteriormente ao término do período experimental foi realizada nova visita à propriedade e coletaram-se os dados do período de dezembro de 2011 a 18 de abril de 2012.

4.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos durante esta fase foram testados quanto à normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias através dos testes de através do teste

de Kolmogorov-Smirnov e do teste de Bartlett. Caso os dados não obedecessem estas premissas eram transformados (logaritmo na base 10 – $Log_{10}X$) e se a normalidade e homogeneidade de variâncias não fossem obtidas empregavam-se análises não paramétricas.

Durante esta fase do estudo foi realizada análises estatísticas descritivas, calculando-se as médias e desvios-padrão (DP) da concentração sérica de estradiol e progesterona para cada fêmea estudada. Para a avaliação do surgimento de picos destes hormônios, estabeleceu-se um *limiar (threshold)* através da fórmula MÉDIA + (2*x*DP) para cada fêmea nesta fase.

Para a comparação das médias (medianas) da concentração sérica de estradiol entre as 3 categorias comportamentais estabelecidas (SC; CBX; CA) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias (medianas) da concentração sérica de progesterona entre as 3 categorias comportamentais estabelecidas (SC; CBX; CA) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre a concentração sérica de estradiol e da concentração sérica de progesterona foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (290 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre as concentrações hormonais (estradiol e progesterona) e o comportamento reprodutivo calculado pela fórmula proposta foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (290 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre as concentrações hormonais (estradiol e progesterona) e a medida do maior folículo

observado no US foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (40 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre o comportamento reprodutivo calculado pela fórmula proposta e a medida do maior folículo observado no US foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (40 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre o a produção de ovos por animal com o fotoperíodo e a precipitação mensal observada durante o período de estudo foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (40 pares de amostra).

As análises estatísticas e gráficos de resultados foram realizados com o auxílio do programa Graphpad Prism versão 5.04 para Windows® (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.).

4.3 SEGUNDA FASE: APLICAÇÃO DE TRATAMENTO COM ANÁLOGO DE GNRH

A segunda fase do experimento iniciou-se logo após o término da primeira fase, no dia 19 de setembro e se estendeu até o dia 02 de dezembro de 2011.

Durante esta fase as fêmeas de avestruz estudadas foram submetidas a um tratamento medicamentoso que consistia na aplicação do *análogo de GnRH* lecirelina (Gestran® Plus, Tecnopec Cons. Com. Repres. Ltda., São Paulo/SP), com o objetivo de verificar se é possível induzir a ovulação e a consequente postura em fêmeas adultas de avestruzes. Nas seções a seguir, será explicado o delineamento do tratamento realizado.

4.3.1 Animais

No fim de semana, após o término das coletas da primeira fase, fomos informados pelo proprietário que uma das fêmeas do estudo (P8) ficou presa nos arames da cerca do piquete acidentalmente. Ao se debater, na tentativa de se desvencilhar, acabou sofrendo diversas escoriações (luxação grave nas asas esquerda e direita, escoriação e lesões graves nas pernas e corpo) e foi eutanasiada. Isto fez com a segunda fase do experimento fosse realizada com apenas 9 fêmeas.

Para a aplicação do tratamento, os animais estudados durante a primeira fase foram divididos em 2 grupos: o grupo CONTROLE (n = 3) e o grupo TRATADO com o análogo de GnRH (n = 6).

A cada início de semana, 2 das 6 fêmeas do grupo TRATADO eram selecionadas para receberem a aplicação do tratamento e 2 fêmeas do grupo CONTROLE eram selecionadas para serem manejadas da mesma maneira que as tratadas, não recebendo no entanto a aplicação do hormônio. As fêmeas restantes (n = 5) eram manejadas neste período como o proposto para a primeira fase, com coletas de sangue e observação do comportamento reprodutivo 3x/semana. O tratamento era repetido numa mesma fêmea a cada 21 dias, aproximadamente, até o fim do período experimental. Este delineamento foi necessário em razão das

limitações logísticas da propriedade. A tabela 1 demonstra os dias de aplicação do tratamento e os animais selecionados para serem tratados e controles de cada semana.

Tabela 1 – Datas de tratamento com análogo de GnRH (lecirelina) e fêmeas de avestruz selecionadas para serem controle e tratadas a cada semana durante a segunda fase do estudo - São Paulo/SP – 2012

DATA	ANIMAIS	
	Controle	Tratado
19/09/2011	P12 / P16	P1 / P4
10/10/2011	P12 / P16	P1 / P4
17/10/2011	P2 / P12	P3 / P15
24/10/2011	P2 / P16	P9 / P14
31/10/2011	P12 / P16	P1 / P4
07/11/2011	P12 / P16	P3 / P15
14/11/2011	P2 / P12	P9 / P14
21/11/2011	P2 / P16	P1 / P4
28/11/2011	P12 / P16	P3 / P15

4.3.2 Aplicação do tratamento com análogo de GnRH

O tratamento consistiu na aplicação, via intramuscular, de 1ml (25µg) do análogo de GnRH lecirelina por ave. A dose escolhida foi baseada na dose recomendada na Bula do medicamento para indução de ovulação em éguas (2 a 4ml).

A aplicação do medicamento ocorria às segundas-feiras - a fim de se acompanhar seus efeitos ao longo do resto da semana - logo após a coleta de sangue (0h). Para um melhor acompanhamento das alterações da concentração sérica dos hormônios estradiol e progesterona das fêmeas do grupo TRATADO submetidas à aplicação de tratamento (n = 2) e das fêmeas utilizadas como

CONTROLE (n = 2), além das coletas de sangue nos horários propostos na primeira fase (0h, 48h e 96h) foram coletadas adicionalmente amostras de sangue nos horários de 6h e 24h após a aplicação do medicamento. Estas coletas adicionais foram introduzidas com a intenção de reduzir as possibilidades de perder-se algum pico hormonal e o momento da ovulação.

Para avaliação do efeito do tratamento no ovário das fêmeas TRATADAS, era realizado exame ultrassonográfico do ovário nos momentos 0h, 24h, 48h e 96h pós-aplicação do medicamento, conforme descrito na primeira fase. Os exames nos momentos de 24h e 48h tinham por objetivo identificar a indução ou não da ovulação, caracterizada pela presença de ovo em desenvolvimento no oviduto na imagem ultrassonográfica. Nas fêmeas CONTROLE, a avaliação ultrassonográfica do ovário foi realizada somente nos momentos de 0h e 96h, já que a propriedade não dispunha de pessoal com disponibilidade de tempo suficiente para realizar uma maior quantidade de exames ultrassonográficos por dia.

4.3.3 Dosagem hormonal: corticosterona

Durante a segunda fase, além da dosagem por RIE da concentração sérica de estradiol e progesterona, foi realizada adicionalmente, a dosagem de corticosterona por RIE das amostras das fêmeas que eram selecionadas como CONTROLE e TRATADAS de cada semana de aplicação do tratamento (n = 4 / semana). Para tal foi utilizado o conjunto comercial Immuchem® Double Antibody Corticosterone MP Biomedicals® (Diagnostic division, Orangeburg, NY, E.U.A.), já previamente validado laboratorialmente para o uso em avestruzes (SILVA, 2008). As concentrações séricas de corticosterona foram analisadas como um indicador indireto da intensidade da resposta do tipo estresse apresentada pelos animais submetidos ao manejo de coletas e ao tratamento proposto neste estudo. As amostras selecionadas foram dosadas em duplicata utilizando-se o soro sanguíneo de acordo com as instruções do fabricante. O fator de diluição empregado foi o de 1/10 (100µL de amostra para 900µL de diluente). Quando os valores da dosagem nesta diluição excediam os valores da curva do conjunto, as amostras foram redosadas na diluição de 1/40 (25µL de amostra para 975µL de diluente). Os

resultados obtidos nos ensaios foram expressos em ng/ml (nanogramas por mililitro) e corrigidos de acordo com a diluição empregada. A quantidade de ensaios para dosagem de corticosterona, assim como seus controles de qualidade (coeficiente de variação inter e intraensaio, sensibilidade, ligações não específicas, capacidade de ligação, contagens por minuto e os coeficientes de variação alta e baixa), serão apresentados para todas as dosagens realizadas no experimento na seção 5.1 CONTROLES DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS.

4.3.4 Análise estatística

Os dados obtidos durante esta fase foram testados quanto à normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias através dos testes de através do teste de Kolmogorov-Smirnov e do teste de Bartlett. Caso os dados não obedecessem estas premissas eram transformados (logaritmo na base 10 – $Log_{10}X$ ou raiz quadrada de X - $\sqrt{X}$) e se a normalidade e homogeneidade de variâncias não fossem obtidas empregavam-se análises não paramétricas.

Durante esta fase do estudo foi realizada análises estatísticas descritivas, calculando-se as médias e desvios-padrão (DP) da concentração sérica de estradiol e progesterona para cada fêmea estudada. Para a avaliação do surgimento de picos destes hormônios, estabeleceu-se um *limiar (threshold)* através da fórmula MÉDIA + (2*x*DP) para cada fêmea nesta fase.

Para a comparação das médias da concentração sérica de estradiol entre as 3 categorias comportamentais estabelecidas (SC; CBX; CA) nesta fase foi utilizado o teste *One way ANOVA* seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) nos dados transformados ($Log_{10}X$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para a comparação das médias (medianas) da concentração sérica de progesterona entre as 3 categorias comportamentais estabelecidas (SC; CBX; CA) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de estradiol entre as amostras da primeira fase, as amostras do grupo CONTROLE e as amostras do grupo TRATADO foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de progesterona entre as amostras da primeira fase, as amostras do grupo CONTROLE e as amostras do grupo TRATADO foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de corticosterona entre as amostras do grupo CONTROLE e as amostras do grupo TRATADO foi utilizado o teste de Mann Whitney ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de estradiol do grupo CONTROLE nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h de tratamento foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados transformados ($Log_{10}X$) seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para a comparação das médias da concentração sérica de estradiol do grupo TRATADO nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h de tratamento foi utilizado o teste de Friedman de amostras repetidas seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$), já que os dados não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de progesterona do grupo CONTROLE nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h de tratamento foi utilizado o teste de Friedman para amostras repetidas seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$), já que os dados não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica de progesterona do grupo TRATADO nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h de tratamento foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados transformados ($Log_{10}X$), seguido do

pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para a comparação das médias da concentração sérica de corticosterona do grupo CONTROLE nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h de tratamento foi utilizado o teste *Repeated Measures ANOVA* nos dados transformados ($Log_{10}X$), seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) já que os dados originais não obedeciam a uma distribuição normal.

Para a comparação das médias da concentração sérica de corticosterona do grupo TRATADO nos tempos de 0h, 6h, 24h, 48h e 96h de tratamento foi utilizado o teste de Friedman para amostras repetidas seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$), já que os dados não obedeciam a uma distribuição normal e não puderam ser transformados.

Para a comparação das médias da concentração sérica dos hormônios (E2, P4 e corticosterona) entre os grupos CONTROLE e TRATADO em cada momento do tratamento (0h, 6h, 24h, 48h e 96h) foram utilizados testes paramétricos (*t não pareado,* $p <0,05$) ou não paramétricos (Mann Whitney*,* $p <0,05$) dependendo se estes dados obedecessem às assunções propostas de normalidade e variância e se pudessem ou não ser transformados.

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre as concentrações de estradiol e progesterona, foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (353 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre a concentração dos hormônios (estradiol e progesterona) e o comportamento reprodutivo calculado pela fórmula proposta foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (297 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre a concentração dos hormônios (estradiol e progesterona) e a medida do maior folículo observado no US foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não

obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (113 pares de amostra).

Para avaliar a existência e a intensidade de correlação entre o comportamento reprodutivo calculado pela fórmula proposta e a medida do maior folículo observado no US foi utilizado o teste de correlação de Spearman ($p < 0,05$), já que os dados não obedeceram às premissas de normalidade e a homogeneidade de variâncias e não puderam ser transformados (113 pares de amostra).

As análises estatísticas e gráficos de resultados foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.04 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados conjuntamente para melhor compreensão. Os resultados da Validação Fisiológica, da primeira e da segunda fase do experimento serão dispostos separadamente em seções específicas.

5.1 CONTROLES DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS

O quadro 1 apresenta os controles de qualidade para os ensaios de dosagem de estradiol por RIE realizados nas amostras deste estudo (n= 725).

Quadro 1 – Controles de qualidade dos ensaios de RIE de estradiol – São Paulo/SP – 2012

HORMÔNIO: Estradiol (Siemens)

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose pg/mL)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	33219	44%	0,42%	94(3,12)	11,75%	5,65%
2	27779	42%	0,41%	92(2,93)	7,95%	9,01%
3	27513	42%	0,44%	92(3,08)	8,85%	4,54%
4	27513	42%	0,44%	92(3,08)	9,78%	6,09%
5	27138	43%	0,45%	92(2,27)	3,37%	7,31%
6	26709	42%	0,48%	94(2,61)	7,16%	5,74%
7	26710	42%	0,46%	94(2,61)	8,06%	7,29%
CV Inter ensaio					0,90%	2,72%

Legenda: CPM: contagens por minuto; Cap. Lig: capacidade de ligação; L.N.E: ligação não específica; CV Intra: coeficiente de variação intraensaio; CV Inter: coeficiente de variação interensaio.

O quadro 2 apresenta os controles de qualidade para os ensaios de dosagem de progesterona por RIE realizados nas amostras deste estudo (n= 725).

Quadro 2 – Controles de qualidade dos ensaios de RIE de progesterona – São Paulo/SP – 2012

HORMÔNIO: Progesterona(Siemens)

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose ng/mL)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	53308	47%	0,29%	96(0,04)	9,11%	0,10%
2	50481	47%	0,32%	97(0,04)	0,20%	7,81%
3	50481	47%	0,32%	97(0,04)	0,33%	2,67%
4	49689	47%	0,27%	98(0,04)	7,31%	4,32%
5	49689	47%	0,27%	98(0,04)	7,59%	5,58%
6	49308	48%	0,31%	97(0,04)	4,96%	8,66%
7	49308	48%	0,31%	97(0,04)	6,49%	14,42%
CV Inter ensaio					5,65%	2,72%

Legenda: CPM: contagens por minuto; Cap. Lig: capacidade de ligação; L.N.E: ligação não específica; CV Intra: coeficiente de variação intraensaio; CV Inter: coeficiente de variação interensaio;

O quadro 3 apresenta os controles de qualidade para os ensaios de dosagem de corticosterona por RIE realizados nas amostras deste estudo (n= 196).

Quadro 3 – Controles de qualidade dos ensaios de RIE de corticosterona – São Paulo/SP – 2012

HORMÔNIO: CORTICOSTERONA (MPB)

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose ng/mL)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	31721	54%	2,51%	87 (3,81)	9,94%	3,51%
2	32600	55%	1,44%	88 (3,82)	1,96%	4,63%
3	32600	55%	1,37%	88 (3,82)	8,03%	4,89%
CV Inter ensaio					2,68%	0,37%

Legenda: CPM: contagens por minuto; Cap. Lig: capacidade de ligação; L.N.E: ligação não específica; CV Intra: coeficiente de variação intraensaio; CV Inter: coeficiente de variação interensaio;

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA

Os resultados e as análises de cada desafio hormonal serão apresentados separadamente. Para cada fêmea estudada, os resultados encontrados serão apresentados e suas particularidades discutidas. Quando pertinentes, uma análise conjunta será apresentada. Em cada desafio foram coletadas 36 amostras de sangue, totalizando 72 amostras dosadas para estradiol, progesterona e corticosterona. A observação de comportamento reprodutivo e o exame ultrassonográfico de cada fêmea foram realizados na coleta de 24h pós-aplicação.

5.2.1 Desafio de ACTH

Os gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 apresentam os níveis séricos de estradiol, progesterona e corticosterona de cada fêmea submetida ao desafio de ACTH.

Gráfico 1 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P1 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

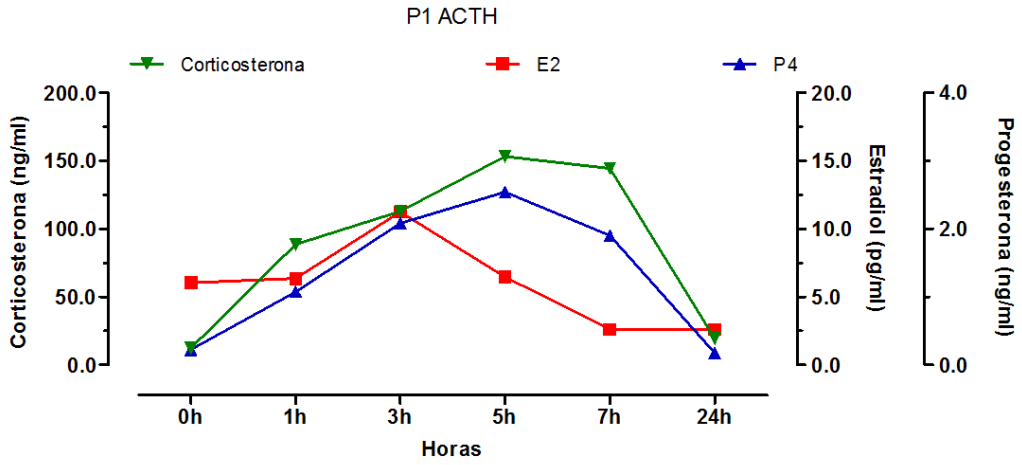


Gráfico 2 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P2 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

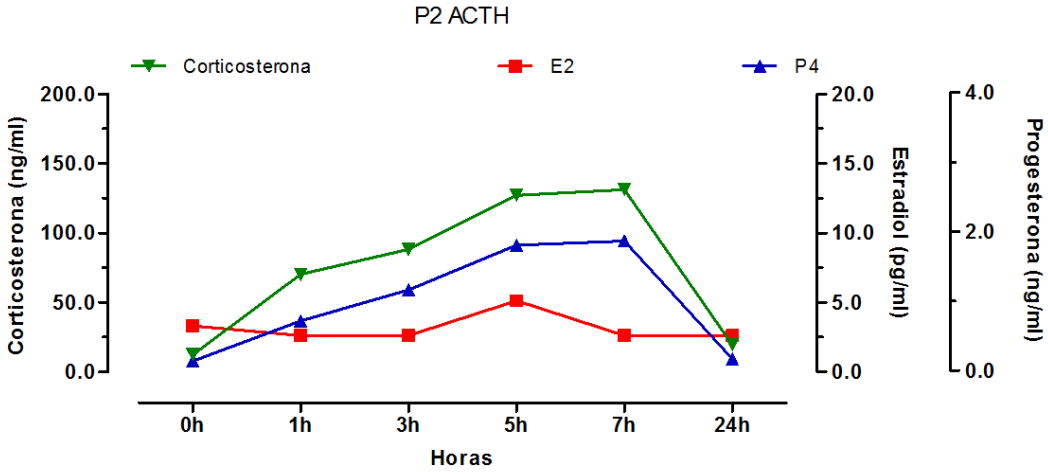


Gráfico 3 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P3 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

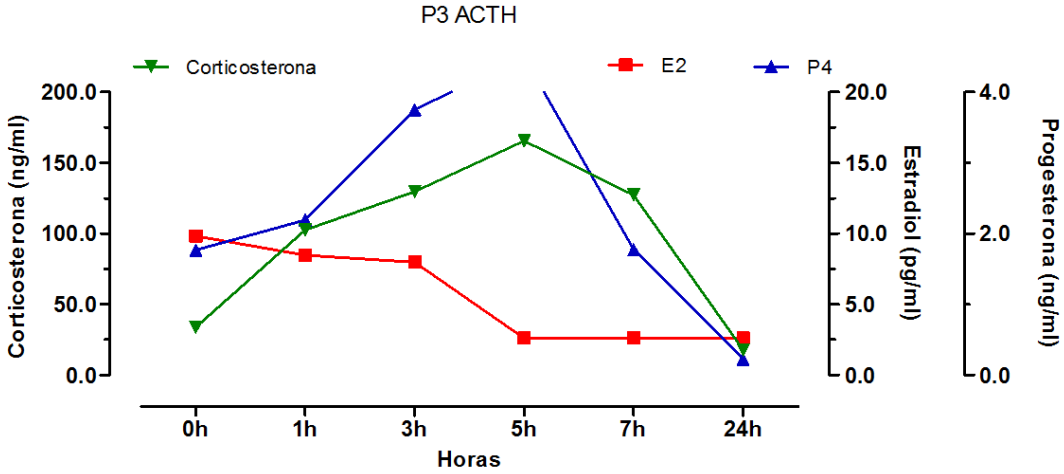


Gráfico 4 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P4 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

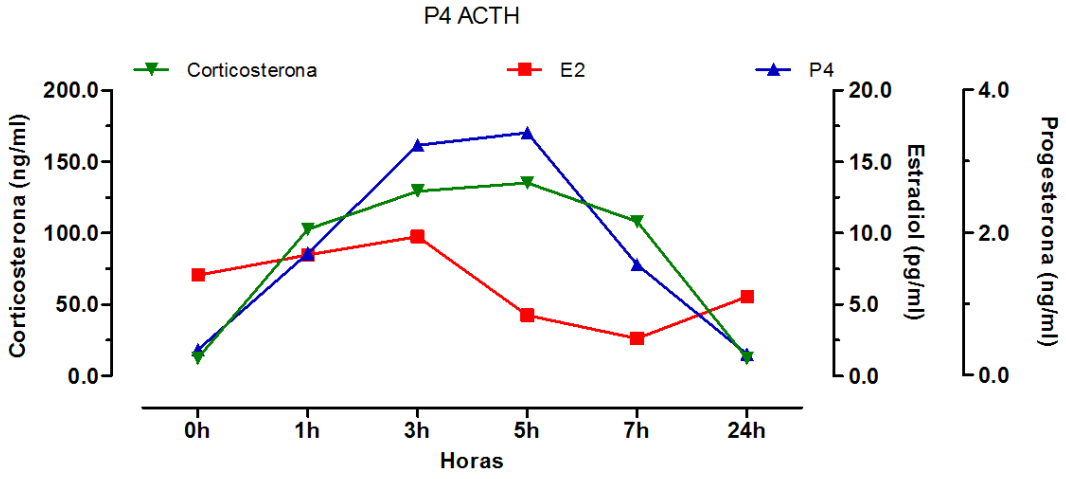


Gráfico 5 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P5 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

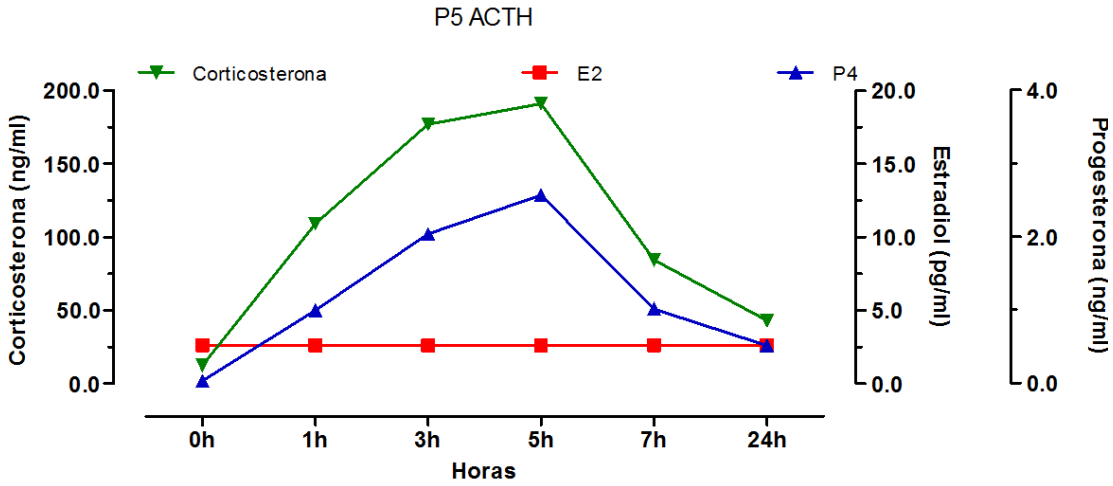
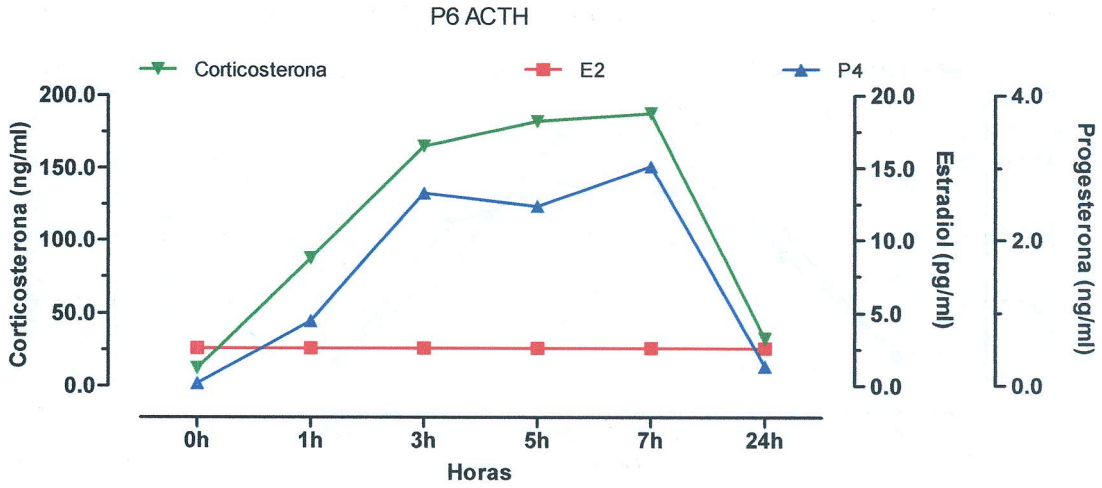


Gráfico 6 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P6 no desafio de ACTH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012



A tabela 2 apresenta a média e o desvio padrão para as concentrações séricas de corticosterona, progesterona e estradiol ao longo do tempo no desafio de ACTH.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão das concentrações séricas de corticosterona, progesterona e estradiol de todas as fêmeas (n = 6) durante os tempos de coleta do desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2012

HORMÔNIOS	0h	1h	3h	5h	7h	24h
Corticosterona (ng/ml)	16,03±8,73[a]	93,52 ±14,21[abc]	133,80±32,86[bc]	159,10±25,48[b]	130,60±34,92[bc]	24,25±11,41[ac]
Progesterona (ng/ml)	0,43±0,66[a]	1,27±0,56[b]	2,49±0,92[b]	2,89±0,93[b]	1,86±0,66[b]	0,28±0,13[a]
Estradiol (pg/ml)	5,25±2,91[a]	5,19±2,92[a]	6,14±3,99[a]	3,95±1,62[a]	2,62±0,00[a]	3,11±0,49[a]

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$)

Analisando cada gráfico individual, verificou-se que após a aplicação de ACTH ocorre um aumento gradativo na concentração sérica de corticosterona, com pico 5h pós-aplicação e, posteriormente, é observada a sua queda até próximo aos níveis iniciais em todas as fêmeas.

Lèche et al. (2006), num desafio de ACTH aplicado em emas jovens com 10 meses de idade, verificou pico de corticosterona com média de 166,54ng/ml, valor

bastante semelhante ao pico de corticosterona observado neste estudo. Em outras espécies de aves também foi verificada picos de corticosterona após aplicação de ACTH, como em garças da Flórida *Grus canadensis pratensis* (LUDDERS et al., 1998) e patos pretos americanos *Anas rubripes* (SPELMAN et al., 1995). Desta forma consideramos o ensaio validado fisiologicamente.

Com relação à progesterona, observa-se que em todos os indivíduos ocorreu um significativo aumento na sua concentração sérica, com picos ocorrendo entre 3h e 5h pós-aplicação. Verificou-se também uma correlação significativa e intensa entre as concentrações séricas de corticosterona e progesterona ($r = 0,94$, $p < 0,02$). Este aumento pode ser atribuído, além da sua possível liberação pelos folículos ovarianos, a uma liberação extragonadal de progesterona oriunda da glândula adrenal. Isto explicaria o porquê do aumento na concentração sérica de progesterona das fêmeas P5 e P6 (Gráficos 5 e 6), já que elas apresentavam pouco ou nenhum desenvolvimento ovariano observado no ultrassom e, também, pela baixa concentração sérica de estradiol próxima ao limite de detecção do ensaio.

Os efeitos da aplicação de ACTH na concentração sérica de progesterona estão descritas em diversas espécies de mamíferos. Tsuma et al. (1998) descrevem que a aplicação de ACTH em porcas primíparas lactantes provocou, além do aumento esperado de cortisol, um aumento na concentração de progesterona sérica. Em um estudo realizado com fêmeas de gato doméstico inteiras e ovariectomizadas verificou-se um aumento significativo na concentração de progesterona e cortisol após aplicação de ACTH em ambos os casos, comprovando a possível liberação de progesterona extragonadal (CHATDARONG et al., 2006). Em vacas leiteiras e ovelhas ovariectomizadas também já foram descritos resultados semelhantes (VAN LIER et al., 1998; YOSHIDA; NAKAO, 2006). Em aves, Etches e Croze (1983) descreveram que a aplicação de ACTH em galinhas poedeiras, além de provocar elevação na concentração de corticosterona, provoca um aumento na concentração de progesterona, o que poderia induzir a uma ovulação precoce. No entanto, o citado trabalho menciona que dependendo do momento da aplicação do ACTH com relação à ovulação, este aumento de progesterona não ocorre, o que pode indicar que o ACTH não estimula uma liberação extragonadal de progesterona em galinhas.

Nas fêmeas P1 e P4 (Gráficos 1 e 4) verificou-se que 2 horas após o pico de progesterona (5h) ocorreu oviposição (7h). De acordo com Bronneberg et al. (2007b)

o pico da progesterona sérica ocorre em avestruzes aproximadamente 3 horas antes da oviposição, ou seja, um período muito próximo dos encontrados nestes animais. Estes resultados podem indicar que o aumento de progesterona extragonadal provocado pela aplicação do ACTH estaria relacionado com a oviposição nestes animais.

A tabela 3 apresenta a categoria comportamental e a avaliação ultrassonográfica do ovário das fêmeas no dia seguinte (tempo 24h) à aplicação do desafio de ACTH.

Tabela 3 – Resultados dos exames ultrassonográficos de ovário e o comportamento reprodutivo apresentado pelas fêmeas de avestruzes no desafio de ACTH no tempo 24h – São Paulo/SP – 2012

ANIMAL	EXAME ULTRASSOM		COMPORTAMENTO
	Ovário	Tamanho > folículo	Categoria
P1	bem desenvolvido	77,8mm	CA
P2	bem desenvolvido	87,2mm*	CA
P3	bem desenvolvido	80,6mm	CBX
P4	bem desenvolvido	88,0mm*	CA
P5	pouco desenvolvido	64,0mm	CBX
P6	não desenvolvido	-	CBX

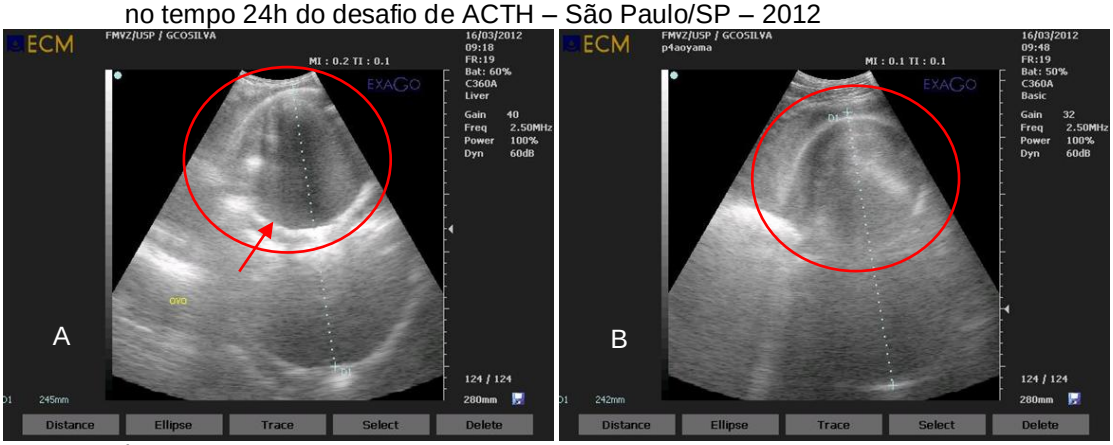
Legenda: CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto.
* Presença de ovo em desenvolvimento no oviduto.

No exame ultrassonográfico do ovário (24h) da fêmea P2 e também da fêmea P4 observou-se a existência de ovo em formação no interior do oviduto (Figura 5). Comparando-se as imagens pode-se perceber que o ovo da fêmea P2 apresenta características de hiperecogenicidade compatíveis com um ovo totalmente formado (Figura 5A). Para isso ocorrer, é necessário que o ovo esteja na região da glândula da casca. Segundo Bronneberg et al. (2007b), o tempo necessário para que, em avestruzes, um ovo em formação alcance a glândula da casca é de aproximadamente 9 horas após ovulação, permanecendo nesta região por mais 39 horas até a postura. Segundo os mesmos autores, o pico de progesterona ocorre 5 horas antes da ovulação. Deste modo, neste trabalho, se a ovulação tiver ocorrido 5 horas após o pico de progesterona, o ovo em formação teria chegado à região da glândula da casca aproximadamente 19h pós-aplicação.

Como o exame ultrassonográfico foi realizado 24 horas após a aplicação, ele estaria naquela região por apenas 5 horas, tempo insuficiente para a deposição de cálcio ilustrada na imagem ultrassonográfica.

No caso da fêmea P4 (Figura 5B), verificou-se a presença de um ovo em formação hipoecoico e irregular nas bordas, características estas compatíveis com um ovo ainda não completamente formado (BRONNEBERG et al., 2007b). Neste caso, se tivesse ocorrido uma ovulação 5 horas após o pico de progesterona, significaria dizer que este ovo estaria na região da glândula da casca no máximo há 5 horas, período este compatível com seu estágio de desenvolvimento. Desta forma pode-se sugerir que no caso da fêmea P2 não teria havido a indução da ovulação pelo aumento da progesterona, mas esta pode ter ocorrido no caso da fêmea P4.

Figura 5 – Imagens ultrassonográficas do oviduto das fêmeas P2 (A) e P4 (B) demonstrando a presença de ovo em desenvolvimento durante a realização do exame de ultrassom no tempo 24h do desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2012



Legenda: o Círculo vermelho destaca o ovo em formação. A seta indica bordas hiperecoicas decorrentes da deposição de cálcio na casca.

Com relação aos resultados da média das concentrações séricas de estradiol, como esperado, não foram observadas variações significativas após aplicação (Tabela 2). Considerando as respostas individuais observaram-se dois tipos de resposta. As fêmeas P1, P2, P3 e P4 (Gráficos 1, 2, 3 e 4), apresentaram inicialmente um aumento da concentração (entre 3h e 5h) com posterior queda a valores próximos ao limite de detecção do ensaio. Já as fêmeas P5 e P6 (Gráficos 5 e 6) apresentaram concentrações baixas, no limite de detecção do ensaio em todas as dosagens. As fêmeas P1, P2, P3 e P4, ao exame ultrassonográfico,

apresentavam ovários com folículos bem desenvolvidos enquanto que as duas últimas (fêmeas P5 e P6) possuíam ovário pouco ou não desenvolvido (Tabela 3). Este aspecto poderia explicar porque algumas apresentaram alguma intensidade de resposta e outras não responderam. Possivelmente existiriam receptores para corticosterona nos folículos ovarianos fazendo com que estes respondessem ao estímulo, provocado pela aplicação de ACTH, produzindo mais estradiol.

5.2.2 Desafio de GnRH

O desafio de GnRH foi realizado aproximadamente 1 mês após o desafio do ACTH e foram utilizados os mesmo indivíduos.

Os gráficos 7, 8, 9, 10, 11 e 12 apresentam as concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona de cada fêmea submetida ao desafio de GnRH.

Gráfico 7 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P1 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

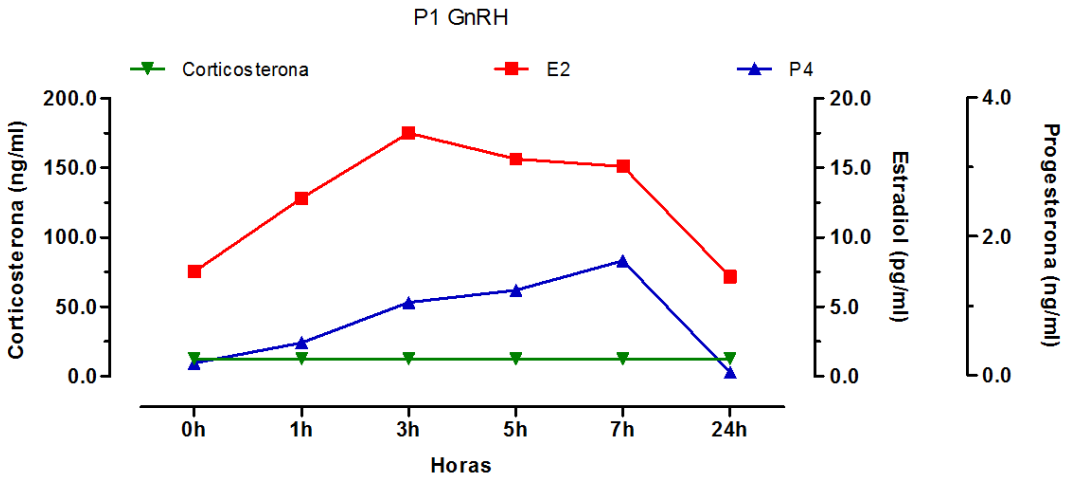


Gráfico 8 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P2 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

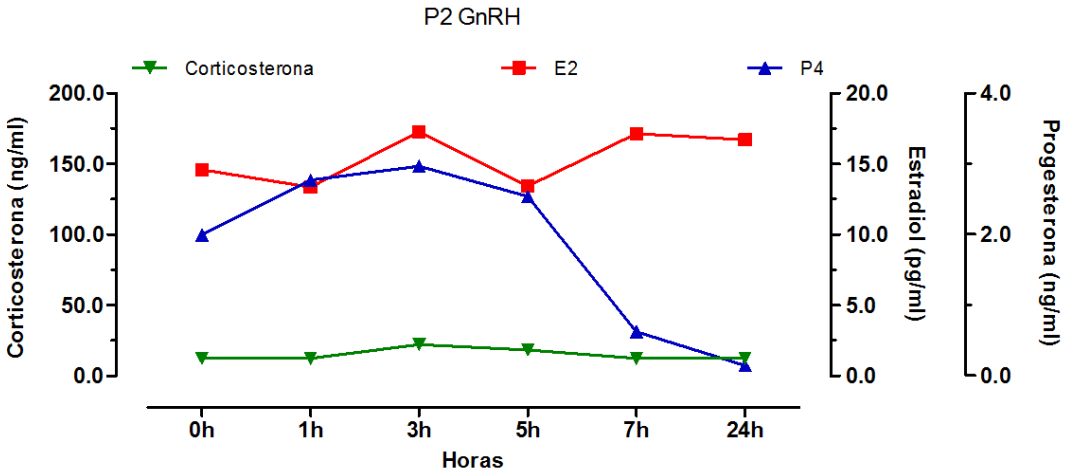


Gráfico 9 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P3 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

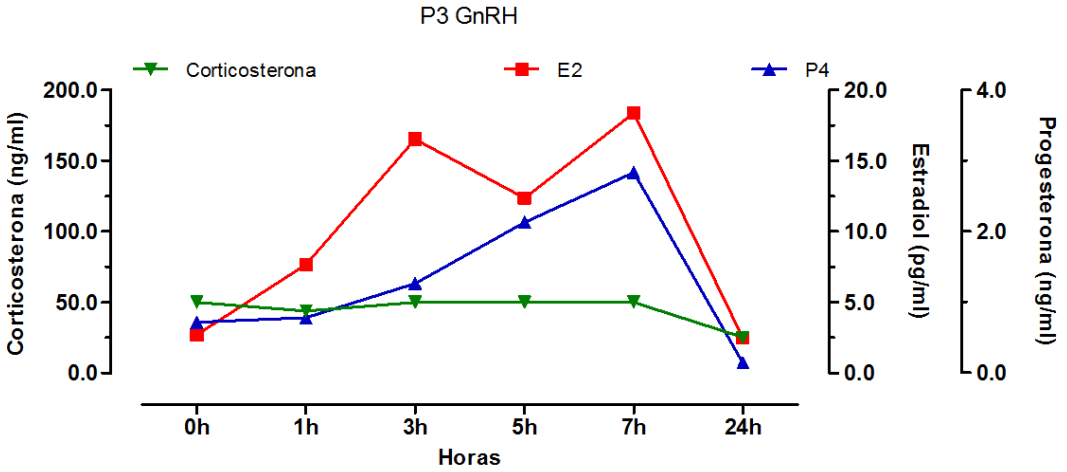


Gráfico 10 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P4 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

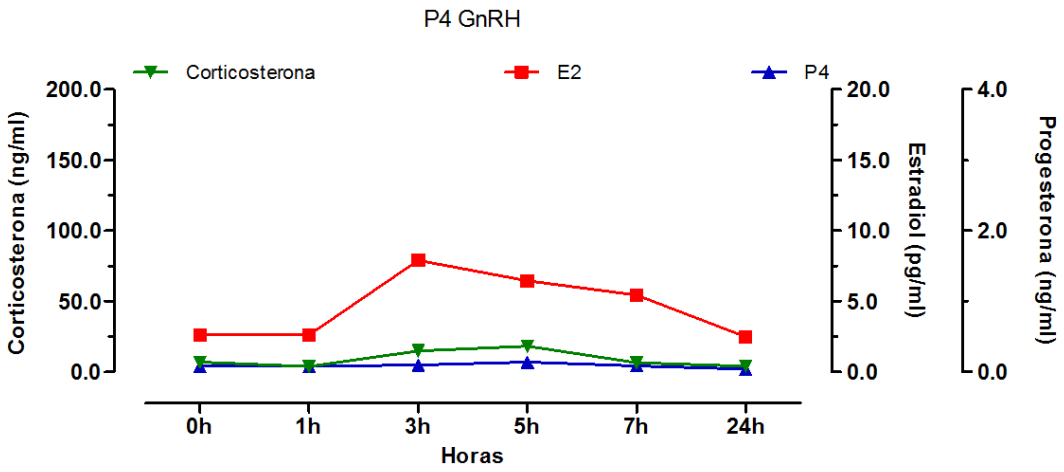


Gráfico 11 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P5 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012

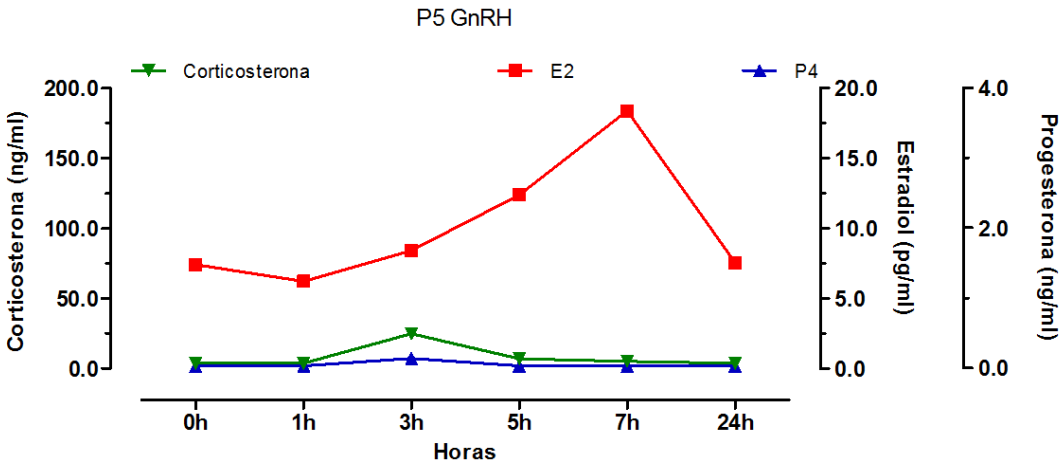
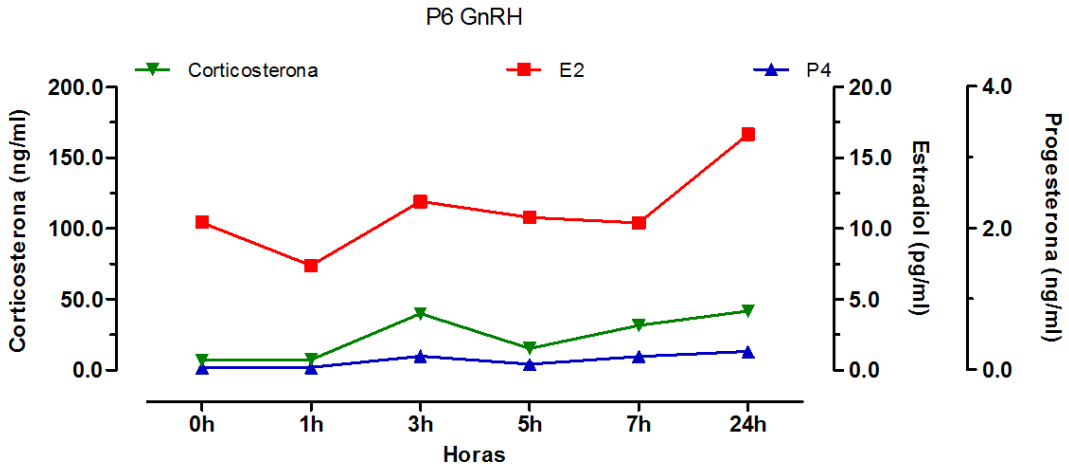


Gráfico 12 – Concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona encontrados na fêmea P6 no desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012



A tabela 4 apresenta a média e o desvio padrão para as concentrações séricas de corticosterona, progesterona e estradiol ao longo do tempo no desafio de GnRH.

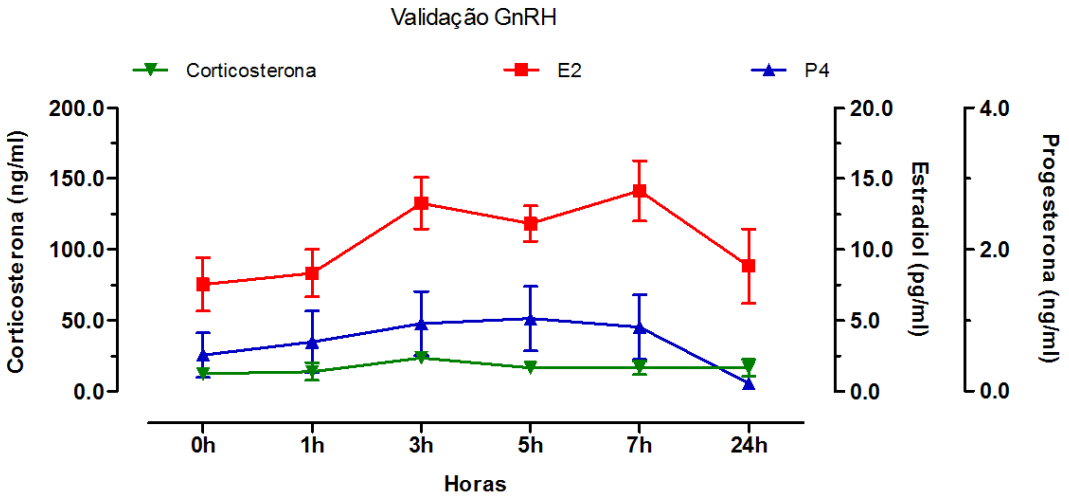
Tabela 4 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de corticosterona, progesterona e estradiol de todas as fêmeas (n = 6) durante os tempos de coleta do desafio de GnRH – São Paulo/SP – 2012

	0h	1h	3h	5h	7h	24h
Corticosterona (ng/ml)	12,58±10,37[a]	14,03±15,18[a]	23,62±9,77[a]	16,55±6,86[a]	16,52±11,69[a]	16,65±14,55[a]
Progesterona (ng/ml)	0,51±0,77[ab]	0,70±1,06[ab]	0,96±1,11[a]	1,03±1,11[a]	0,91±1,12[ab]	0,12±0,09[b]
Estradiol (pg/ml)	7,55±4,59[a]	8,35±4,09[ac]	13,27±4,44[ac]	11,84±3,08[ac]	14,15±5,19[bc]	8,84±6,45[ac]

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$)

O gráfico 13 apresenta as médias da concentração de estradiol, progesterona e corticosterona de todas as fêmeas submetidas ao desafio de GnRH ao longo do tempo.

Gráfico 13 – Média das concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona do grupo de fêmeas (n = 6) submetidas ao desafio de GnRH para validação fisiológica – São Paulo/SP – 2012



A tabela 5 apresenta a categoria comportamental e a avaliação ultrassonográfica do ovário das fêmeas no dia seguinte (tempo 24h) ao desafio de GnRH.

Tabela 5 – Resultados dos exames ultrassonográficos de ovário e o comportamento reprodutivo apresentado pelas fêmeas de avestruzes no desafio de GnRH no tempo 24h – São Paulo/SP – 2012

ANIMAL	EXAME ULTRASSOM		COMPORTAMENTO
	Ovário	Tamanho > folículo	Categoria
P1	bem desenvolvido	84,2mm	CBX
P2	bem desenvolvido	83,5mm*	SC
P3	pouco desenvolvido	68,7mm	SC
P4	pouco desenvolvido	46,4mm	SC
P5	não desenvolvido	-	SC
P6	não desenvolvido	-	SC

Legenda: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto;
* presença de ovo em desenvolvimento no oviduto

Analisando a tabela 4 e o gráfico 13 com os resultados consolidados de todo o grupo, nota-se que não foi possível caracterizar um pico de progesterona.

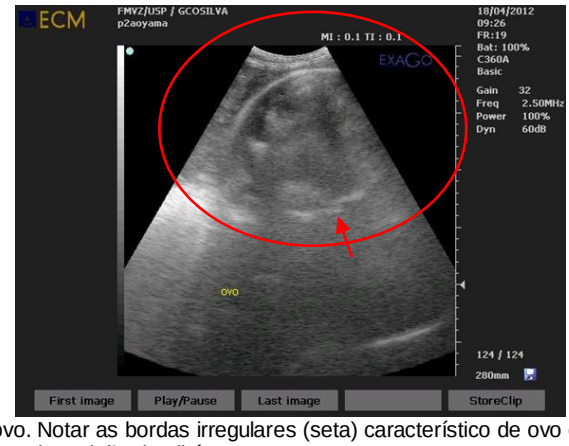
Ao verificar os resultados dos exames ultrassonográficos apresentados na tabela 5, percebe-se que as fêmeas estudadas se apresentavam com diferentes *status* reprodutivos no momento da aplicação do desafio de GnRH. Sendo assim, uma análise mais detalhada de cada fêmea tornou-se necessária.

As fêmeas P1 e P3 (Gráficos 7 e 9) apresentaram um perfil hormonal semelhante, com aumento gradativo da concentração sérica de progesterona até o momento 7h seguido de queda. No caso da fêmea P1, o ovário apresentava-se bem desenvolvido, com o maior folículo ovariano medindo 84,2mm no exame de ultrassom. Na fêmea P3, o ovário estava pouco desenvolvido com folículo maior medindo 68,7mm (Tabela 5).

A fêmea P2 (Gráfico 8) apresentou elevada concentração sérica de progesterona nos momentos 0h, 1h, 3h e 5h, com seus valores decaindo no momento 7h. De acordo com a tabela 5, esta fêmea apresentou folículo maior medindo 83,5mm e ovo em formação no oviduto no momento 24h. Uma hipótese a ser considerada neste caso seria que a aplicação do GnRH teria promovido um aumento da produção de progesterona pelo folículo pré-ovulatório nos tempos 1 e 3h, antecipando o pico de progesterona nesta fêmea para o momento 5h, o que explicaria a a acentuada queda no momento 7h quando comparado com as concentrações de progesterona verificadas nos mesmos momentos nas fêmeas P1 e P3.

Sendo assim, a ovulação relacionada ao ovo em formação observado na fêmea P2, teria ocorrido 5h após o pico de progesterona observado (5h). De acordo com os tempos de trânsito do ovo no oviduto do avestruz descrito por Bronneberg et al. (2007b), o ovo em formação observado no exame estaria na glândula da casca a aproximadamente 5h, tempo este compatível com o grau de desenvolvimento do ovo verificado no ultrassom (Figura 6).

Figura 6 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P2 demonstrando a presença de ovo em desenvolvimento em fase inicial durante a realização do exame de ultrassom no tempo 24h do desafio de ACTH – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O círculo indica o ovo. Notar as bordas irregulares (seta) característico de ovo em fase inicial de formação; A ecogenicidade irregular indica a deposição de albúmen.

A fêmea P4 (Gráfico 11) possuía ovário pouco desenvolvido (46,4mm), e as fêmeas P5 e P6 (Gráficos 12 e 13) não apresentavam desenvolvimento ovariano. Nestes animais, as concentrações de progesterona permaneceram baixas e bem próximas ao limite de detecção do ensaio em todos os momentos analisados, caracterizando ausência de resposta ao desafio de GnRH. Neste caso, possivelmente os folículos ovarianos presentes, por serem pouco desenvolvidos não teriam respondido ao desafio.

Através da comparação dos dados das fêmeas P1 e P3 com os dados das demais fêmeas, sugere-se que uma fêmea apresentando folículos ovarianos com medida a partir de 68,7mm já seja capaz de responder a uma aplicação de GnRH, provocando uma liberação de progesterona pelos folículos ovarianos.

Portanto, percebe-se claramente que em diferentes estágios de desenvolvimento ovariano ocorreram diferentes respostas. No entanto, utilizando-se a fórmula [MÉDIA + (2xDP)] para caracterizar a ocorrência de picos progesterona em cada indivíduo, não foi possível demonstrar a existência destes em nenhuma das fêmeas. Desta forma, não foi possível considerar validado fisiologicamente o ensaio para este hormônio.

Analisando os resultados consolidados das concentrações de estradiol (Tabela 4) observa-se um aumento dos seus níveis a partir do momento 1h, alcançando sua maior concentração no momento 7h, sendo este significativamente

maior que o tempo 0h. Este resultado sugere a existência de um efeito positivo da estimulação por GnRH nas concentrações de estradiol, validando fisiologicamente o ensaio.

Com relação à concentração sérica média de corticosterona ao longo do tempo não foi verificada diferença estatística entre os momentos do desafio de GnRH ($P > 0,05$), o que era esperado.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PRIMEIRA FASE

A primeira fase do estudo totalizou 10 semanas de duração. Durante este período, foram realizadas 30 coletas de sangue e avaliações do comportamento reprodutivo de cada fêmea, gerando um total de 300 amostras de soro sanguíneo que foram analisadas para a verificação das concentrações séricas de estradiol e progesterona. Neste período, também foram realizados 4 exames ultrassonográficos de ovário de cada fêmea.

Os resultados desta fase serão apresentados e discutidos, primeiramente, de forma individual e posteriormente serão apresentados e discutidos os resultados consolidados.

5.3.1 Resultados individuais da primeira fase

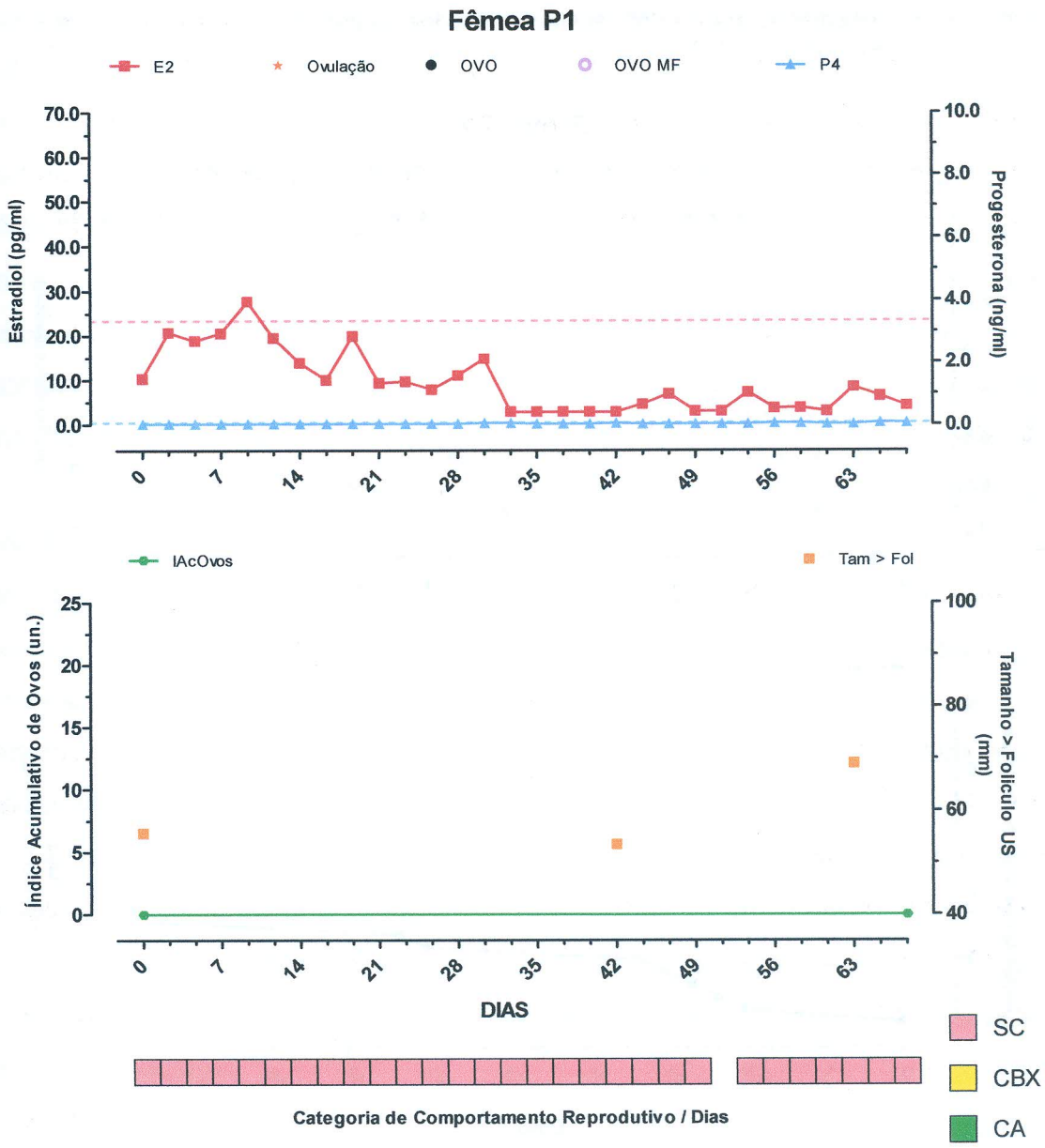
Através da compilação dos resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura para esta fase, foi elaborada uma representação gráfica para cada fêmea estudada. Esta representação facilitou a avaliação e a discussão dos resultados individuais, ao apresentar todos os dados obtidos de maneira sintética e simples.

O gráfico 14 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P1.

Avaliando-se os dados desta fêmea, percebe-se que esta fêmea não produziu ovos durante esta fase. Analisando-se as concentrações de estradiol, verificou-se a existência de apenas um pico, sendo que as concentrações de progesterona se mantiveram próximas do limite de detecção do ensaio durante todo o período. Nos exames ultrassonográficos realizados foram verificados apenas a existência de folículos pequenos e pouco desenvolvidos. Também não houve demonstração de comportamento reprodutivo e não realizou postura em toda esta fase.

Analisando em conjunto estes resultados, observa-se que a fêmea P1 é representativa de uma condição não reprodutiva.

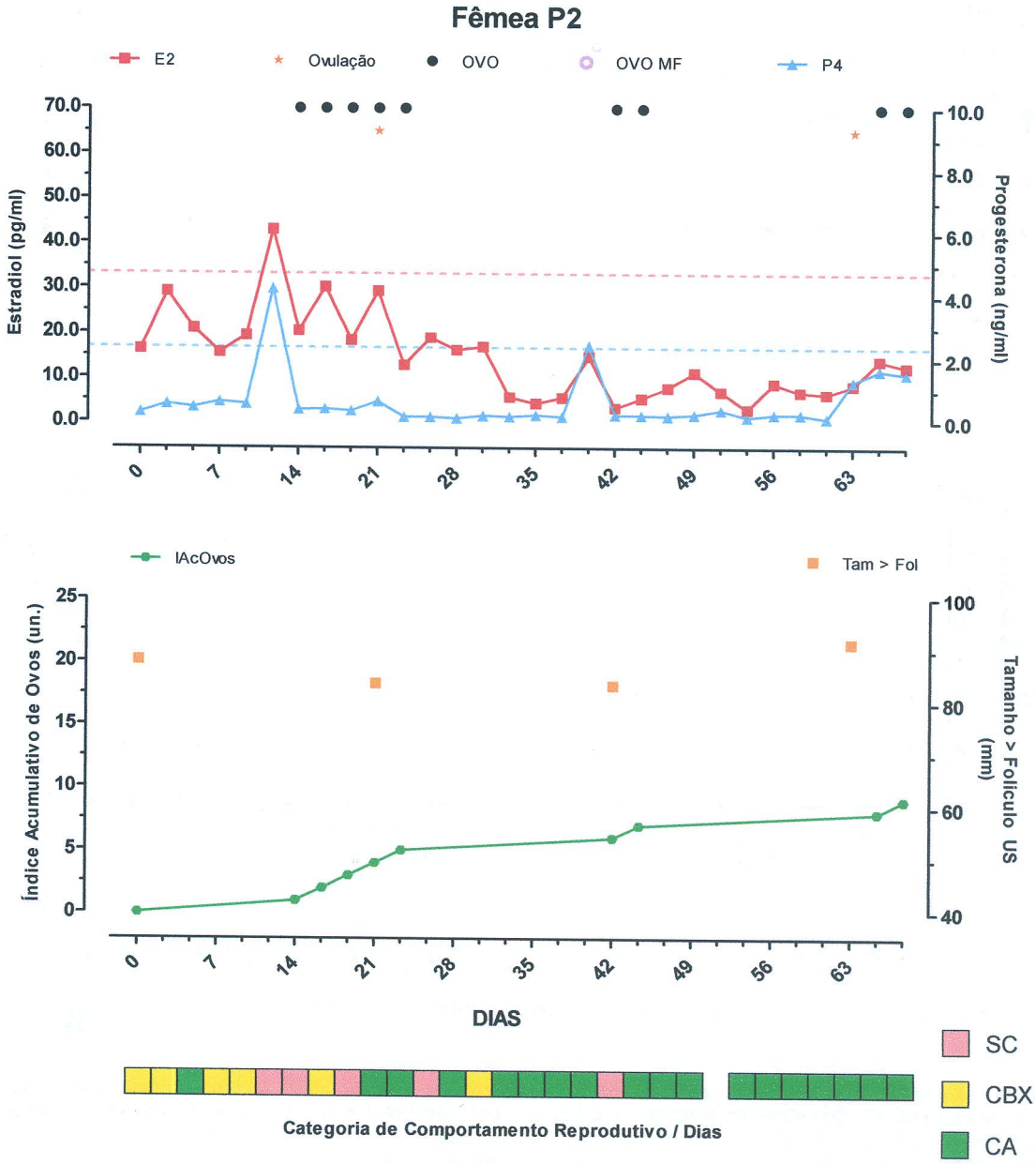
Gráfico 14 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P1 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O gráfico 15 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P2.

Gráfico 15 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P2 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

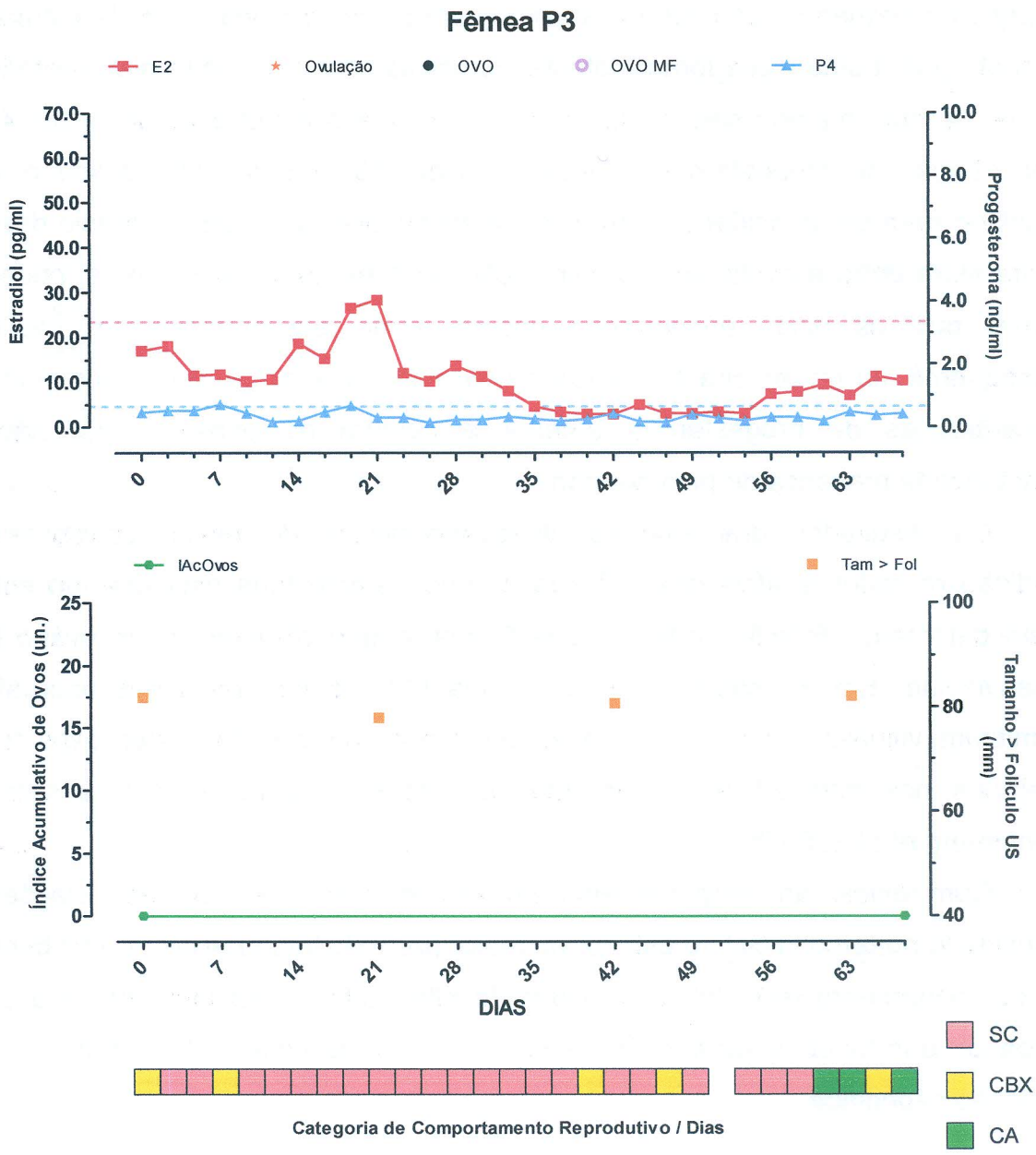
A fêmea P2 produziu 9 ovos durante esta fase do estudo. Analisando os perfis das concentrações hormonais, constatou-se que anteriormente ao início da postura da primeira sequência de ovos (5) aconteceram picos concomitantes de estradiol e progesterona. Estes picos foram detectados no dia 11 e o primeiro ovo coletado foi no dia 14. Na segunda sequência de ovos (2), que ocorreu a partir do dia 42, a concentração de progesterona verificada no dia 39 também ultrapassou o valor calculado para ser considerado um pico. Se considerarmos o tempo médio descrito na literatura entre a ovulação e a oviposição no avestruz é de 48 horas, podemos afirmar que os picos encontrados podem estar relacionados com ovulação subsequente. Já na terceira sequência de ovos (2), apesar do visível aumento nas concentrações de progesterona anterior a postura do primeiro ovo, não foi caracterizada presença de pico hormonal.

Os resultados dos exames ultrassonográficos do ovário corroboram a condição reprodutiva ativa desta fêmea, já que durante toda esta fase do estudo foram detectados folículos maiores que 80mm, o que caracteriza um ovário bem desenvolvido. Em 2 ocasiões (dia 21 e dia 63), os exames ultrassonográficos permitiram visualizar ovo em formação no interior do oviduto. Estes ovos foram coletados nos dias 23 e 65, no intervalo esperado para a postura segundo Bronneberg et al. (2007b).

Com relação ao comportamento reprodutivo, apesar de algumas variações na intensidade no terço inicial do estudo, na maior parte do tempo avaliado se observou um comportamento reprodutivo considerado alto. Esta fêmea também foi a única fêmea em que foi observada a cópula, embora não fosse objeto deste trabalho esta avaliação específica.

O gráfico 16 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P3.

Gráfico 16 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P3 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

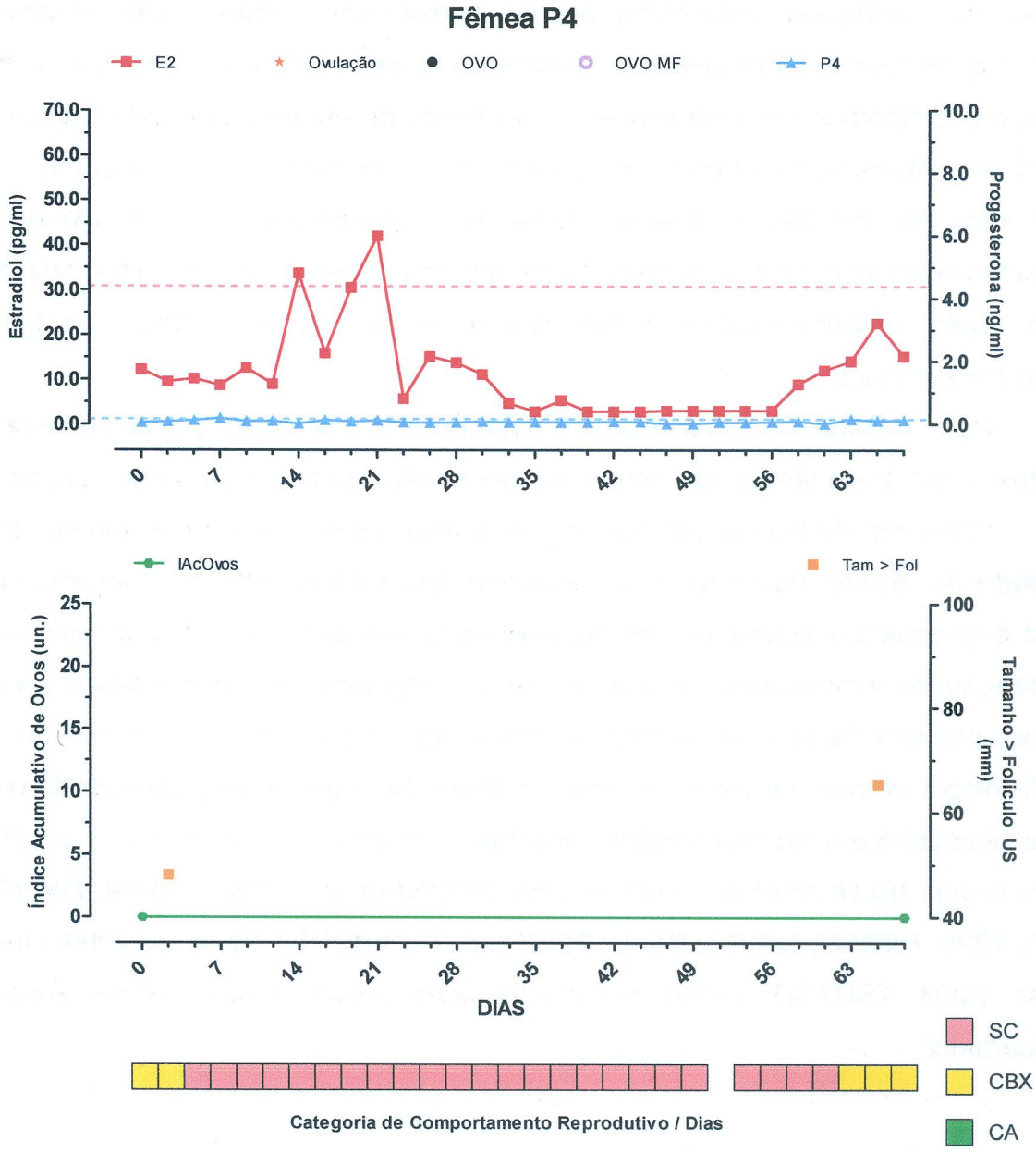
A partir dos resultados da fêmea P3 verificou-se que esta fêmea possuía uma boa condição ovariana, com folículos ovarianos com diâmetro em torno de 80mm em todas as avaliações ultrassonográficas. Apesar disto, não foram observadas posturas de ovos em todo período. Analisando-se os resultados hormonais verificou-se que ocorreram 2 picos na concentração sérica de estradiol com intervalo de 48h (dias 18 e 21) coincidente com um dos dois picos observados nas concentrações de progesterona (dia 18). Ambos os picos de progesterona (dia 7 e 18) embora caracterizados como picos, apresentaram valores próximos aos basais e talvez por esta razão, embora existissem folículos desenvolvidos no ovário, não tenham induzido a ovulação.

Com relação ao comportamento reprodutivo, na maioria das observações (aprox. 75%) desta fêmea não houve demonstração de comportamento reprodutivo.

Estes resultados podem indicar que, apesar da fêmea mostrar aptidão para a reprodução, existe algum fator não avaliado que está contribuindo negativamente para esta situação. Uma possível causa é o excesso de manejo dos animais para a realização do experimento, já que os animais não estavam acostumados a serem manejados com frequência, levando a uma inibição da postura e consequentemente da fisiologia normal da ave pelo estresse. Outro fator que pode estar relacionado a esta situação é a ação de hormônios inibitórios, como a Inibina (YANG et al., 2005), a Prolactina (BLUHM et al., 1983; EL HALAWANI et al., 1995; SHARP; DAWSON; LEA, 1998; REDDY; DAVID; RAJU, 2007) e o GnIH (BENTLEY et al., 2006; UBUKA et al., 2008; TSUTSUI, 2009). O fator variação individual também não pode ser descartado.

O gráfico 17 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P4.

Gráfico 17 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P4 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

Durante o período estudado a fêmea P4 não apresentou qualquer comportamento reprodutivo em aproximadamente 75% do tempo observado. Analisando os perfis das concentrações séricas de estradiol percebe-se a ocorrência de 2 picos (dias 14 e 21). As concentrações de progesterona se mantiveram baixas e próximas ao limiar de detecção dos ensaios, não sendo possível caracterizar a ocorrência de picos.

No exame ultrassonográfico, apesar de ser sido detectado um folículo bem pequeno (48,1mm) no primeiro exame, no segundo e no terceiro exames (realizados nos dias 23 e 44), não foram detectados quaisquer folículos ovarianos. Somente no quarto exame da fase (dia 65) foi observado um folículo medindo 65,4mm.

Concomitante ao aparecimento deste último folículo foi possível verificar um aumento progressivo na concentração sérica de estradiol, embora dentro dos valores considerados basais e, neste mesmo período, a fêmea passou a apresentar comportamento reprodutivo baixo. Estes resultados podem indicar que esta fêmea estaria próxima de iniciar atividade reprodutiva no período que se seguiu.

Durante todo o período de acompanhamento não foram encontrados ovos.

O gráfico 18 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P8.

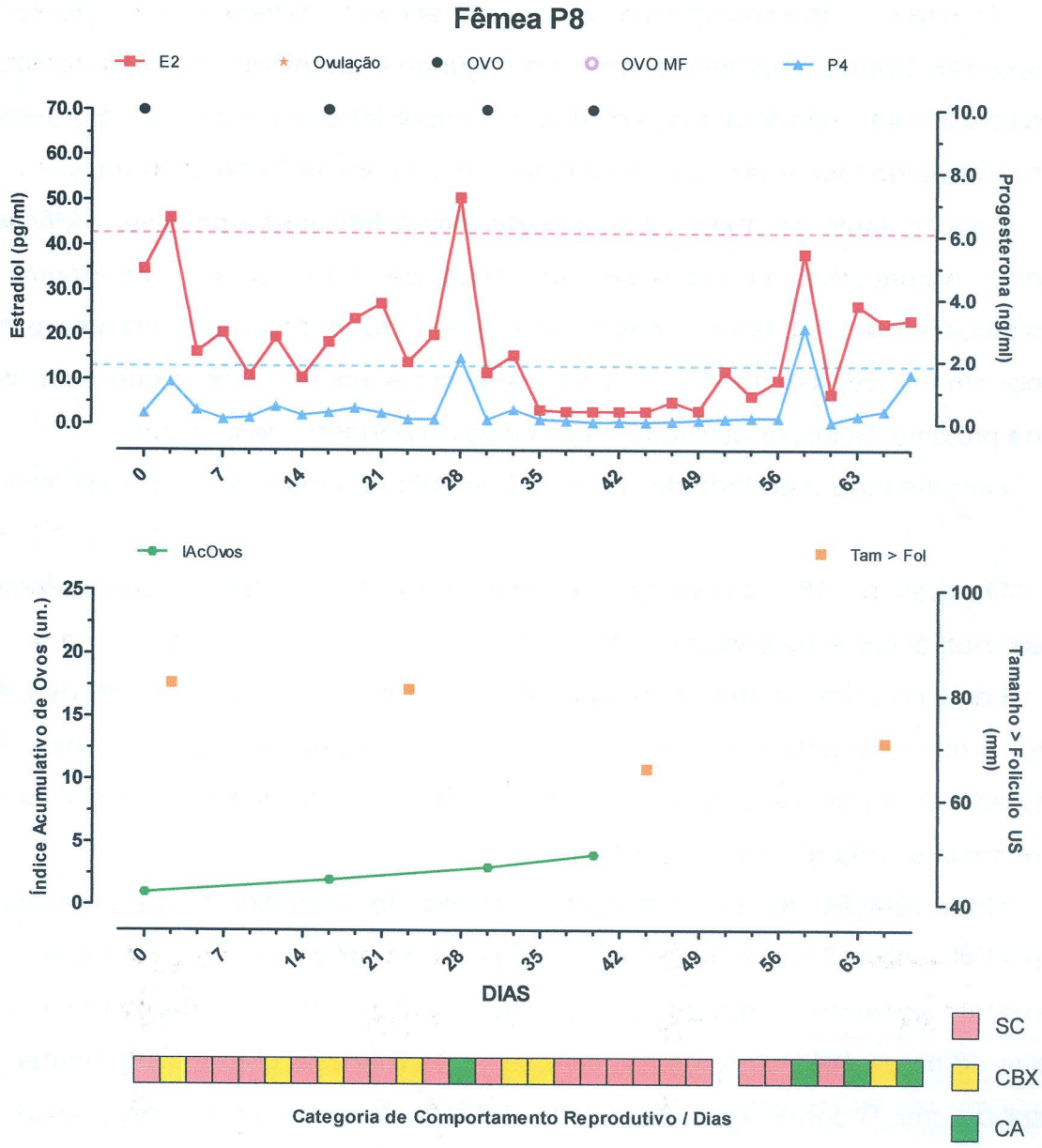
Logo no primeiro dia de coletas já foi observada a coleta de um ovo desta fêmea, o que se repetiu nos dias 16, 30 e 39. Em relação à postura de ovos, não foi observado uma postura sequencial, o que poderia indicar que o manejo excessivo dos animais estaria afetando a postura.

Com relação às concentrações séricas de estradiol e progesterona foi possível visualizar 2 picos de estradiol e 2 picos de progesterona sendo que ambos coincidiram somente no dia 28. É interessante notar o encontro de ovo (dia 30) no piquete 48 horas após os picos coincidentes, intervalo este considerado normal para a espécie por Bronneberg (2007b). No entanto, foram encontrados 2 ovos sem relação temporal com nenhum pico detectado. Isto pode dever-se ao fato de que como as mensurações hormonais são feitas a partir do soro, os picos relacionados a estes ovos ocorreram nos intervalos entre as coletas de sangue.

No dia do primeiro pico de estradiol (dia 2) houve também um aumento da concentração de progesterona sendo que esta não alcançou o limite calculado para caracterizar um pico. Neste dia, apesar do ovário apresentar-se bem desenvolvido

com folículo ovariano medindo 82,4mm (Figura 7A) não ocorreu ovulação e uma consequente postura de ovo. Provavelmente este fato deveu-se às concentrações insuficientes de progesterona naquele momento.

Gráfico 18 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P8 – São Paulo/SP – 2012



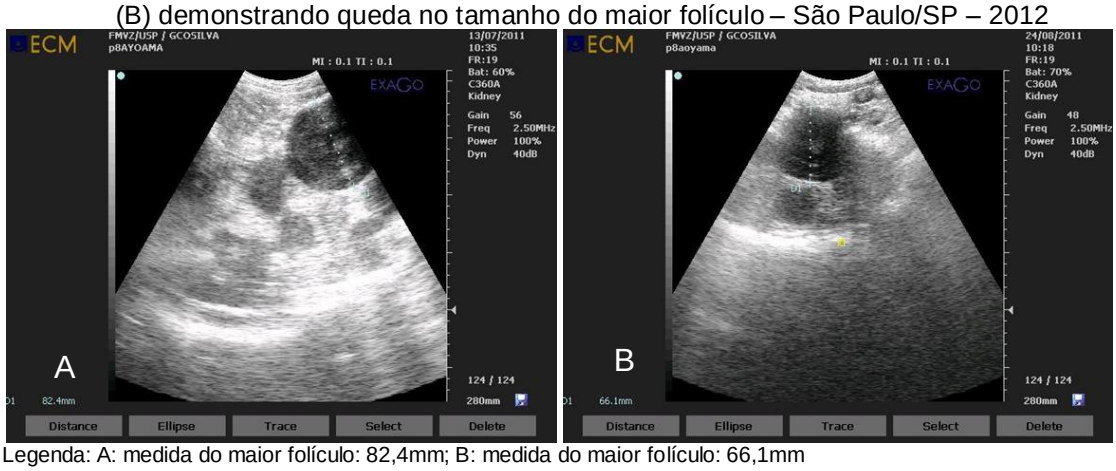
Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O segundo pico de progesterona ocorreu no dia 58, quando houve concomitante aumento da concentração de estradiol, sem caracterizar pico. Não houve postura de ovo relacionada a este pico de progesterona, talvez devido a um menor tamanho de folículo ovariano observado no exame ultrassonográfico. Após a postura do 4º e último ovo produzido por esta fêmea, verificou-se nos exames ultrassonográficos uma diminuição do desenvolvimento ovariano. No dia 44 (5 dias após a postura do último ovo) o maior folículo visualizado media 66,1mm (Figura 7B). No último exame, dia 65, ocorreu uma pequena melhora no desenvolvimento ovariano com a presença de folículo medindo 71mm.

No período entre os dias 35 e 49 as concentrações de ambos os hormônios baixaram para valores próximos do limite de detecção do ensaio. Este fato pode ter ocorrido em função de uma possível fase refratária do ovário ou a uma regressão fisiológica em resposta a uma secreção aumentada de hormônios inibitórios, como a Inibina (YANG et al., 2005), a Prolactina (BLUHM et al., 1983; EL HALAWANI et al., 1995; SHARP; DAWSON; LEA, 1998; REDDY; DAVID; RAJU, 2007) e o GnIH (BENTLEY et al., 2006; UBUKA et al., 2008; TSUTSUI, 2009).

É interessante notar que quando ocorreram os 3 aumentos ou picos de ambos os hormônios a fêmea apresentou algum grau de comportamento reprodutivo, sugerindo uma possível relação entre estes esteroides sexuais e a modulação do comportamento reprodutivo.

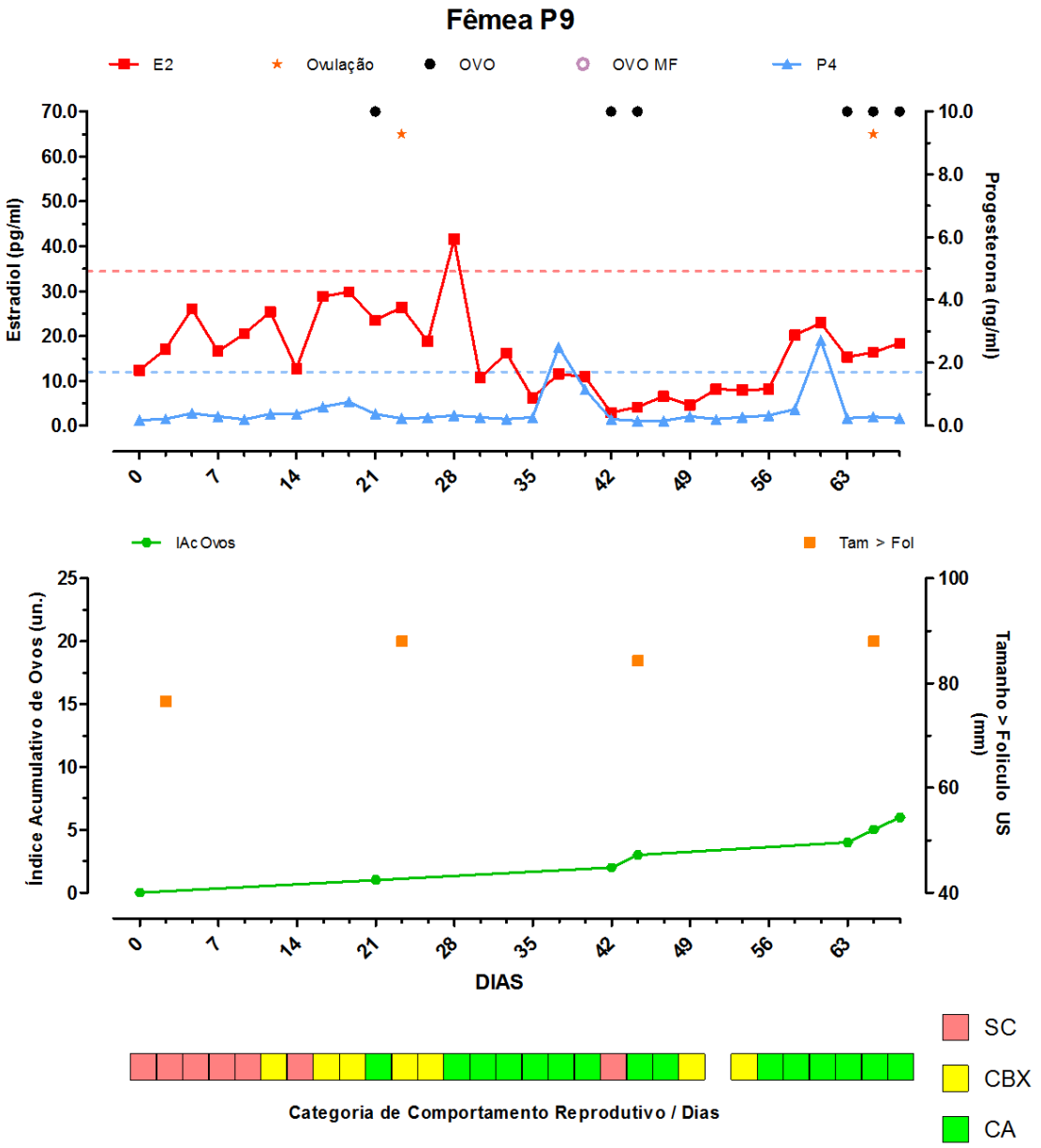
Figura 7 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P8 no exame do dia 2 (A) e no dia 44 (B) demonstrando queda no tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: medida do maior folículo: 82,4mm; B: medida do maior folículo: 66,1mm

O gráfico 19 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P9.

Gráfico 19 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P9 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O ovário da fêmea P9 apresentou-se bem desenvolvido desde o início do estudo. Com o decorrer das coletas, foi verificada a postura do primeiro ovo no dia 21. Os demais ovos foram coletados nos dias 42, 44, 63, 65 e 67.

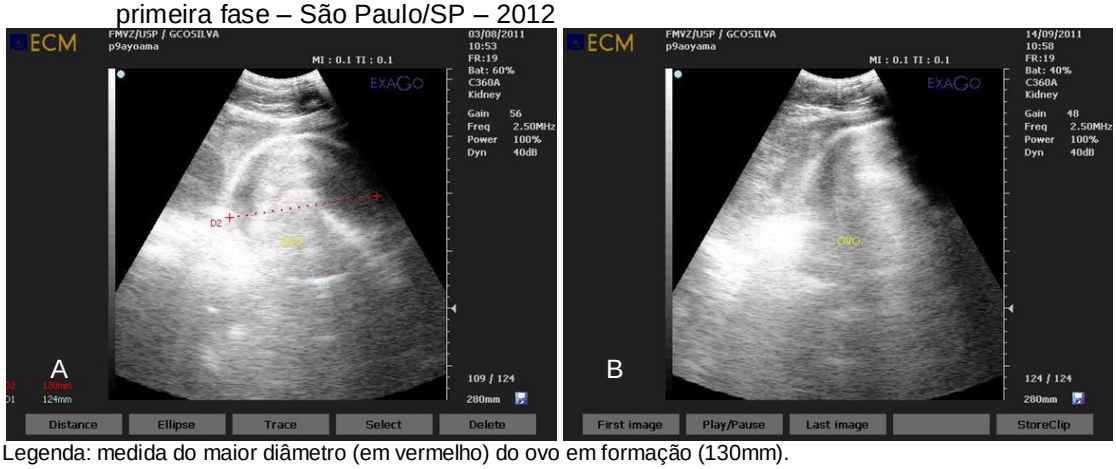
No dia 28 ocorreu um pico na concentração de estradiol e a partir desta data a fêmea passou a apresentar um comportamento reprodutivo mais intenso, com exceção do dia 42 em que ocorreu uma postura de ovo.

Foram caracterizados dois picos de concentração de progesterona (dias 37 e 60) que coincidiram com aumentos das concentrações de estradiol, porém não caracterizados como picos. No entanto, somente após 96h do pico de progesterona do dia 37 e 72h do pico do dia 60 foram coletados ovos. Sendo assim, não se pode afirmar que estes picos estejam relacionados à postura destes ovos.

O exame ultrassonográfico do dia 23 revelou a presença de folículo bem desenvolvido (88mm) e de um ovo em formação no interior do oviduto (Figura 8A). Apesar disto não foi verificada a postura deste ovo e também não foram visualizados restos de ovos no piquete. Neste caso, não se pode descartar falhas na observação de postura ou anotação dos dados nas planilhas, em decorrência do manejo da propriedade.

No dia 65 foi realizado exame ultrassonográfico do ovário quando foi verificada a presença de um ovo em formação no interior do oviduto (Figura 7B). Este ovo, provavelmente, foi o coletado no dia 67.

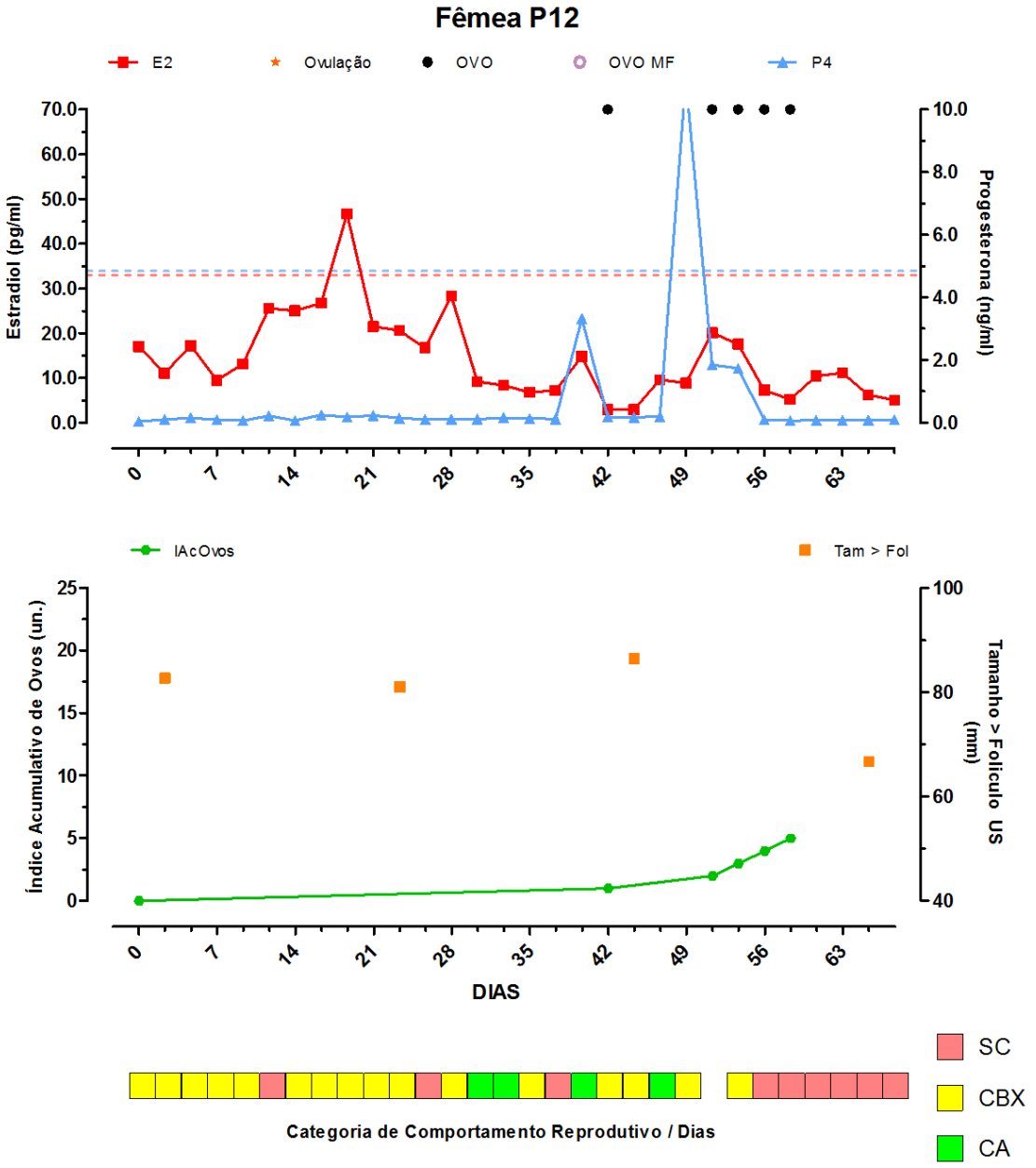
Figura 8 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P9 demonstrando a presença de ovo em desenvolvimento durante a realização do exame no dia 23 (A) e no dia 65 (B) da primeira fase – São Paulo/SP – 2012



Legenda: medida do maior diâmetro (em vermelho) do ovo em formação (130mm).

O gráfico 20 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P12.

Gráfico 20 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P12 – São Paulo/SP – 2012



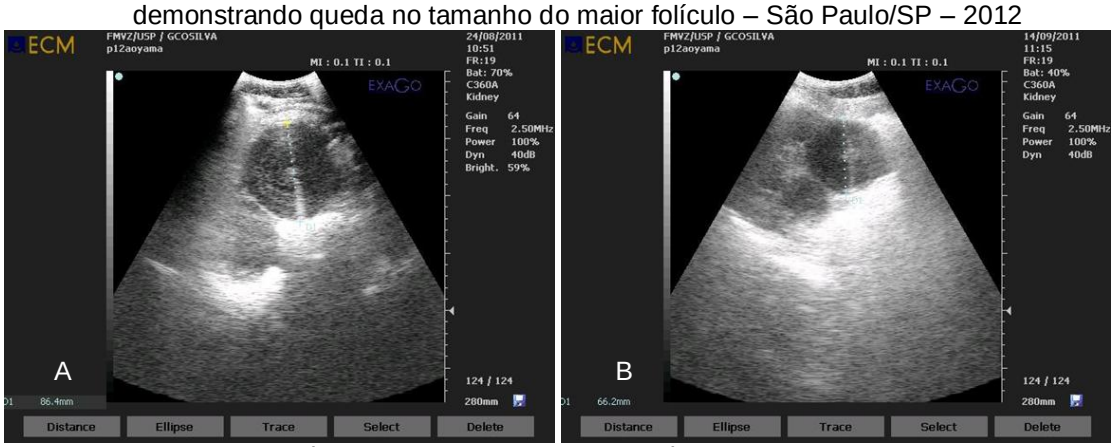
Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

Analisando os resultados da fêmea P12, nota-se a existência de um pico nas concentrações de estradiol no dia 18 acompanhado de valores basais nas concentrações de progesterona. No dia 49, após a ocorrência de um marcado pico de progesterona (o maior da primeira fase: 10,92ng/ml) acompanhado por aumento na concentração de estradiol, sem caracterizar pico, foi coletada uma sequência de ovos nos dias 51, 53, 56 e 58. A primeira postura pode ser considerada oriunda deste pico já que ela ocorreu 48h após o mesmo. As demais posturas poderiam estar relacionadas a picos não detectados em função do intervalo de coletas de sangue.

O comportamento reprodutivo foi observado em algum grau do início do período estudado até o dia 51 (postura do primeiro ovo da sequência), quando este comportamento desapareceu por completo, acompanhando a queda das concentrações hormonais. Estas quedas podem estar relacionadas a ação de hormônios inibitórios como a Prolactina (BLUHM et al., 1983; EL HALAWANI et al., 1995; SHARP; DAWSON; LEA, 1998; REDDY; DAVID; RAJU, 2007) e o GnIH (BENTLEY et al., 2006; UBUKA et al., 2008; TSUTSUI, 2009).

O exame ultrassonográfico do ovário realizado no dia 65 (Figura 9), o primeiro após a postura sequencial, revelou uma redução do desenvolvimento folicular, coincidente com a queda da concentração hormonal e o desaparecimento do comportamento reprodutivo. Estes resultados mais uma vez sugerem a existência de uma relação entre o aspecto ovariano, as concentrações hormonais e a modulação do comportamento reprodutivo.

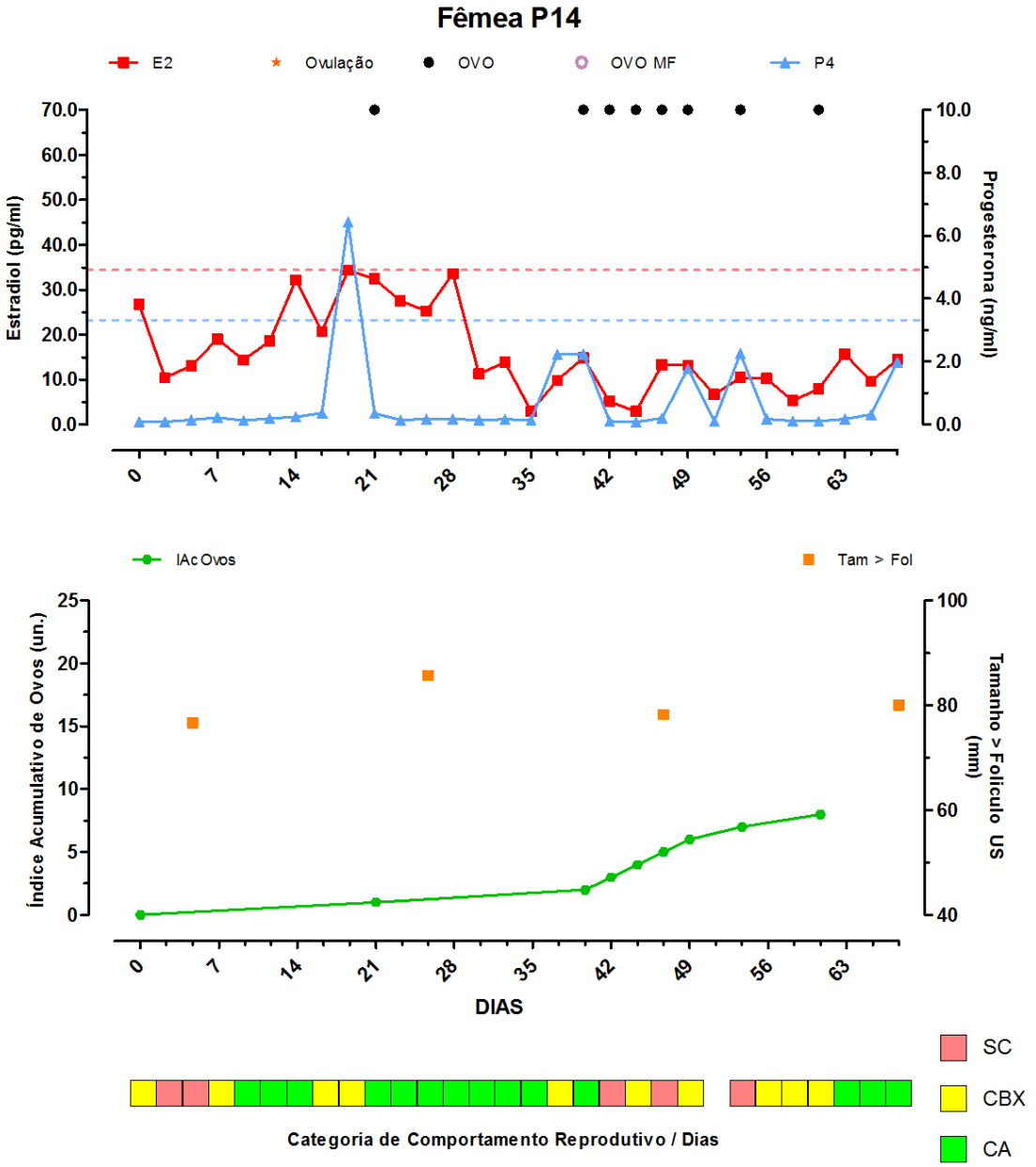
Figura 9 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P12 no dia 44 (A) e no dia 65 (B) demonstrando queda no tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: medida do maior folículo: 86,4mm; B: medida do maior folículo: 66,2mm.

O gráfico 21 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P14.

Gráfico 21 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P14 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

Os resultados da fêmea P14 revelaram a presença de um pico de progesterona no dia 18 coincidente com um aumento da concentração sérica de estradiol, não caracterizada como pico. Ocorreu postura de um ovo 72 horas após este pico de progesterona. Nos dias 39, 49 e 53 ocorreram aumentos coincidentes das concentrações de progesterona e estradiol sendo que em nenhum deles foi possível caracterizar a presença de picos. No entanto, no período em que ocorreram estes aumentos foram coletados 6 ovos (dias 39, 42, 44, 46, 49 e 53), caracterizando esta fêmea como reprodutivamente ativa.

As observações comportamentais revelaram uma alta prevalência de comportamento reprodutivo em algum grau. Durante a sequência de posturas, este reduziu sua intensidade.

Na análise ultrassonográfica foi verificada a presença de folículos desenvolvidos em todos os exames realizados, com o tamanho do maior folículo variando entre 76,7 e 85,7mm (Figura 10)

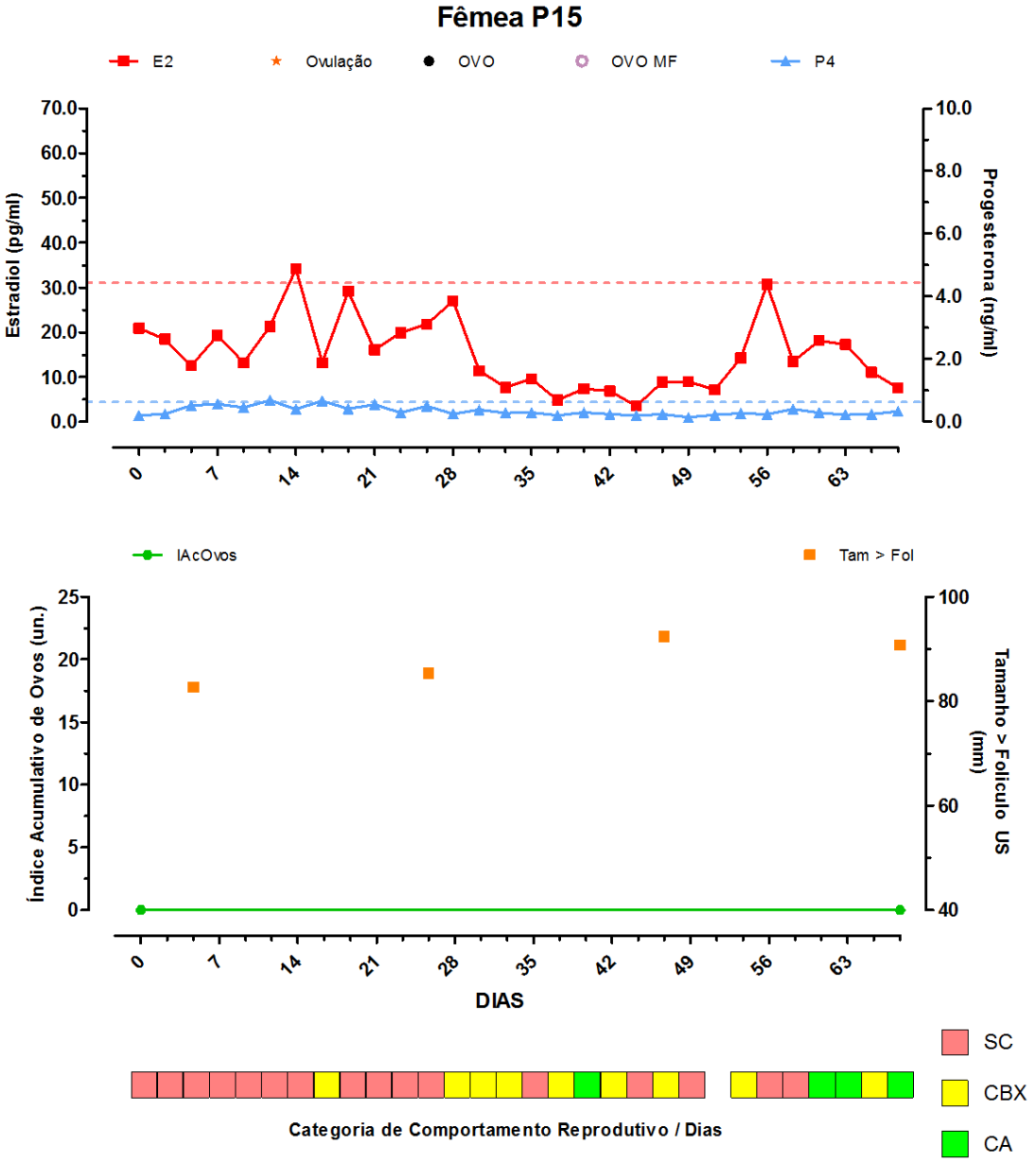
Considerando-se os resultados em conjunto pode-se caracterizar esta fêmea como ativa reprodutivamente.

Figura 10 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P14 no dia 4 (A) e no dia 67 (B) demonstrando o tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012

Legenda: A: medida do maior folículo: 76,7mm; B: medida do maior folículo: 80,0mm.

O gráfico 22 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P15.

Gráfico 22 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P15 – São Paulo/SP – 2012



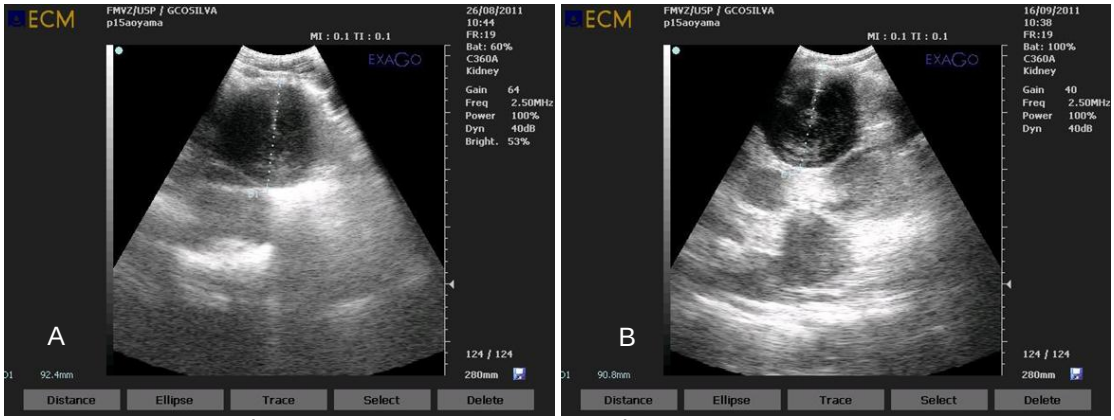
Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

No gráfico 22 da fêmea P15, nota-se que as concentrações de progesterona mensuradas permaneceram próximas ao limiar de detecção do ensaio durante todo o período estudado. Com relação ao estradiol, foi caracterizado um pico no dia 14

não ocorrendo postura de ovo ou variação do grau de comportamento apresentado pela fêmea.

O exame ultrassonográfico do ovário desta fêmea (Figura 11) revelou folículos desenvolvidos em todas as avaliações realizadas, sendo que nos dias 46 e 67 foram observados os maiores folículos medidos entre todos os animais desta fase (92,4mm e 90,8mm).

Figura 11 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P15 no dia 46 (A) e no dia 67 (B) demonstrando a presença dos maiores folículos observados nesta fase do estudo – São Paulo/SP – 2012



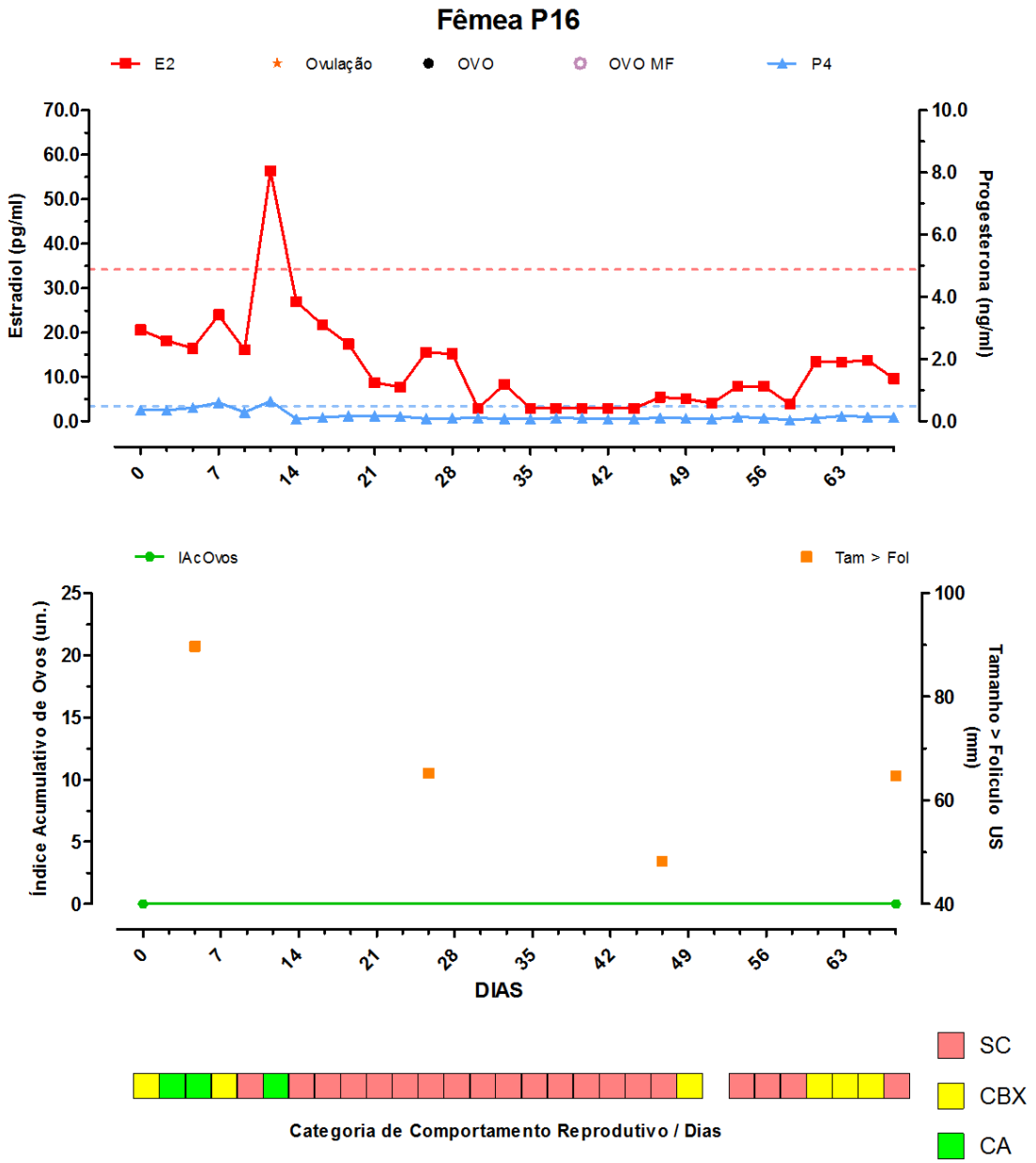
Legenda: A: medida do folículo: 92,4mm e B: medida do maior folículo: 90,8mm

Na análise comportamental, em 50% das observações a fêmea P15 não apresentou qualquer comportamento reprodutivo e em apenas 12% das observações foi registrado comportamento reprodutivo alto.

Considerando os resultados obtidos, verificou-se que apesar desta fêmea apresentar ovário desenvolvido, ela encontrava-se em inatividade reprodutiva, uma vez que não demonstrava comportamento reprodutivo na maior parte do tempo e mantinha concentrações hormonais basais. Possivelmente as baixas concentrações de progesterona estejam relacionadas com a não ovulação dos folículos, mesmo na presença de elevações nas concentrações de estradiol. Neste caso, pode-se sugerir fortemente a existência de fatores inibitórios, como estresse de manejo e a ação de hormônios inibitórios, como a Inibina, a Prolactina e o GnIH.

O gráfico 23 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P16.

Gráfico 23 – Representação gráfica dos resultados obtidos na primeira fase para a fêmea P16 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

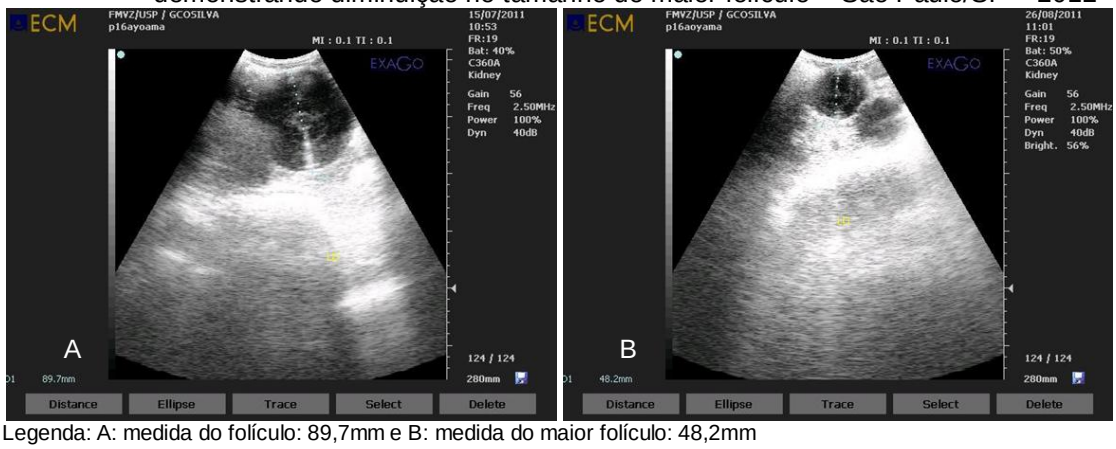
A análise das concentrações hormonais da fêmea P16 revelou a existência de um pico de estradiol no dia 11, concomitante com um pico de progesterona, sendo este último muito baixo e próximo aos valores basais. No restante do período estudado ambos os hormônios se mantiveram em concentrações basais ou mesmo próximas ao limite de detecção do ensaio.

No período de elevação da concentração de estradiol em torno do único pico, foi observada a presença de comportamento reprodutivo em algum grau. No restante do período estudado, com a diminuição das concentrações hormonais, a maior parte do tempo a fêmea P16 não apresentou comportamento reprodutivo.

Durante todo o este período, não se observou postura.

No primeiro exame ultrassonográfico realizado (dia 4), o ovário apresentava-se bem desenvolvido, com folículo maior medindo 89,7mm (Figura 12A). Nos exames subsequentes, com a queda nas concentrações hormonais, observou-se uma marcada queda no desenvolvimento ovariano e no tamanho folicular, chegando a apresentar folículo com tamanho máximo de 48,2mm no dia 46 (Figura 12B). Esta diminuição marcada no desenvolvimento ovariano pode indicar uma regressão ovariana, possivelmente relacionada com a ação de fatores inibitórios, como o estresse e a ação de hormônios inibitórios.

Figura 12 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P16 no dia 6 (A) e no dia 46 (B) demonstrando diminuição no tamanho do maior folículo – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: medida do folículo: 89,7mm e B: medida do maior folículo: 48,2mm

5.3.2 Resultados consolidados da primeira fase

Nesta seção serão apresentados os dados meteorológicos, de postura e também os dados obtidos através da análise conjunta das variáveis estudadas.

5.3.2.1 Dados meteorológicos e de produção

Durante o período da primeira fase, somente no dia 31 de agosto (dia 51) não foi realizada a observação de comportamento devido à ocorrência de chuva intensa. Nos dias em que ocorreu chuva fraca ou houve alternância nas condições meteorológicas, as mesmas não afetaram a coleta de dados de comportamento reprodutivo ou a realização de exame ultrassonográfico programado.

O gráfico 24 apresenta a temperatura média, a precipitação pluviométrica e o fotoperíodo verificados para o ano de 2011 para a região da propriedade.

Foram coletados e organizados na tabela 6 os dados da produção de ovos da propriedade para o período anterior ao estudo (julho de 2010 a junho de 2011), na tabela 7 para o período da realização do estudo e na tabela 8 após o término do estudo até o dia 18 de abril de 2012, data da última visita à propriedade.

Gráfico 24 – Temperatura média, precipitação pluviométrica e duração do dia (fotoperíodo) verificados para região do estudo no ano de 2011 – São Paulo/SP – 2012

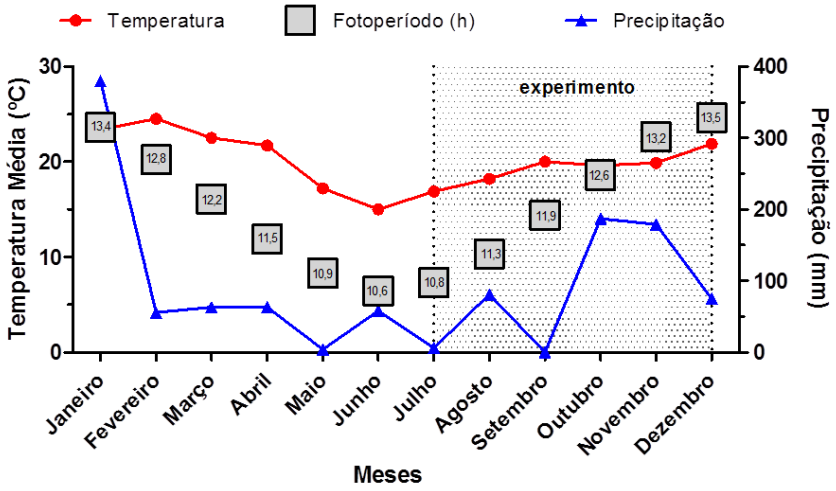


Tabela 6 – Dados de produção de ovos no *Sítio Aoyama* no período de julho de 2010 a junho de 2011 – São Paulo/SP – 2012

	POSTURAS – 2010					
	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Nº ovos	49	62	70	26	69	31
Nº animais	19	19	19	19	17	17
Ovos/animal	2,6	3,3	3,7	1,4	4,0	1,8
	POSTURAS – 2011					
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Maio	Jun.
Nº ovos	14	34	4	4	26	39
Nº animais	17	17	17	17	17	17
Ovos/animal	0,8	2,0	0,2	0,2	1,5	2,3

Tabela 7 – Dados de produção de ovos no *Sítio Aoyama* no período de julho de 2011 a dezembro de 2011 – São Paulo/SP – 2012

	POSTURAS – 2011					
	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Nº ovos	13	22	28	25	23	15
Nº animais	14	14	13	13	13	13
Ovos/animal	0,9	1,6	2,1	1,9	1,8	1,1

Tabela 8 – Dados de produção de ovos no *Sítio Aoyama* no período de janeiro de 2012 a abril de 2012 - São Paulo/SP – 2012

	POSTURAS – 2012					
	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.*	Maio	Jun.
Nº ovos	27	37	36	14	-	-
Nº animais	13	13	13	13	-	-
Ovos/animal	2,1	2,8	2,8	1,1		

* Dados até o dia 18 de abril de 2012.

Analisando a tabela 6, observou-se que a produção de ovos/animal aumenta a partir de julho/10 até alcançar o pico de produção em novembro/10. Em dezembro/10, já é observada uma queda na produção de ovos até os meses de março e abril de 2011, quando retornam a aumentar. Estas variações podem estar relacionadas a fatores ambientais como o fotoperíodo e a precipitação. Para corroborar esta suposição, foi analisada a possível existência de correlação entre os dados de produção de ovos, o fotoperíodo calculado e a precipitação observada para os meses de julho de 2010 a junho 2011. Através desta análise não se verificou nenhuma correlação significativa entre estas variáveis, descartando-se esta hipótese.

Comparando-se o período de julho a dezembro de 2011, meses em que ocorreu o estudo (Tabela 7) com os dados do mesmo período de 2010 (Tabela 6), verificou-se que houve queda na produção da propriedade, possivelmente devido ao intenso manejo realizado no experimento.

Após o término do período experimental, verificou-se uma melhora na produção de ovos (Tabela 8), mesmo sendo um período em que poderia ser esperada a diminuição da produção, de acordo com os dados de 2010. Isto pode ter acontecido devido a redução do estresse consequente ao fim do experimento, que resultou em uma melhor conjuntura neste período do que durante o experimento, desencadeando o processo de reprodução mesmo em um momento considerado não ideal para a reprodução. Esta observação pode reforçar a ideia de que os avestruzes podem ser considerados, também, reprodutores oportunistas como citado em alguns estudos na literatura (HICKS, 1992; BRONNENBERG, 2008).

5.3.2.2 Resultados comportamentais, hormonais e ultrassonográficos

Considerando-se os dados da observação do comportamento reprodutivo para esta fase, foi possível comparar as concentrações séricas de estradiol e progesterona entre as categorias do comportamento propostas na seção **4.2.3 Observação e avaliação do comportamento reprodutivo**. A tabela 9 apresenta os valores de média e desvio padrão do estradiol e da progesterona para cada categoria comportamental. Os gráficos 25 e 26 ilustram, respectivamente, a

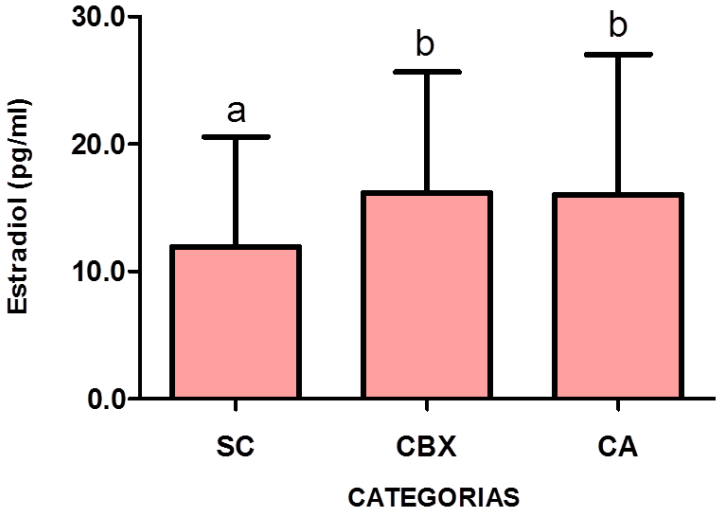
diferença das concentrações encontradas nas 3 categorias comportamentais estabelecidas.

Tabela 9 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol e progesterona durante a primeira fase nas 3 categorias comportamentais estabelecidas – São Paulo/SP – 2012

CATEGORIAS	ESTRADIOL (pg/ml)	PROGESTERONA (ng/ml)
SC (n = 154)	11,94 ± 8,65 [a]	0,22 ± 0,40 [a]
CBX (n = 71)	16,20 ± 9,48 [b]	0,59 ± 1,49 [b]
CA (n = 65)	16,04 ± 10,99 [b]	0,64 ± 0,82 [b]

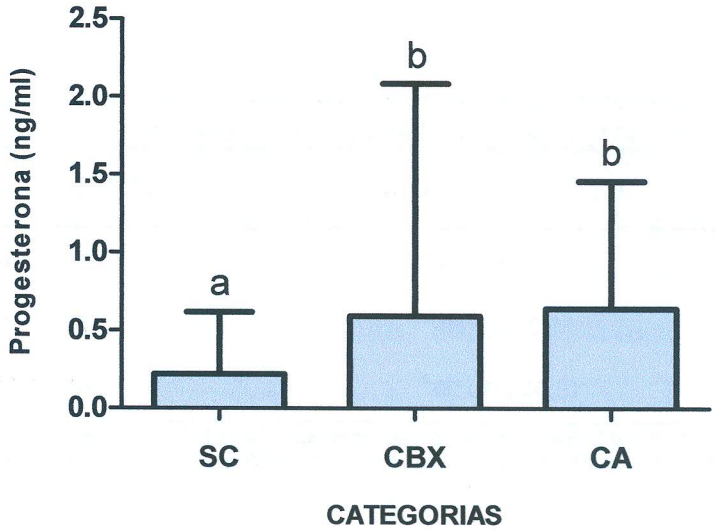
LEGENDA: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto. Letras sobrescritas diferentes na coluna representam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Gráfico 25 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a primeira fase – São Paulo/SP – 2012



LEGENDA: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Gráfico 26 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a primeira fase – São Paulo/SP – 2012



LEGENDA: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Analisando-se os dados apresentados na tabela 9 e nos gráficos 25 e 26, verificou-se que existiu diferença entre as concentrações dos esteroides sexuais (estradiol e progesterona) entre as amostras de fêmeas que não apresentaram comportamento (SC) e as que apresentaram comportamento em alguma intensidade (CBX e CA).

A tabela 10 apresenta a análise de correlação entre o comportamento reprodutivo, as concentrações de estradiol & progesterona e o tamanho do maior folículo observado no exame ultrassonográfico ovariano.

A tabela 10 indica que ocorreu correlação de fraca intensidade ($r = 0,20$) entre o estradiol e o comportamento reprodutivo. Para a progesterona foi verificada, uma correlação de média intensidade ($r = 0,42$). Silva (2008) estudando fêmeas jovens de avestruz em maturação sexual encontrou correlação significativa de média intensidade entre o estradiol e o comportamento reprodutivo ($r = 0,64$) e entre a progesterona e o comportamento ($r = 0,44$).

Tabela 10 – Coeficientes de correlação (r) encontrados entre o comportamento reprodutivo (ASA+BICO+AC), as concentrações séricas de estradiol & progesterona e a medida do maior folículo ovariano observado no exame ultrassonográfico ovariano durante a primeira fase do estudo – São Paulo/SP – 2012

	COMPORTAMENTO	ESTRADIOL	PROGESTERONA	TAM > FOL
COMPORTAMENTO (ASA+BICO+AC)	-	r = 0,20 p < 0,0005	r = 0,42 p < 0,0001	r = 0,65 p < 0,00001
ESTRADIOL	r = 0,20 p < 0,0005	-	r 0,42 p < 0,0001	r = 0,15 p > 0,05
PROGESTERONA	r = 0,42 p < 0,0001	r 0,42 p < 0,0001	-	r = 0,60 p < 0,0001
TAM > FOL	r = 0,65 p < 0,00001	r = 0,15 p > 0,05	r = 0,60 p < 0,0001	-

Legenda: COMPORTAMENTO: calculado pela fórmula (ASA+BICO+AC) utilizando os critérios ASA *"abaixar e bater das asas"*; BICO: "*abaixar e balançar pendular da cabeça batendo o bico*"; AC: presença de postura de aceitação de cópula. TAM > FOL: medida do maior folículo observado no ultrassom.

Os resultados apresentados na tabela 9 e 10 e os descritos na literatura (Silva, 2008) indicam que as concentrações séricas dos esteroides sexuais podem estar relacionadas com o aparecimento e a modulação da intensidade do comportamento reprodutivo em fêmeas de avestruzes.

A tabela 10 apresenta também, a relação da medida do folículo ovariano avaliado no ultrassom com as concentrações séricas dos hormônios estudados e com o comportamento. De acordo com os índices de correlação encontrados, há uma correlação de média intensidade entre o tamanho do maior folículo ovariano e o comportamento reprodutivo (r = 0,65) e entre o tamanho do maior folículo ovariano e a concentração de progesterona sérica (r = 0,60). Este resultado reforça a hipótese de que o comportamento reprodutivo está relacionado com as concentrações séricas dos esteroides sexuais. Com o aumento do desenvolvimento ovariano - avaliado neste estudo através da medida do maior folículo visualizado no exame ultrassonográfico – há uma maior liberação de esteroides sexuais pelos folículos ovarianos, que, por fim, acabam desencadeando o aparecimento e modulando do comportamento reprodutivo.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA SEGUNDA FASE

A segunda fase do estudo totalizou 11 semanas de duração. Durante este período, foram realizadas 47 coletas de sangue (33 amostras de cada fêmea, mais 14 amostras das fêmeas selecionadas nos tratamentos) gerando um total de 297 amostras de soro sanguíneo que foram analisadas para a verificação das concentrações séricas de estradiol e progesterona e 124 amostras que foram analisadas para verificação da concentração sérica de corticosterona. Neste período também foram realizadas 33 observações de comportamento reprodutivo resultando em 297 avaliações e 114 exames ultrassonográficos de ovário.

Os resultados desta fase serão apresentados e discutidos, primeiramente, de forma individual e posteriormente serão apresentados e discutidos os resultados consolidados.

5.4.1 Resultados individuais da segunda fase

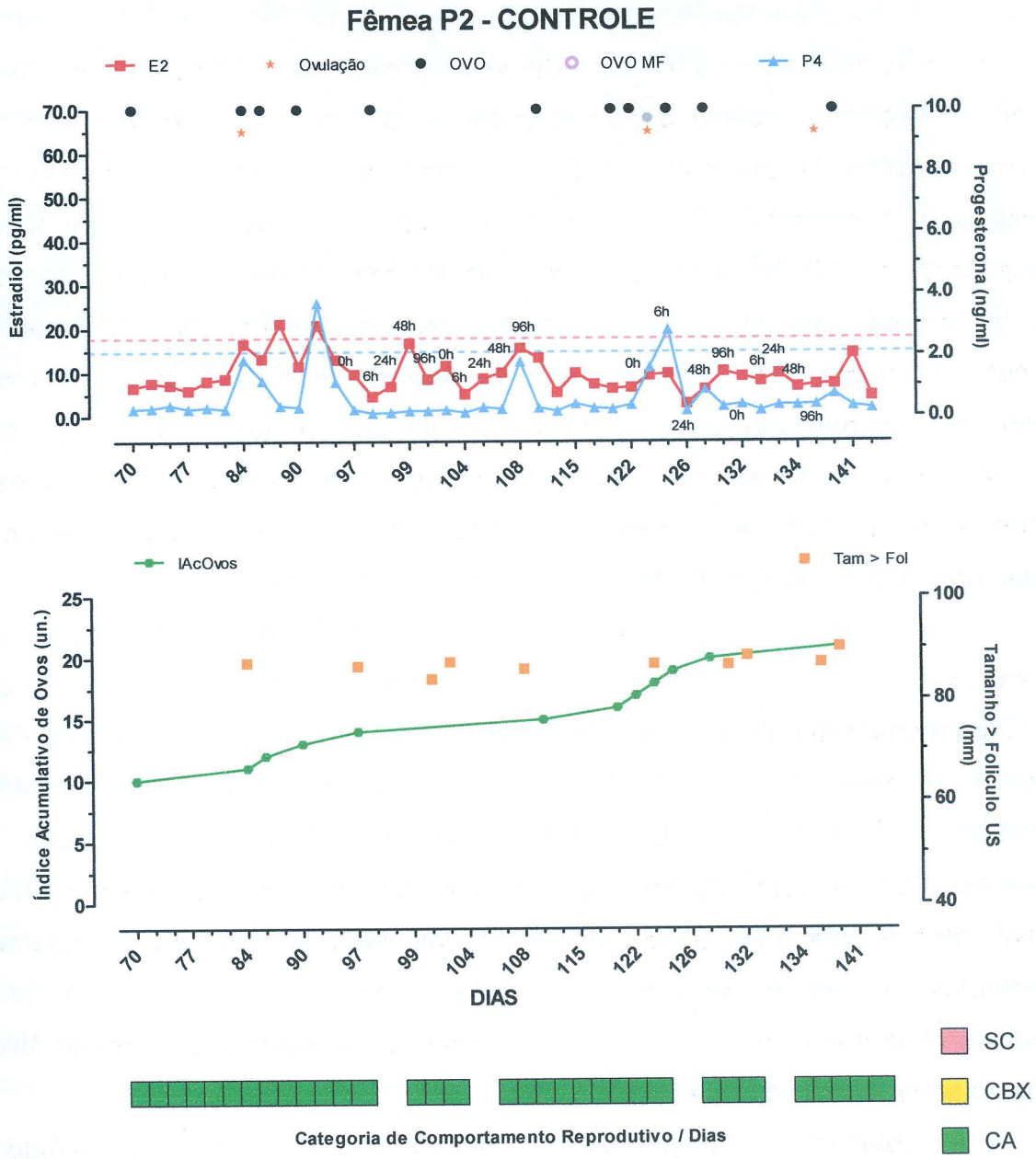
Através da compilação dos resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura para esta fase, foi elaborada uma representação gráfica para cada fêmea estudada.

Como durante esta fase foi realizada a aplicação de tratamento de GnRH, os resultados individuais das fêmeas que fazem parte do grupo CONTROLE e as selecionadas para o grupo TRATADO serão apresentados em subseção específica.

5.4.1.1 Grupo controle

O gráfico 27 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P2 durante a segunda fase.

Gráfico 27 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P2 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante tratamentos como CONTROLE. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

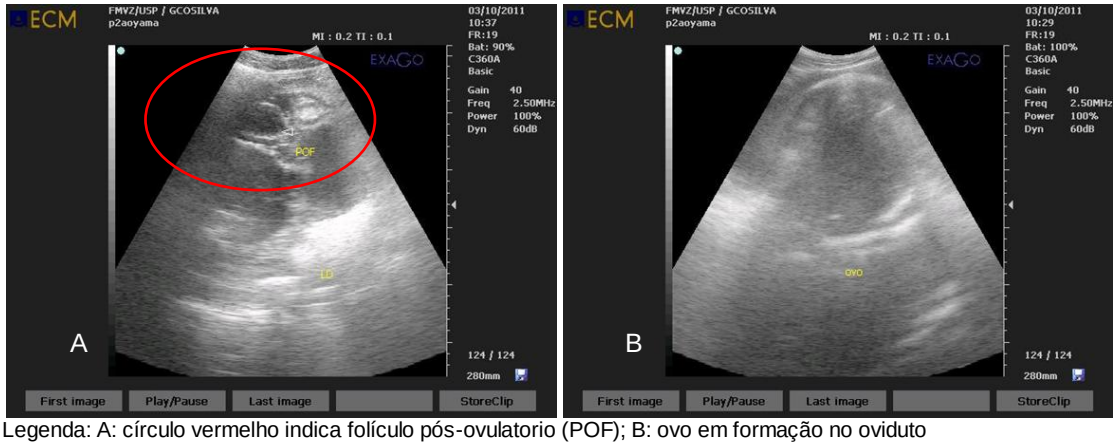
A fêmea P2 realizou a postura de 12 ovos durante a segunda fase. Analisando-se os perfis hormonais é possível verificar dois picos de progesterona. No dia 92, o pico de progesterona ocorreu concomitante com um pico de estradiol, mas não foi verificada ovulação ou postura relacionada com estes picos. No dia 125, quando esta fêmea estava sendo acompanhada como controle de tratamento, verificou-se pico de progesterona no momento 6h. O exame ultrassonográfico realizado no momento 0h do dia 125 revelou a presença de ovo em formação no oviduto e no dia 125 foi anotada a coleta de um ovo. No dia 127 foi anotado outro ovo, sendo este ovo o relacionado com o pico de progesterona observado no momento 6h do dia 125. De acordo com Bronneberg et al. (2007b) em fêmeas de avestruzes que possuem um ciclo de postura de ovos a cada 48 horas, podemos considerar que na fêmea P2 o pico de progesterona ocorreu 2 horas antes da oviposição do dia 125 e este mesmo pico induziu a ovulação relacionada com o ovo do dia 127, já que o tempo de formação de um ovo é de 48horas.

Durante toda a segunda fase foram realizados 10 exames de ultrassom na fêmea P2, sendo que em 3 exames constatou-se a ovulação (dia 84, dia 125 e dia 136) com respectiva coleta de ovos nos dias 86, 127 e dia 139. No exame do dia 84 observou-se além de ovo em formação no oviduto, uma estrutura ovariana semelhante ao descrito por Bronneberg e Taverne (2003) para o folículo pós ovulatório (POF) (Figura 13). Em outros exames também foram achadas estruturas semelhantes a esta (dia 101 e dia 136). Pelas medidas dos folículos ovarianos observados nos exames verificou-se que esta fêmea, apesar de realizar a postura de vários ovos manteve-se sempre com o ovário desenvolvido, com maior folículo medindo sempre mais do que 80mm.

Com relação ao comportamento reprodutivo, em 100% do período da segunda fase a fêmea P2 apresentou comportamento reprodutivo alto e frequentemente, durante a observação do comportamento reprodutivo era visualizada a cópula com o macho.

A fêmea P2 foi utilizada como controle em 4 tratamentos.

Figura 13 – Imagem ultrassonográfica do ovário e oviduto da fêmea P2 no dia 84 da segunda fase – São Paulo/SP – 2012



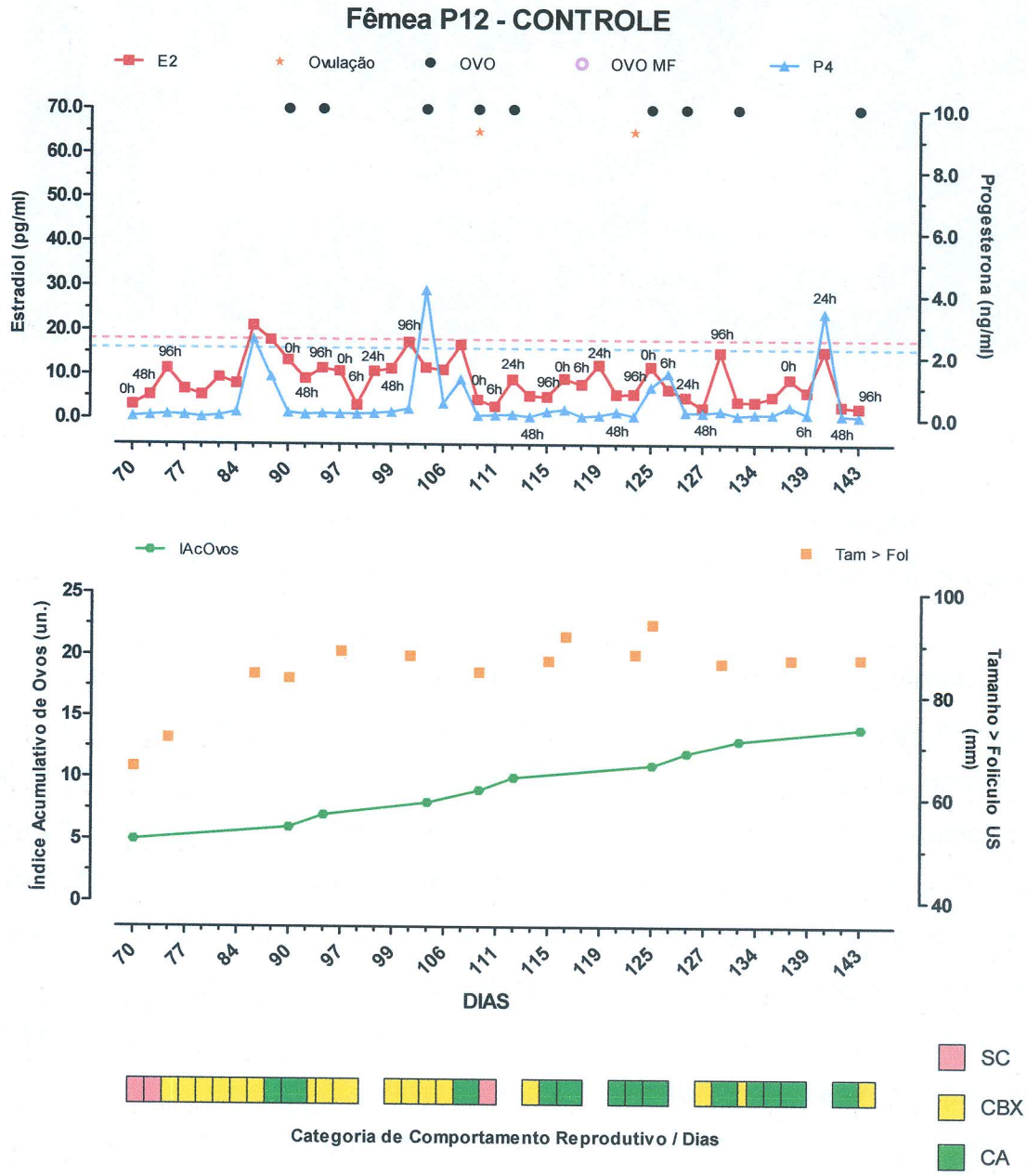
Legenda: A: círculo vermelho indica folículo pós-ovulatorio (POF); B: ovo em formação no oviduto

O gráfico 28 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P12 durante a segunda fase.

Durante a segunda fase a fêmea P12 realizou a postura de 9 ovos. Analisando-se os perfis hormonais, verificou-se a ocorrência de 3 picos de progesterona. O pico do dia 86 ocorreu acompanhado de um pico de estradiol, e está relacionado com a postura de um ovo coletado no dia 89 e marcado no gráfico no dia 90. O segundo pico de progesterona ocorreu no dia 104 do estudo, mas não foi observado ovulação ou qualquer postura de ovo relacionado a este pico. O terceiro pico de progesterona foi visualizado no dia 140 (momento 24h de controle de tratamento), sendo que no dia 142 foi realizada a coleta de um ovo possivelmente relacionado com este pico (marcado no gráfico no dia 143).

Na segunda fase foram realizados 14 exames de ultrassonografia ovariana nesta fêmea. Os exames realizados no início da segunda fase mostravam o ovário pouco desenvolvido devido à sequência de postura de ovos que aconteceu no fim da primeira fase (66,1mm, dia 70). Com o passar dos dias, verificou-se certo crescimento folicular pelo exame ovariano. No dia 74 o ovário apresentava-se ainda pouco desenvolvido com maior folículo observado medindo 71,4mm. No dia 86 a fêmea P12 apresentava ovário bem desenvolvido, com folículo maior medindo 84,3mm. Devido a esta evolução ovariana a primeira postura da segunda fase foi observada no dia 90. Nos exames ultrassonográficos da fêmea P12 também foi

Gráfico 28 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P12 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante tratamentos como CONTROLE. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

possível observar ovo em formação no oviduto nos dias 111 e 122, com coleta subsequente dos ovos nos dias 112 e 123. No dia 129 foi observado folículo pós-ovulatório, provavelmente relacionado à ovulação do ovo posto no dia 126 ou do ovo do dia 131.

Nos exames ultrassonográficos da fêmea P12 também foi possível observar ovo em formação no oviduto nos dias 111 e 122, com coleta subsequente dos ovos nos dias 112 e 123. No dia 129 foi observado folículo pós-ovulatório, provavelmente relacionado à ovulação do ovo posto no dia 126 ou do ovo do dia 131. Com relação ao comportamento reprodutivo pode-se observar que a fêmea apresentava uma menor intensidade de comportamento reprodutivo no início desta fase, coincidente com o baixo desenvolvimento ovariano. Com a melhoria da condição ovariana o comportamento reprodutivo também se intensificou.

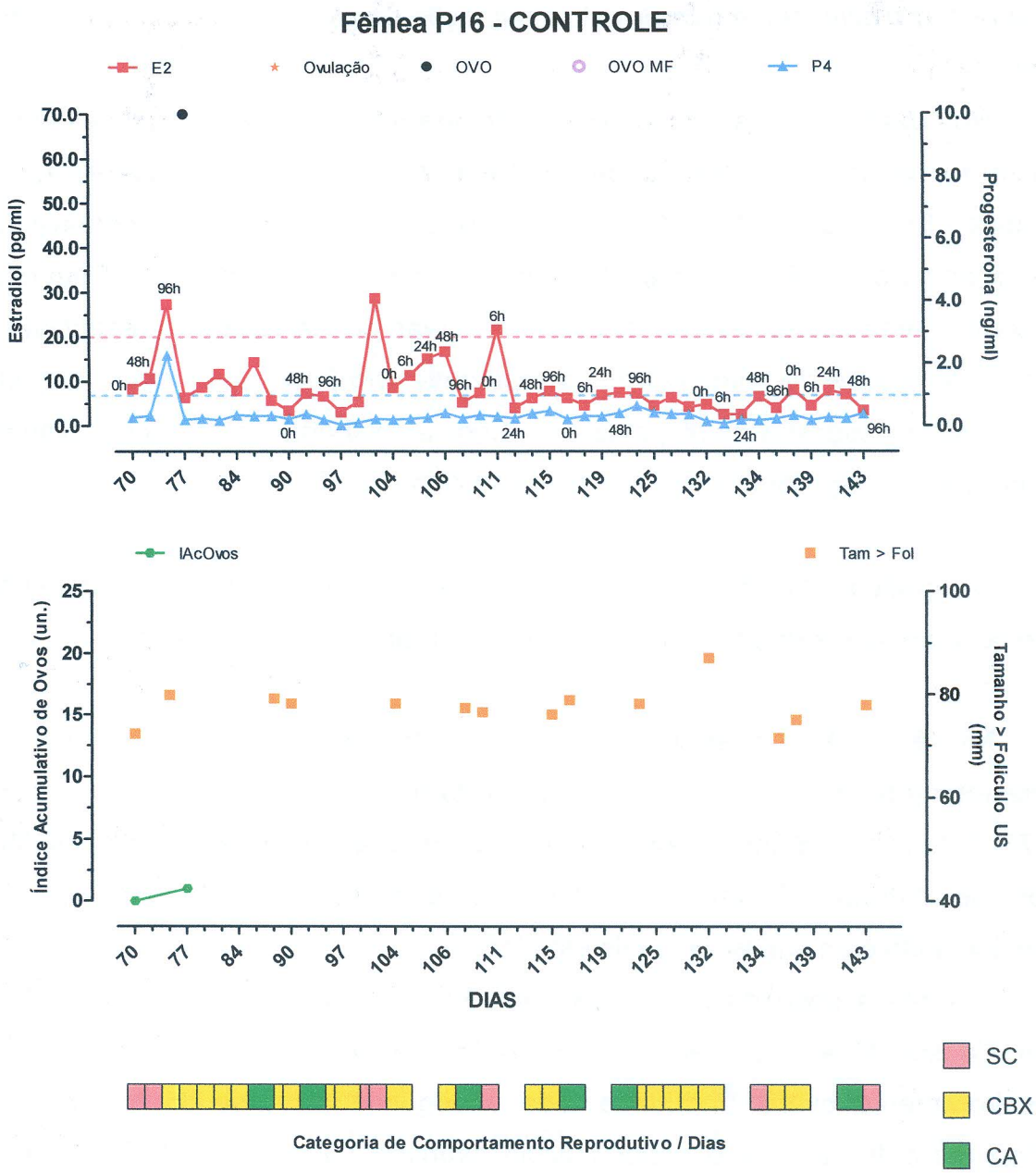
O gráfico 29 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P16 durante a segunda fase.

Na fêmea P16 observou-se pico de estradiol concomitante com pico de progesterona no dia 74, sendo verificada coleta de ovo relacionado a estes picos no dia 77. Este ovo foi a única postura realizada por esta fêmea nas duas fases. Mais 2 picos de estradiol foram verificados nos dias 101 e 111 sem que fosse correlacionado com outras variáveis estudadas.

Durante a segunda fase foram realizados 14 exames ultrassonográficos do ovário desta fêmea. A fêmea P16 oscilou entre apresentar pouco e bom desenvolvimento ovariano durante toda a segunda fase, sendo que a medida mínima encontrada para o maior folículo ovariano foi no dia 136 (71,5mm) e a máxima foi no dia 132 (87,2mm). Comparando as imagens obtidas nestes dias foram visualizadas estruturas ovarianas que podem indicar um processo de atresia em folículos grandes e hierarquizados (Figura 14). Concomitante com este processo de atresia pode-se visualizar uma redução nas concentrações séricas de estradiol a partir do dia 112 aproximadamente.

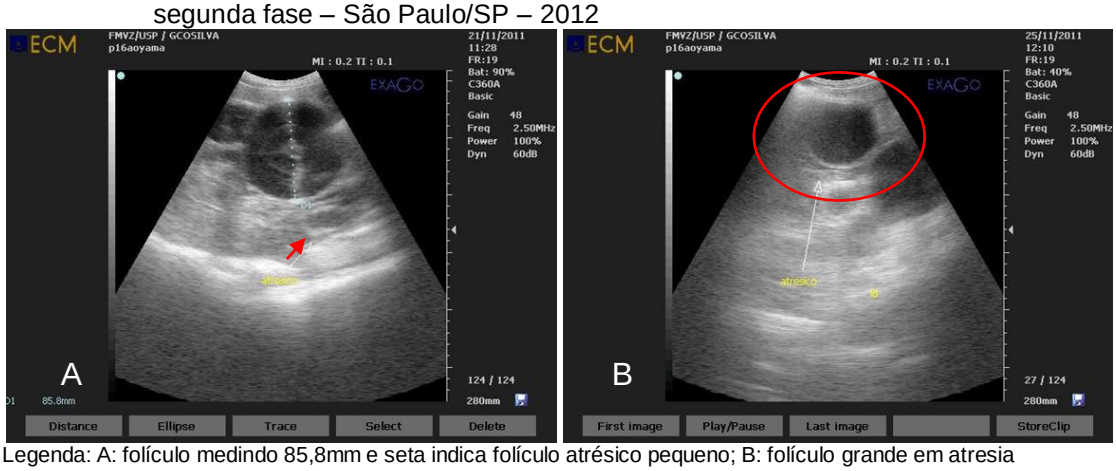
Com relação ao comportamento reprodutivo, a fêmea P16 apresentou comportamento baixo em 60% do período estudado.

Gráfico 29 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P16 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante tratamentos como CONTROLE. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

Figura 14 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P16 no dia 132 e no dia 136 da segunda fase – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: folículo medindo 85,8mm e seta indica folículo atrésico pequeno; B: folículo grande em atresia

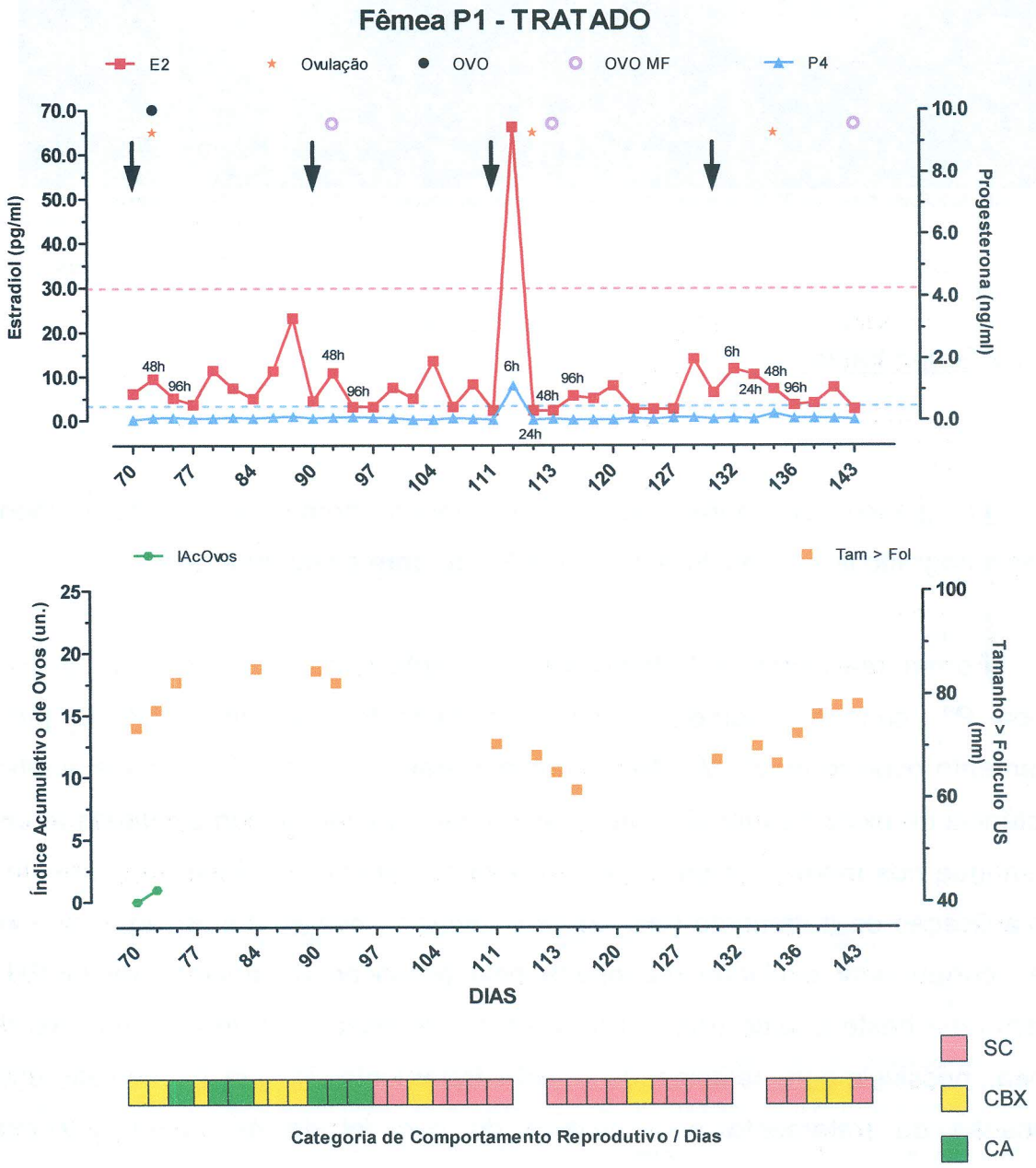
5.4.1.2 Grupo tratado

O gráfico 30 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P1 durante a segunda fase.

Foram realizados 4 tratamentos com aplicação de análogo de GnRH na fêmea P1, concomitantemente com os tratamentos da fêmea P4. O primeiro tratamento ocorreu no dia 70. Neste primeiro tratamento não foi possível verificar a existência de picos hormonais porque ainda não estavam sendo coletadas amostras de sangue nos momentos 6h e 24h. No exame ultrassonográfico do momento 48h pós-aplicação do tratamento (dia 72) foi visualizado ovo em formação, o que indica que ocorreu uma ovulação provocada pela aplicação de análogo de GnRH. No mesmo dia deste exame (dia 72) também foi verificada a coleta de um ovo desta fêmea, possivelmente relacionado a este tratamento, já que o intervalo entre a aplicação do tratamento e a postura do ovo foi de 48 horas. Na análise ultrassonográfica, verificou-se que no momento 0h o ovário apresentava folículo medindo 73,6mm e no momento 96h (dia 74) o maior folículo media 82,4mm, indicando um possível crescimento de 8,8mm em 4 dias no maior folículo medido. É possível que no primeiro exame, algum folículo maior não tenha sido visualizado. Mesmo assim, é interessante notar, que neste tratamento ocorreu a ovulação de um

folículo relativamente pequeno se comparado às medidas encontradas em fêmeas em que ovularam na primeira fase.

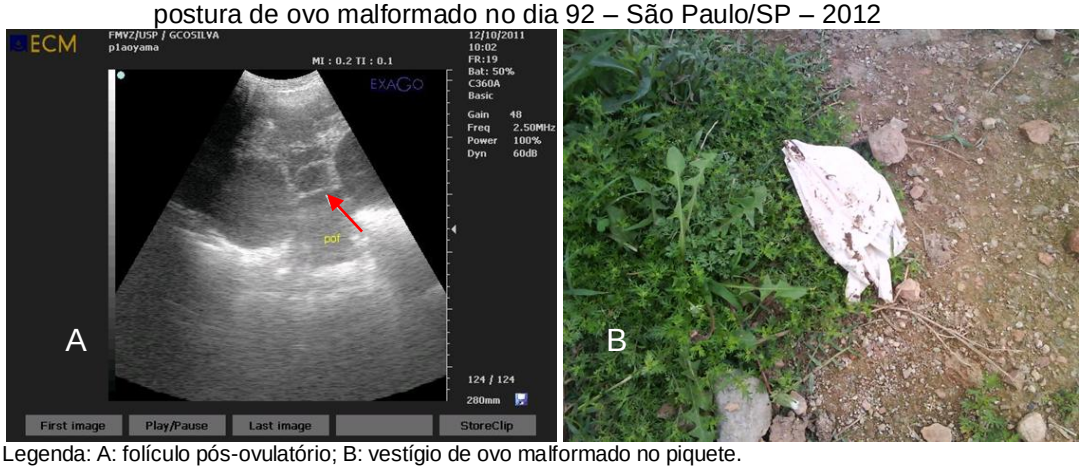
Gráfico 30 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P1 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As setas indicam momento de aplicação de análogo de GnRH. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante os tratamentos. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O segundo tratamento foi realizado no dia 90. Neste dia o maior folículo mediu 84,6mm. No dia 92, foi verificada a presença de vestígios de ovo no piquete (ovo malformado) e, no ultrassom, foi verificada a presença de um “folículo pós-ovulatório” (Figura 15) o que indica que ocorreu uma ovulação após a aplicação neste tratamento. Neste segundo tratamento também não foi possível verificar a existência de picos hormonais, pois não foram realizadas coletas de amostras de sangue nos momentos 6h e 24h.

Figura 15 – Imagem ultrassonográfica do ovário da fêmea P1 e foto do piquete mostrando postura de ovo malformado no dia 92 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: folículo pós-ovulatório; B: vestígio de ovo malformado no piquete.

O terceiro tratamento foi realizado no dia 111. Neste dia o ovário apresentava-se pouco desenvolvido com folículo maior medindo 70,5mm. A aplicação do análogo de GnRH fez com que ocorresse pico de estradiol e progesterona no momento 6h pós-aplicação. No exame ultrassonográfico do dia 112 (24h) foi visualizado ovo em formação e no dia seguinte (dia 113) foi visualizado ovo malformado no piquete. No último ultrassom deste tratamento, realizado no dia 115, o tamanho do maior folículo no ovário era de 68,3mm, a menor medida encontrada na segunda fase para esta fêmea.

O quarto tratamento foi realizado no dia 132. No momento da aplicação do tratamento, o maior folículo ovariano media 67,8mm. Neste tratamento não foram observados picos de progesterona ou de estradiol. Entretanto, no exame ultrassonográfico do dia 134 foi observada a presença de um ovo em formação no oviduto. No dia 136 ainda era visualizado a presença deste ovo no oviduto por

ultrassom. Como após o término do tratamento não tinha sido verificada a coleta de ovo ou a presença de ovo malformado, foram realizados exames de ultrassonografia extras para acompanhar este ovo em formação. Estes exames demonstraram que o ovo em formação permaneceu no oviduto até o dia 143 data do fim da segunda fase. Infelizmente o criador não soube informar se esta fêmea realizou postura de ovo malformado, que é o que deve ter ocorrido, já que não foram anotadas coletas de ovo para esta fêmea durante 1 mês após o término do período experimental.

No total, foram realizados 16 exames ultrassonográficos na fêmea P1. Pelos resultados destes exames é possível verificar que esta fêmea apresentou bastante variação na sua condição ovariana. No início da segunda fase o ovário mostrou bom desenvolvimento, que se manteve até aproximadamente o terceiro tratamento aplicado, quando foram verificadas as menores medidas no tamanho dos folículos ovarianos. No início do quarto tratamento, após a aplicação de GnRH ocorreu um aumento no tamanho do maior folículo observado que passou de 67,8mm no dia 132 para 78,2mm no fim do experimento, no dia 143.

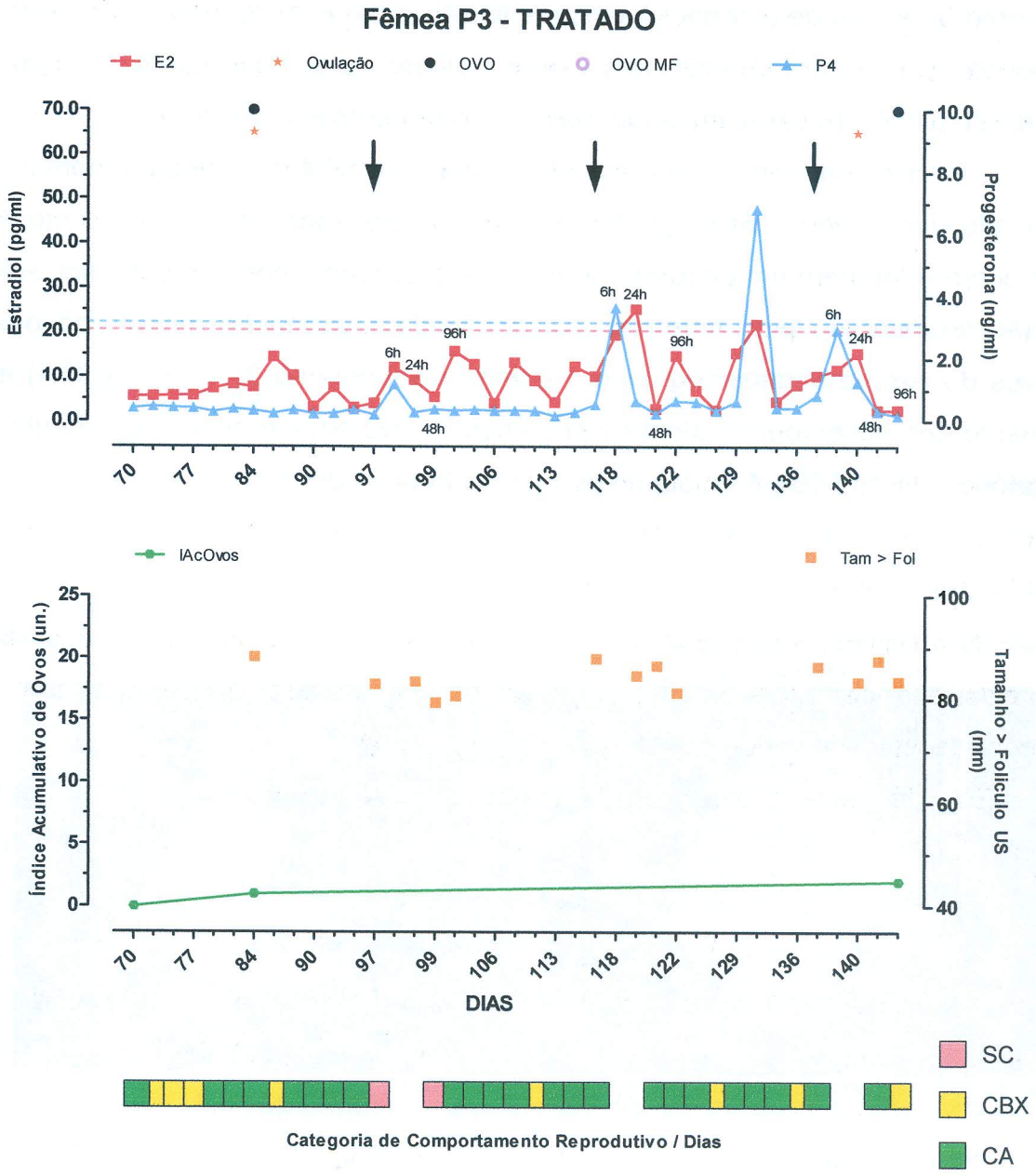
Com relação ao comportamento reprodutivo, verificou-se uma queda na sua intensidade a partir do dia 97, coincidente com menores folículos ovarianos e concentrações séricas dos esteroides estradiol e progesterona.

Esta fêmea realizou apenas 1 postura, resultante do primeiro tratamento aplicado.

O gráfico 31 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P3 durante a segunda fase.

Foram realizados 3 tratamentos com análogo de GnRH na fêmea P3, concomitantes com os tratamentos da fêmea P15. No dia 97 foi realizado o primeiro tratamento. No momento 0h o maior folículo do ovário, observado por ultrassom media 82,9mm. Após a aplicação do tratamento foi verificado apenas um pequeno aumento nas concentrações séricas de estradiol e progesterona nos momentos 6h e 24h pós-aplicação. Nos exames de ultrassom nos dias 98 e 99 não foi visualizado ovo em formação no oviduto da fêmea e as medidas do maior folículo ovariano mantiveram-se próximas da medida observada antes do tratamento. Estes achados indicam que este tratamento não obteve sucesso.

Gráfico 31 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P3 – São Paulo/SP – 2012

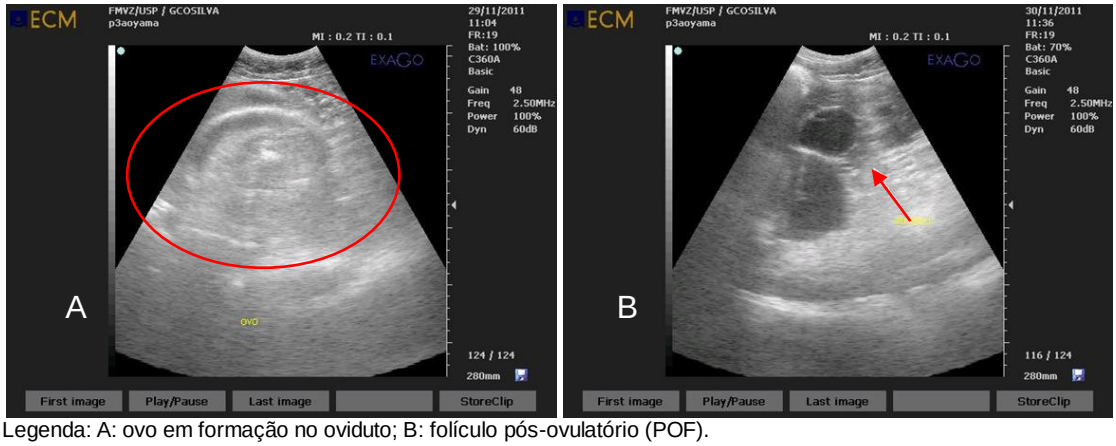


Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As setas indicam momento de aplicação de análogo de GnRH. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante os tratamentos. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O segundo tratamento foi realizado no dia 118. No exame de ultrassom realizado no momento da aplicação do tratamento o maior folículo ovariano mediu 87,9mm. Após a aplicação do tratamento verificou-se pico de progesterona no momento 6h e pico de estradiol no momento 24h. Apesar disto, não foi visualizado a presença de ovo em formação nos exames ultrassonográficos realizados nos dias 119 e 120 (86,3mm) caracterizando mais um tratamento sem sucesso.

O terceiro tratamento foi realizado no dia 139 (86,4mm). Neste tratamento foi verificado um aumento de progesterona não caracterizado como pico no momento 6h e ocorreu também um pequeno aumento nas concentrações de estradiol. Apesar de não ter ocorrido pico hormonal, foi verificada a formação de ovo no oviduto através do exame ultrassonográfico realizado no momento 24h (Figura 16A) e, no momento 48h observou-se, além da presença do ovo em formação, um folículo pós-ovulatório (Figura 16B). A coleta do ovo foi anotada no dia 143.

Figura 16 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P3 no dia 140 e do ovário no dia 141 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: ovo em formação no oviduto; B: folículo pós-ovulatório (POF).

No dia 132 ocorreu um pico na concentração de progesterona bastante alto, concomitante a um pico de estradiol, mas não foi observada ovulação ou postura de ovo relacionada a estes picos hormonais.

Durante a segunda fase foram realizados 13 exames ultrassonográficos nesta fêmea. Os exames ultrassonográficos mostraram que a fêmea P3 manteve um bom desenvolvimento ovariano durante toda a segunda fase do estudo com folículo maior medindo pelo menos 80mm em todos os exames. No decorrer do exame realizado

no dia 84 foi possível visualizar ovo em formação no oviduto que, no mesmo dia foi coletado.

A fêmea P3 apresentou comportamento reprodutivo em 95% do tempo da segunda fase. Apesar disto e do bom desenvolvimento ovariano, a fêmea P3 realizou apenas 2 posturas sendo uma oriunda de um tratamento com análogo do GnRH. Isto pode ter sido causado pelo estresse do manejo ou pela ação de fatores inibitórios.

O gráfico 32 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P4 durante a segunda fase.

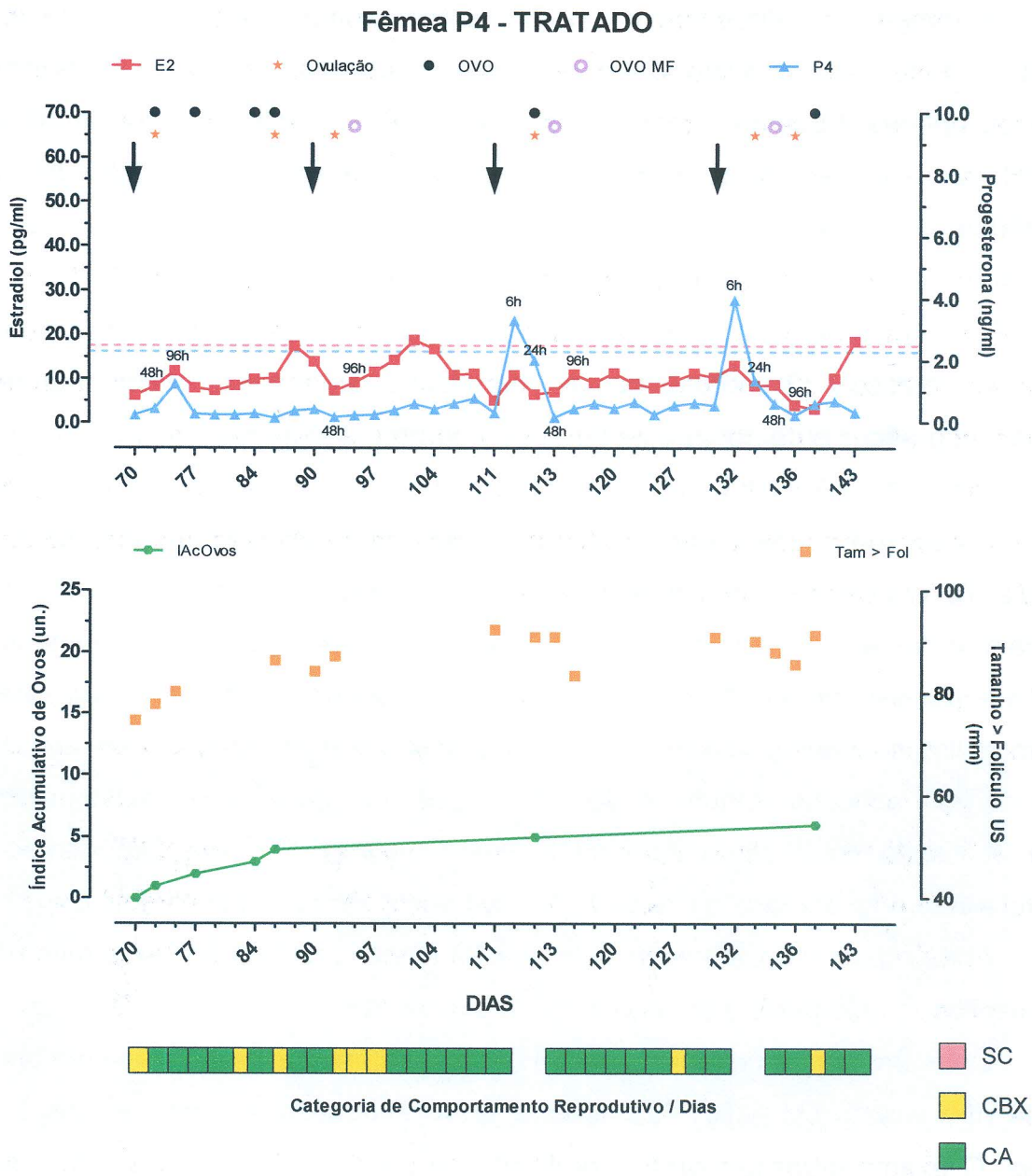
Foram realizados 4 tratamentos na fêmea p4. O primeiro tratamento ocorreu no dia 70 (74,6mm), concomitantemente com o tratamento da fêmea P1. Neste primeiro tratamento ainda não estavam sendo coletadas amostras nos momentos 6h e 24h e, por esta razão não foi possível verificar a ocorrência de picos hormonais. O exame ultrassonográfico do dia 72 (48h pós-aplicação) detectou a presença de um ovo em formação no oviduto, o que indica que ocorreu uma ovulação provocada pela aplicação de análogo de GnRH. Neste mesmo dia deve ter acontecido a postura já que foi anotada a coleta de um ovo desta fêmea neste mesmo dia.

Após o primeiro tratamento a fêmea P4 realizou mais 3 posturas mas não foi possível correlacioná-las com as outras variáveis estudadas.

O segundo tratamento ocorreu no dia 90 (84,3mm). Neste tratamento também ainda não tinham sido iniciadas as coletas de sangue nos momentos de 6 e 24 horas. O exame ultrassonográfico realizado no dia 92 mostrou a presença de ovo em formação no oviduto, caracterizando a indução da ovulação após a aplicação do análogo de GnRH. No dia 94 foi encontrado vestígios de ovo no piquete, indicando a postura de um ovo malformado.

O terceiro tratamento foi realizado no dia 111 (92,4mm). Neste tratamento observou-se um pico de progesterona no momento 6h. No dia seguinte à aplicação do tratamento (dia 112) observou-se a presença de um ovo bem formado no oviduto, o que poderia caracterizar uma ovulação anterior à aplicação do tratamento e que não tinha sido visualizada no exame no momento 0h. Este ovo foi coletado no

Gráfico 32 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P4 – São Paulo/SP – 2012

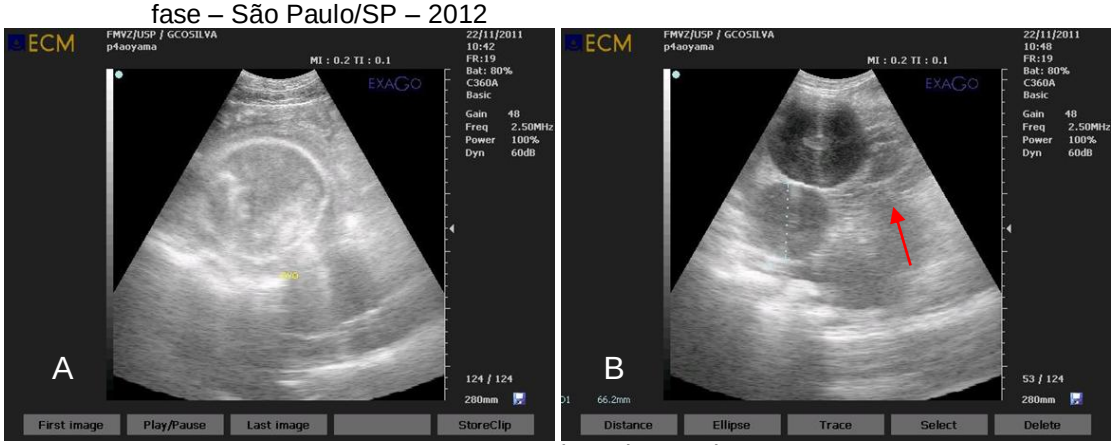


Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As setas indicam momento de aplicação de análogo de GnRH. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante os tratamentos. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

mesmo dia, indicando que realmente a ovulação tinha ocorrido antes da aplicação do tratamento. No dia 113, contudo, foi verificado a presença de restos de ovo no piquete e no exame ultrassonográfico do ovário o maior folículo observado media 83,5mm. Estes achados indicam que possa ter ocorrido uma nova ovulação em decorrência da aplicação do tratamento do GnRH e esta resultou em um ovo malformado.

O quarto tratamento ocorreu no dia 132 (91mm). Neste tratamento foi verificada a ocorrência de um pico de progesterona no momento 6h. No exame ultrassonográfico do dia seguinte (133) foi possível visualizar a presença de um ovo inicial em formação no oviduto e de um folículo pós-ovulatório no ovário (Figura 17). No dia seguinte (134), foi visualizada a presença de vestígios de ovo no piquete caracterizando a postura de um ovo malformado. Ainda na semana deste tratamento foi visualizada uma nova ovulação (natural) pelo exame ultrassonográfico no dia 136 (96h), com coleta de um ovo íntegro no dia 139.

Figura 17 – Imagem ultrassonográfica do ovário e oviduto da fêmea P4 no dia 133 da segunda fase – São Paulo/SP – 2012



Legenda: A: ovo em formação no oviduto; B: seta indica folículo pós-ovulatório (POF).

Na segunda fase, foram realizados 15 exames ultrassonográficos na fêmea P4. O ovário desta fêmea apresentou-se bem desenvolvido durante toda a segunda fase do estudo com o maior folículo ovariano medindo, no mínimo, 74,6mm.

Com relação ao comportamento reprodutivo, em 80% da segunda fase a fêmea P4 apresentou comportamento alto e nos outros 20% comportamento reprodutivo baixo.

Ao final desta fase a fêmea P4 tinha realizado a postura de 6 ovos no total sendo apenas 1 oriundo da aplicação de tratamento com análogo para indução da ovulação.

O gráfico 33 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P9 durante a segunda fase.

Durante esta fase foi realizado 2 tratamentos na fêmea P9. O primeiro tratamento ocorreu no dia 104, concomitante com os tratamentos da fêmea P14. Neste tratamento no momento 0h o ovário apresentava o maior folículo medindo 81,8mm. Nos exames ultrassonográficos realizados nos momentos 24 e 48h pós-aplicação não foi observado ovo em formação indicando que não ocorreu uma ovulação induzida pelo tratamento. Também não foi verificada a ocorrência de pico de progesterona após a aplicação do tratamento, somente um pico de estradiol no momento 24h.

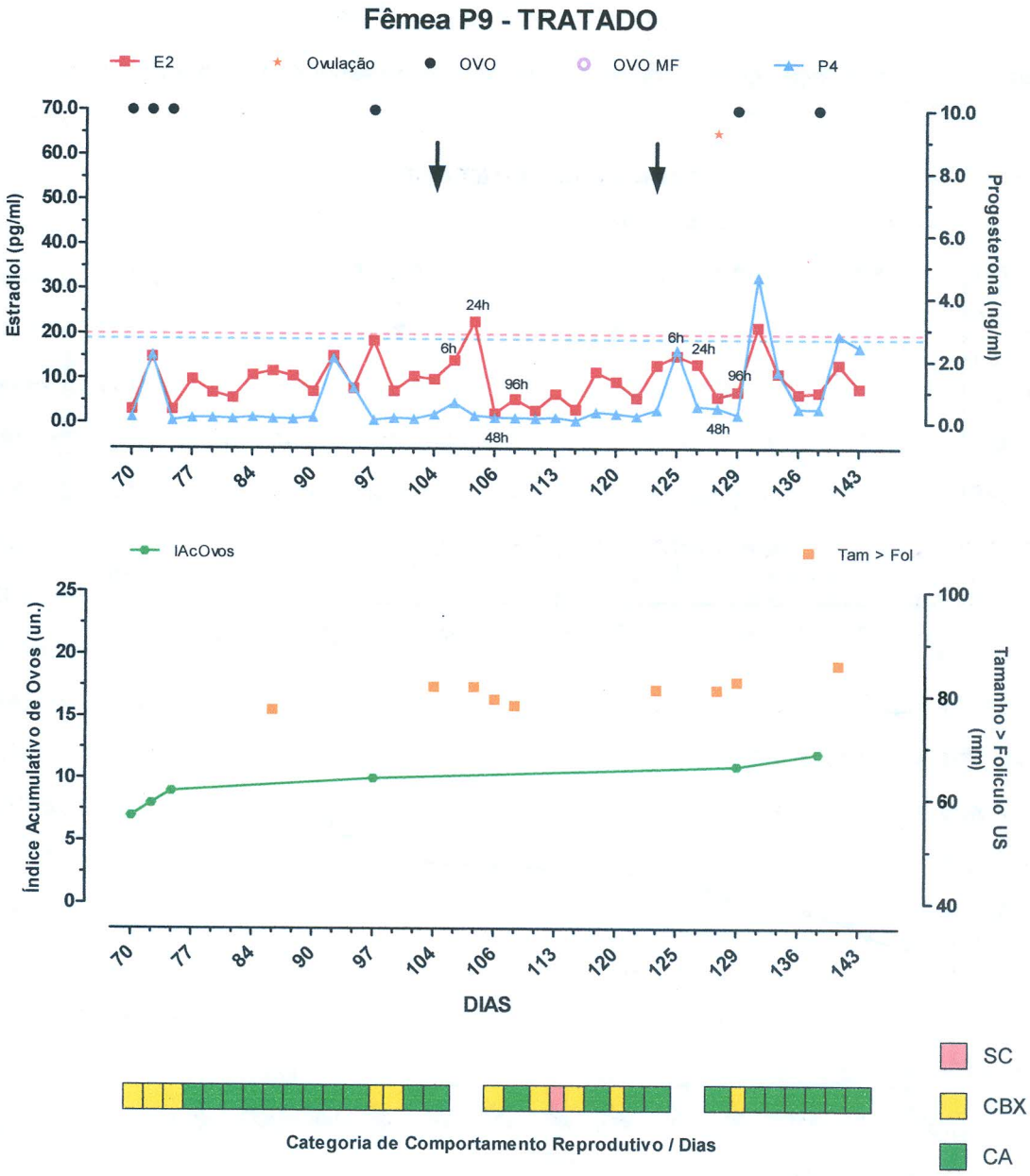
No segundo tratamento, realizado no dia 125 (81,3mm) ocorreram aumentos nas concentrações séricas de estradiol e progesterona, mas não foram caracterizados picos. No dia seguinte ao tratamento, não foi possível a realização do exame ultrassonográfico programado por causa de chuva. No dia 127, o exame ultrassonográfico revelou a presença de um ovo em formação no oviduto, sendo este ovo foi coletado posteriormente no dia 128.

No dia 132 foi observado pico nas concentrações de progesterona e estradiol. Este pico resultou na postura de um ovo coletado no dia 137.

Durante a segunda fase foram realizados 9 exames de ultrassom e em todos a fêmea P9 apresentou bom desenvolvimento ovariano, com folículo maior medindo entre 77,3 a 86mm.

Na segunda fase foram coletados 6 ovos da fêmea P9 sendo que somente 1 foi oriundo do tratamento com GnRH para a indução da ovulação. Com relação ao comportamento reprodutivo a fêmea P9 apresentou comportamento alto em 70% do tempo.

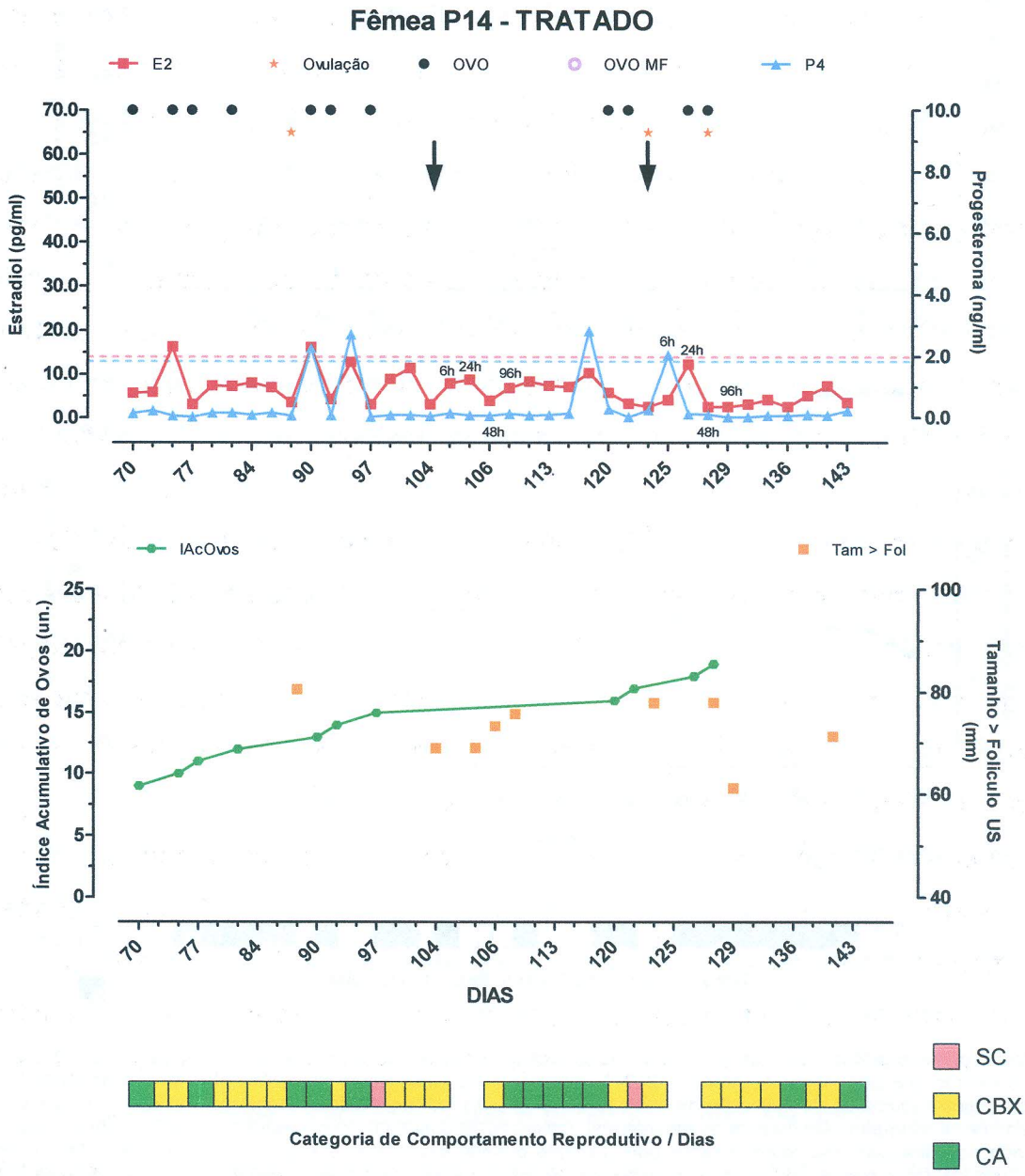
Gráfico 33 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P9 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As setas indicam momento de aplicação de análogo de GnRH. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante os tratamentos. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O gráfico 34 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P14 durante a segunda fase.

Gráfico 34 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P14 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As setas indicam momento de aplicação de análogo de GnRH. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante os tratamentos. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

Foram realizados 2 tratamentos com aplicação de análogo de GnRH na fêmea P14, juntamente com os tratamentos realizados na fêmea P9. O primeiro tratamento foi realizado no dia 104 (69,1mm). A aplicação de análogo de GnRH não provocou elevação nas concentrações séricas de progesterona e estradiol. Os exames ultrassonográficos realizados nos momentos 24 e 48h não mostraram indícios de ovulação. Estes resultados demonstram que a aplicação de GnRH não provocou o efeito desejado de induzir a ovulação nesta fêmea neste tratamento, provavelmente devido ao baixo desenvolvimento ovariano no início do tratamento.

O segundo tratamento ocorreu no dia 125 (78mm). No exame ultrassonográfico do ovário no momento da aplicação do tratamento (0h), foi visualizado um ovo em formação no oviduto. A aplicação do tratamento induziu um pico de progesterona no momento 6h. No dia seguinte ao tratamento (dia 126) foi coletado ovo no piquete, mas infelizmente não foi possível realizar o exame ultrassonográfico programado por causa de chuva. No exame do momento 48h, verificou-se que havia ocorrido uma nova ovulação já que foi observado ovo em formação no oviduto. Este ovo foi coletado no mesmo dia (127), indicando ser possível que esta ovulação verificada no exame do momento 48h tenha ocorrido devido à aplicação do tratamento com GnRH. No último exame ultrassonográfico deste tratamento (96h, dia 129) verificou-se que após 2 posturas sequenciais, ocorreu uma queda no desenvolvimento ovariano, com folículo maior medindo somente 61,3mm após esta semana de tratamento.

Durante a segunda fase foram observados 4 picos hormonais fora das semanas em que a fêmea P14 foi tratada. No dia 74 foi visualizado pico de estradiol. Neste mesmo dia foi realizada a coleta de um ovo e no dia 77 foi coletado outro ovo que pode estar relacionado a este pico de estradiol. Um aumento nas concentrações de progesterona pode ter não ter sido observado devido ao intervalo das coletas de sangue.

No dia 90, verificou-se um pico nas concentrações de progesterona e estradiol. Neste mesmo dia ocorreu a coleta de um ovo no piquete e 2 dias depois foi coletado outro ovo que podem estar relacionados à estes picos hormonais. Logo em seguida do pico do dia 90, foi observado um novo pico de progesterona com aumento nas concentrações de estradiol próximo dos valores de pico (dia 94). Este pico possivelmente está relacionado ao ovo coletado no dia 96. Um quarto pico de progesterona foi observado no dia 118 sendo observado posteriormente a postura

de um ovo no dia 120. Estes picos, que ocorreram sem a aplicação do tratamento com análogo de GnRH, indicam que esta fêmea estava ativa reprodutivamente e que as variações encontradas fisiologicamente nestes hormônios estavam relacionados com as posturas subsequentes aos seus picos.

Nesta fase foram realizados 9 exames ultrassonográficos do ovário. É interessante notar que, no início de cada sequência de posturas, o ovário apresentava folículos ovarianos maiores do que 75mm e no primeiro tratamento em que não ocorreu a ovulação o maior folículo media 69,1mm. Isto pode indicar que o tratamento deve ser aplicado somente em fêmeas que apresentem folículos ovarianos maiores do que 75mm.

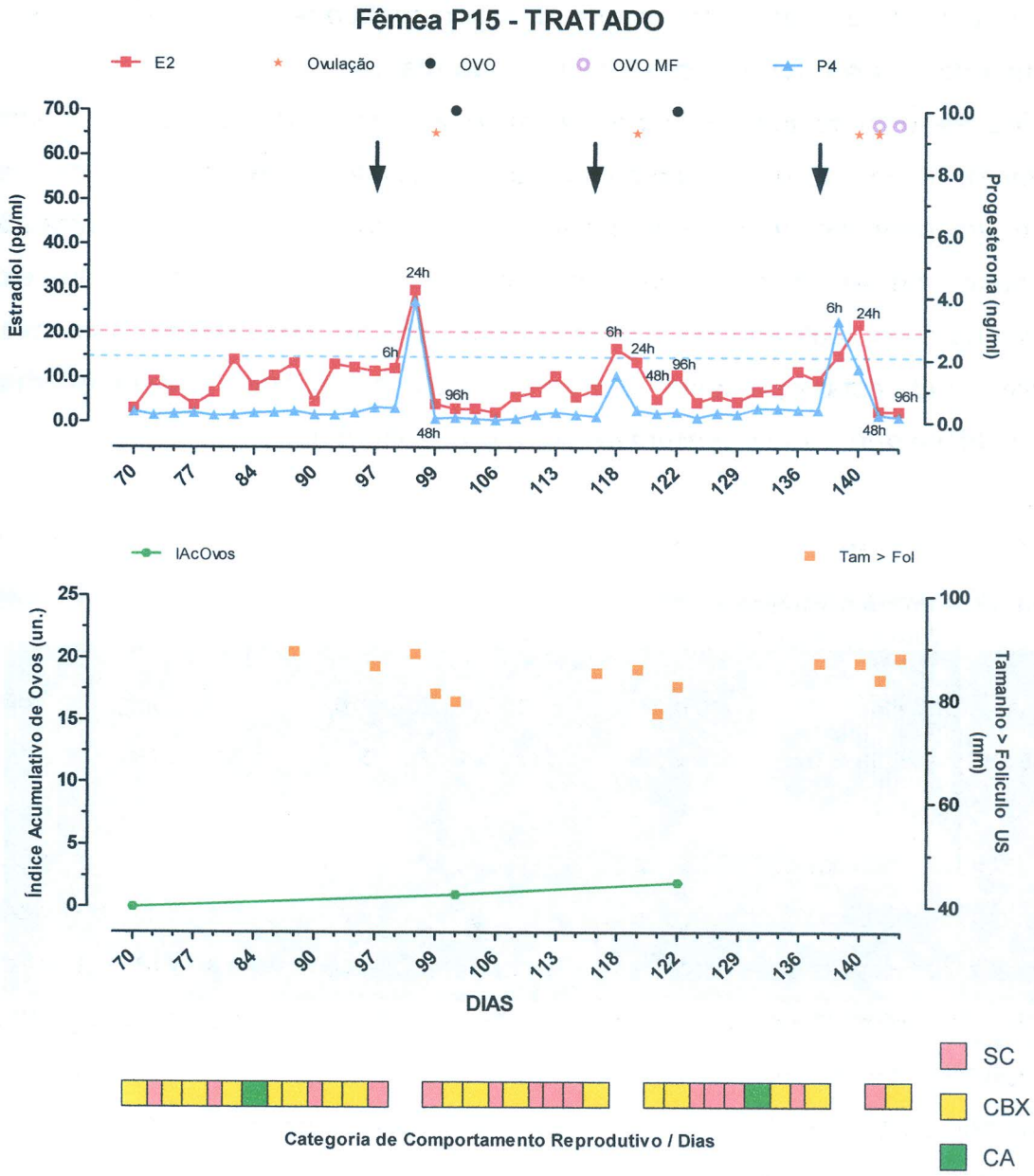
Com relação ao comportamento reprodutivo esta fêmea apresentou algum grau de comportamento em pelo menos 90% das observações. Nos momentos em que não foi observado comportamento reprodutivo foi verificada a realização de postura de ovo no piquete.

O gráfico 35 apresenta os resultados hormonais, comportamentais, ultrassonográficos e de postura da fêmea P15 durante a segunda fase.

Foram realizados 3 tratamentos na fêmea P15. No primeiro tratamento, aplicado no dia 97 (86,4mm), verificou-se aumento nas concentrações séricas de estradiol e progesterona no momento 24h pós-ovulação. No dia seguinte à aplicação (dia 98), não foi possível caracterizar uma ovulação no exame ultrassonográfico. Já no exame do dia 99 verificou-se a presença de ovo em formação no oviduto. Este ovo em formação também foi visualizado no exame realizado no dia 101, 96h pós-aplicação. Somente no dia 102 é que foi anotada a coleta do ovo no piquete desta fêmea. Apesar do tempo elevado entre a aplicação e a coleta do ovo, acredita-se que esta postura ocorreu devido à aplicação do tratamento.

O segundo tratamento foi realizado no dia 118 da segunda fase (85,2mm). Após a aplicação do tratamento, ocorreu um aumento na concentração de estradiol e de progesterona no momento 6h sem caracterizar picos. Mesmo assim, foi verificada a presença de um ovo inicial em formação durante exame de ultrassom 24h após aplicação do tratamento. No ultrassom do dia 120 também foi visualizado o ovo em formação. A coleta do ovo ocorreu no dia 122.

Gráfico 35 – Representação gráfica dos resultados obtidos na segunda fase para a fêmea P15 – São Paulo/SP – 2012



Legenda: O primeiro gráfico ilustra as concentrações séricas de estradiol (E2) e progesterona (P4). Foram considerados picos os valores que ultrapassaram [*Média + 2xDP*] representadas pelas linhas tracejadas para ambos os hormônios. As setas indicam momento de aplicação de análogo de GnRH. As indicações de horários representam momentos em que o animal foi acompanhado durante os tratamentos. Indicação de postura de ovo íntegro, ovo malformado e ovulação observada por ultrassom são representados pontualmente quando existentes; O segundo gráfico apresenta o índice acumulativo de ovos postos (IAcOvos) e o tamanho do maior folículo ovariano observado nos dias de exame de ultrassom (Tam > fol); O terceiro gráfico indica a categoria de comportamento reprodutivo do animal: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento baixo; CA: comportamento alto.

O terceiro tratamento ocorreu no dia 139 (87,2mm). Neste tratamento verificou-se o surgimento de um pico de progesterona 6h pós-aplicação e um pico de estradiol 24h pós-aplicação. No exame ultrassonográfico do dia 140 foi constatada a presença de ovo em formação no oviduto. No dia 141, verificou-se a presença de vestígios de ovo no piquete, caracterizando a postura de um ovo malformado. Entretanto, no exame ultrassonográfico, foi visualizado, segundo Bronneberg et al. (2007b), imagem característica de ovo em estágio inicial de formação (Figura 18A) o que pode indicar quer tenha ocorrido uma nova ovulação. No exame ultrassonográfico realizado no dia 143, último dia de experimento, este ovo em formação ainda estava presente no oviduto, só que a imagem indicava má-formação (Figura 18B) o que levou a postura de outro ovo malformado.

Figura 18 – Imagem ultrassonográfica do oviduto da fêmea P15 no dia 141 e no dia 143 durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012

Legenda: A: ovo em estágio inicial de desenvolvimento. B: ovo apresentando bordas irregulares hiperecóicas indicando má-formação.

Nesta fase foram realizados 13 exames de ultrassonografia na fêmea P15. A partir destes exames foi possível verificar que a fêmea P15 apresentou ao longo da segunda fase um ovário bem desenvolvido, sempre com folículos maiores do que 75mm. Apesar disto esta fêmea só realizou 2 posturas, ambas em semanas em que foi aplicado tratamento de análogo de GnRH.

Com relação ao comportamento reprodutivo, esta fêmea apresentou pouco ou nenhum comportamento reprodutivo em 90% do tempo desta fase.

5.4.2 Resultados consolidados da segunda fase

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados gerais dos tratamentos realizados e será apresentada as análises conjunta das variáveis estudadas durante esta fase, buscando-se comparar, quanto pertinente, estes resultados com os apresentados na primeira fase.

5.4.2.1 Resultados dos tratamentos

A partir da compilação dos resultados individuais foi possível avaliar a eficácia da aplicação do análogo de GnRH (lecirelina) na indução da ovulação e na postura de ovos. A tabela 11 apresenta os resultados dos tratamentos realizados em cada fêmea do grupo tratado.

Observando-se os resultados da tabela 11, verifica-se que de 18 tratamentos realizados, em 14 deles ocorreu uma ovulação (77,7%). Dentre os tratamentos em que não ocorreu a ovulação, em apenas 1 tratamento não foi visualizado aumento ou picos nas concentrações séricas de estradiol ou progesterona. Neste tratamento, o primeiro realizado na fêmea P14, a única diferença encontrada foi no tamanho do maior folículo ovariano observado no ultrassom no momento 0h. Neste momento, a fêmea P14 apresentava pouco desenvolvimento ovariano, com o folículo maior medindo somente 69,1mm e, talvez, esta tenha sido a razão para que não tenham acontecido picos hormonais e consequentemente a ovulação. No entanto, no tratamento 4 da fêmea P1, apesar de ter sido verificada uma ovulação, não foram visualizados aumentos na concentração dos hormônios esteroides e esta fêmea tinha características de tamanho folicular semelhantes com a fêmea P14 no tratamento 1.

Ainda analisando-se os dados da tabela 11, é possível verificar que ocorreu a postura de ovo malformado em 50% dos casos em que o tratamento poderia ter induzido a ovulação. Uma hipótese que poderia explicar este fenômeno seria que a indução precoce de pico de progesterona levaria a postura de ovos ainda em formação. Outra hipótese seria que o manejo dos animais em função do

experimento levaria a alterações hormonais que desencadeariam a postura precoce por alterar os mecanismos de transporte no oviduto.

Tabela 11 – Datas e resultados dos tratamentos realizados com análogo de GnRH durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012

ANIMAL / TRAT.	ULTRASSOM		OVO		HORMÔNIOS (6h/24h)	
	Tam > Fol (mm)	Ovulação	Normal	Malformado	Estradiol	Progesterona
P1 / T1	73,6	SIM	X		?	?
P4 / T1	74,6	SIM	X		?	?
P1 / T2	84,6	SIM		X	?	?
P4 / T2	84,3	SIM		X	?	?
P3 / T1	82,9	NÃO			aumento 6h	aumento 6h
P15 / T1	86,4	SIM	X		pico 24h	pico 24h
P9 / T1	81,8	NÃO			pico 24h	não
P14 / T1	69,1	NÃO			não	não
P1 / T3	70,5	SIM		X	pico 6h	pico 6h
P4 / T3	92,4	SIM		X	não	pico 6h
P3 / T2	87,9	NÃO			pico 24h	pico 6h
P15 / T2	85,2	SIM	X		aumento 6h	aumento 6h
P9 / T2	81,3	SIM	X		aumento 6h	aumento 6h
P14 / T2	78,0	SIM	X		aumento 24h	pico 6h
P1 / T4	67,8	SIM		X	não	não
P4 / T4	91,0	SIM		X	não	pico 6h
P3 / T3	86,4	SIM	X		aumento 24h	aumento 6h
P15 / T3	87,2	SIM		X	pico 24h	pico 6h

LEGENDA: T: indica número do tratamento realizado; Tam > fol.: medida do folículo no início do tratamento; ? : não foram coletadas amostras para dosagem hormonal nos momentos 6h e 24h.

Observando os resultados de postura de cada animal para o período da segunda fase, podemos verificar que as fêmeas do grupo CONTROLE produziram um total de 22 ovos durante a segunda fase (7,3 ovos/fêmea), sem nenhuma postura de ovo malformado. Nas fêmeas que foram submetidas ao tratamento, foi verificada a produção de 28 ovos durante a segunda fase, resultando numa produção de 4,8 ovos/fêmea. Somando-se este número com a postura de ovos malformados pode-se concluir que as fêmeas do grupo tratado produziram 36 ovos, o que alteraria a produção para 6 ovos/fêmea. Estes números podem indicar que a

aplicação do tratamento não foi eficaz no aumento da produção de ovos das fêmeas e, ao invés de melhorar a produtividade, o tratamento acabou provocando uma queda de produção se comparada a produção dos dois grupos de fêmeas. Para confirmar estes dados seria necessário realizar o estudo com um maior número amostral de indivíduos, já que os resultados de produção acabam se mostrando muito heterogêneos dentro dos próprios grupos.

5.4.2.2 Resultados comportamentais, hormonais e ultrassonográficos

Considerando-se os dados da observação do comportamento reprodutivo para esta fase, foi possível comparar as concentrações séricas de estradiol e progesterona entre as categorias do comportamento propostas na seção **4.2.3 Observação e avaliação do comportamento reprodutivo**.

A tabela 12 apresenta os valores de média e desvio padrão do estradiol e da progesterona para cada categoria comportamental.

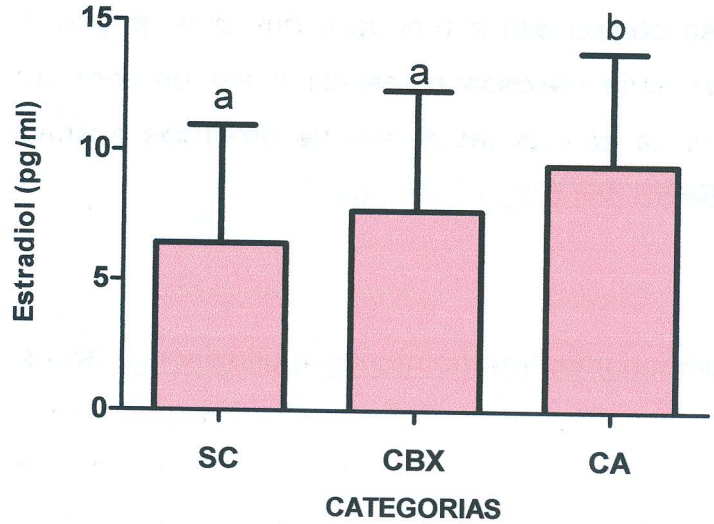
Tabela 12 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol e progesterona durante a segunda fase nas 3 categorias comportamentais estabelecidas – São Paulo/SP – 2012

CATEGORIAS	ESTRADIOL (pg/ml)	PROGESTERONA (ng/ml)
SC (n = 46)	6,42 ± 4,53 [a]	0,17 ± 0,12 [a]
CBX (n = 109)	7,69 ± 4,61 [a]	0,32 ± 0,53 [a]
CA (n = 142)	8,75 ± 10,19 [b]	0,60 ± 0,88 [b]

LEGENDA: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto. Letras sobrescritas diferentes na coluna representam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

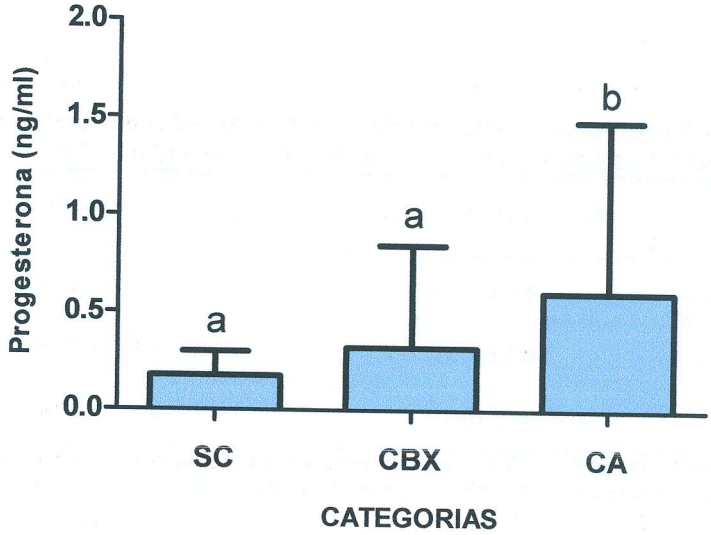
Os gráficos 36 e 37 ilustram, respectivamente, a diferença destas concentrações nas 3 categorias comportamentais estabelecidas.

Gráfico 36 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012



LEGENDA: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Gráfico 37 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona encontrada nas 3 categorias de comportamento durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012



LEGENDA: SC: sem comportamento reprodutivo; CBX: comportamento reprodutivo baixo; CA: comportamento reprodutivo alto. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Analisando-se os dados apresentados na tabela 12 e nos gráficos 36 e 37, verificou-se que existiu diferença entre as concentrações dos esteroides sexuais (estradiol e progesterona) entre as amostras de fêmeas que não demonstravam

comportamento (SC) e as que apresentavam comportamento baixo (CBX) ou que apresentaram comportamento alto (CA).

A tabela 13 apresenta a análise de correlação entre o comportamento reprodutivo, as concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona e o tamanho do maior folículo observado no exame ultrassonográfico ovariano na segunda fase.

Tabela 13 – Coeficientes de correlação (r) encontrados entre o comportamento reprodutivo (ASA+BICO+AC), as concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona e a medida do maior folículo ovariano observado no exame ultrassonográfico ovariano durante a segunda fase do estudo – São Paulo/SP – 2012

	COMP	E2	P4	CORTIC	TAM > FOL
COMP (ASA+BICO+AC)	-	r = 0,36 p < 0,0001	r = 0,45 p < 0,0001	r = -0,004 p > 0,05	r = 0,53 p < 0,0001
E2	r = 0,36 p < 0,0001	-	r = 0,50 p < 0,001	r = 0,15 p > 0,05	r = 0,32 p > 0,05
P4	r = 0,45 p < 0,0001	r = 0,50 p < 0,001	-	r = 0,28 p < 0,001	r = 0,50 p < 0,0001
CORTIC	r = -0,004 p> 0,05	r = 0,15 p > 0,05	r = 0,28 p < 0,001	-	r = -0,04 p > 0,05
TAM > FOL	r = 0,53 p < 0,00001	r = 0,32 p > 0,05	r = 0,50 p < 0,0001	r = -0,04 p > 0,05	-

Legenda: COMP: comportamento calculado pela fórmula (ASA+BICO+AC) utilizando os critérios ASA *"abaixar e bater das asas"*; BICO: *"abaixar e balançar pendular da cabeça batendo o bico"*; AC: presença de postura de aceitação de cópula.: E2: estradiol; P4: progesterona; CORTIC: corticosterona; TAM > FOL: medida do maior folículo observado no ultrassom.

A tabela 13 indica que ocorreu correlação de fraca intensidade (r = 0,36) entre o estradiol e o comportamento reprodutivo. Para a progesterona foi verificada uma correlação de média intensidade com o comportamento (r = 0,45). É interessante notar que apesar da realização dos tratamentos hormonais durante esta fase, as correlações encontradas se assemelharam bastante com as observadas na primeira fase do estudo (Tabela 10).

Os resultados apresentados na tabela 12 e 13 e os resultados da primeira fase corroboram com o que já foi descrito na literatura por Silva (2008) sobre a relação entre os esteroides sexuais e o aparecimento e modulação da intensidade do comportamento reprodutivo em fêmeas de avestruzes.

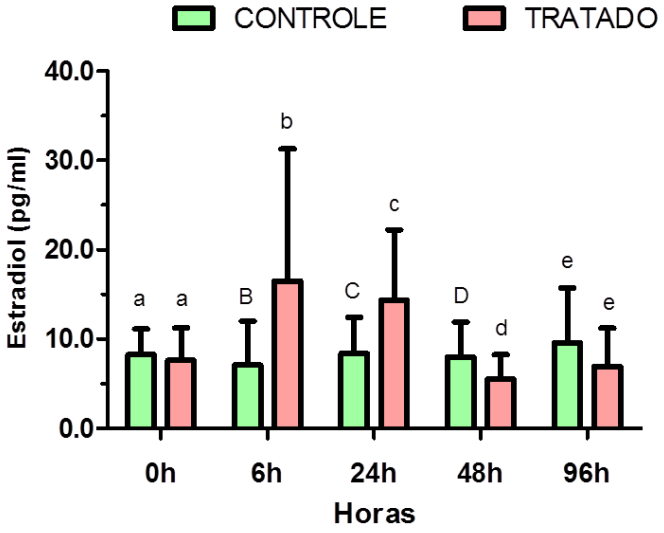
A tabela 13 apresenta também, a relação entre a medida do folículo ovariano avaliado no ultrassom com as concentrações séricas dos hormônios estudados e

com o comportamento. De acordo com os índices de correlação encontrados, nesta fase ocorreu uma correlação de média intensidade entre o tamanho do maior folículo ovariano e o comportamento reprodutivo (r = 0,53) e entre o tamanho do maior folículo ovariano e a concentração de progesterona sérica (r = 0,50). Estes resultados, novamente reforçam a hipótese de que o comportamento reprodutivo está relacionado com as concentrações séricas dos esteroides sexuais. Com o aumento do desenvolvimento ovariano, há uma maior liberação de esteroides sexuais que acabam desencadeando o aparecimento do comportamento reprodutivo e modulando a sua intensidade.

A partir da tabela 13 também é possível verificar que ocorreu uma correlação de intensidade fraca entre as concentrações de progesterona e as de corticosterona (r = 0,28).

O gráfico 38 apresenta as médias e desvio padrão da concentração sérica de estradiol em cada momento do tratamento com análogo de GnRH para o grupo CONTROLE e para o grupo TRATADO.

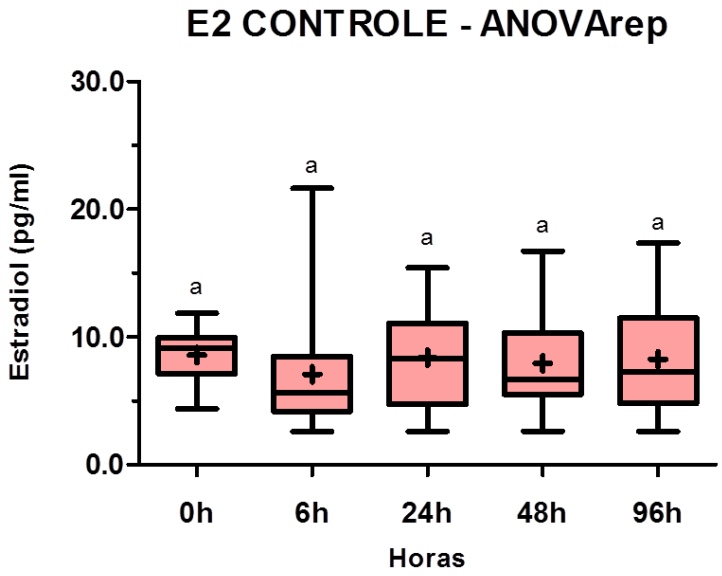
Gráfico 38 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol em cada momento do tratamento com análogo de GnRH no grupo CONTROLE e no grupo TRATADO – São Paulo/SP – 2012



Letra maiúscula indica diferença estatística entre grupo controle e tratado em cada horário (p < 0,05)

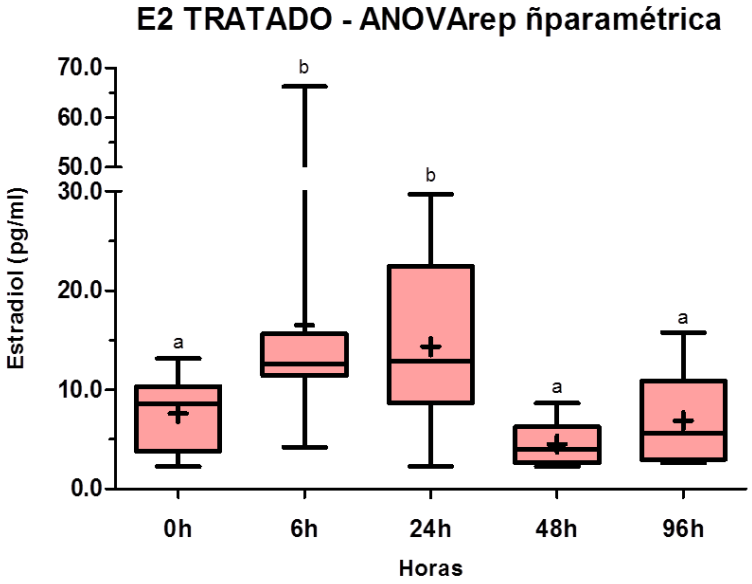
Os gráficos 39 e 40 apresentam, respectivamente, o *Box and Whiskers* das concentrações séricas de estradiol para o grupo CONTROLE e para o grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH.

Gráfico 39 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de estradiol no grupo CONTROLE em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012



Letras diferentes indicam diferença estatística significante entre os horários ($p < 0,05$). *Whiskers: min to max.*

Gráfico 40 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de estradiol no grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012



Letras diferentes indicam diferença estatística significante entre os horários ($p < 0,05$). *Whiskers: min to max.*

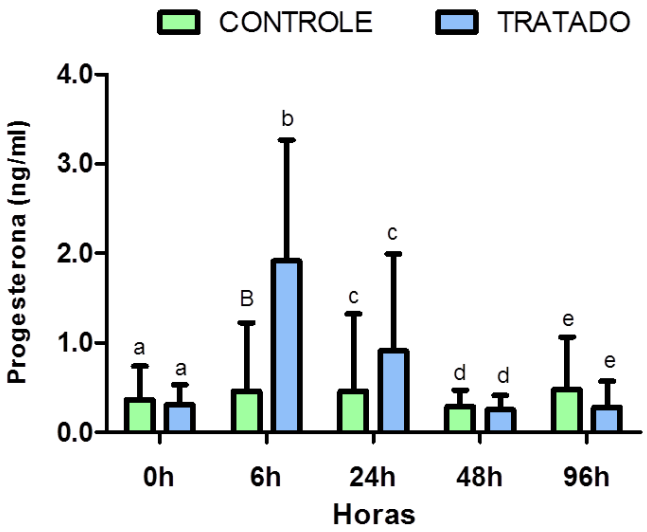
A comparação das médias de estradiol entre os grupos controle e tratado em cada momento do tratamento (Gráfico 38) demonstraram que a concentração sérica de estradiol foi maior no grupo tratado do que no controle nos momentos 6h e 24h. No momento 48h, a média de estradiol foi maior no grupo controle do que no tratado, mas, de acordo com a análise de variâncias das medidas repetidas no tempo apresentadas nos gráficos 39 e 40, esta diferença ocorreu entre concentrações séricas basais de estradiol dos grupos controle e tratado.

A partir da análise de variância das medidas repetidas no tempo das concentrações séricas de estradiol (Gráficos 39 e 40), verificou-se que no grupo controle não houve diferença significativa entre os momentos, enquanto que no grupo tratado, as concentrações séricas de estradiol nos tempos 6h e 24h foram significativamente maiores do que nos outros tempos.

Estes resultados indicam que a aplicação de 1ml (25µg) do análogo de GnRH lecirelina é capaz de provocar um aumento na concentração sérica de estradiol em fêmeas adultas de avestruzes.

O gráfico 41 apresenta as médias e desvio padrão da concentração sérica de progesterona em cada momento do tratamento com análogo de GnRH para o grupo CONTROLE e para o grupo TRATADO.

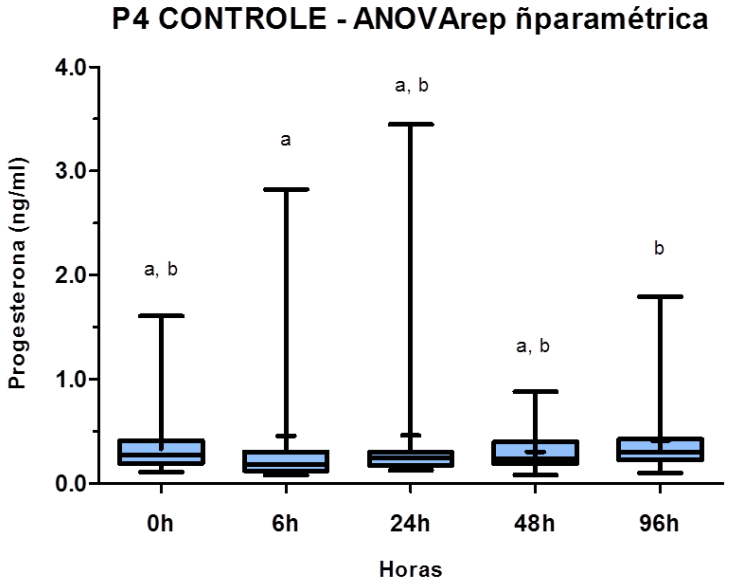
Gráfico 41 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona em cada momento do tratamento com análogo de GnRH no grupo CONTROLE e no grupo TRATADO – São Paulo/SP – 2012



Letra maiúscula indica diferença estatística entre grupo controle e tratado em cada horário ($p < 0,05$)

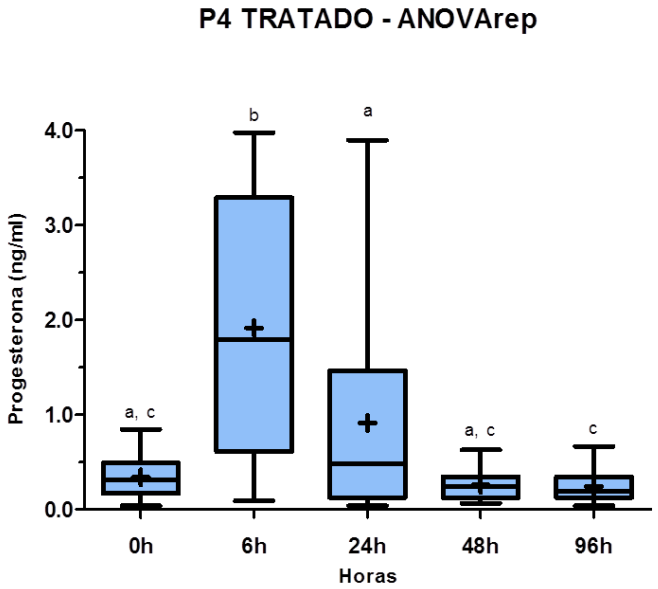
Os gráficos 42 e 43 apresentam, respectivamente, o *Box and Whiskers* das concentrações séricas de progesterona para o grupo CONTROLE e para o grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH.

Gráfico 42 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de progesterona no grupo CONTROLE em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012



Letras diferentes indicam diferença estatística significante entre os horários ($p < 0,05$). *Whiskers: min to max.*

Gráfico 43 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de progesterona no grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012



Letras diferentes indicam diferença estatística significante entre os horários ($p < 0,05$). *Whiskers: min to max.*

Comparando-se as médias de progesterona entre o grupo controle e o grupo tratado (Gráfico 41) observou-se que a concentração sérica de progesterona foi maior no grupo tratado do que no controle apenas no momento 6h.

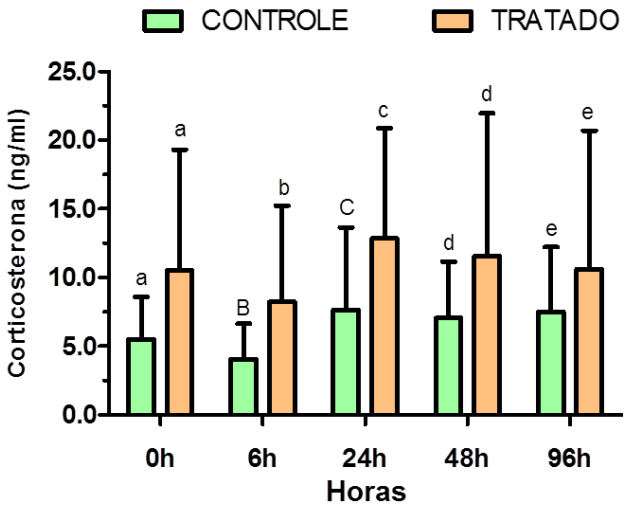
A partir da análise de variância de medidas repetidas no tempo para o grupo controle, verificou-se diferença estatística significante entre os momentos 6h e 96h (Gráfico 42). Entretanto, esta diferença ocorreu entre concentrações basais de progesterona do grupo controle.

Para o grupo tratado, a ANOVA de medidas repetidas demonstrou diferença estatística entre o momento 6h e os demais momentos (0h, 24h, 48h, 96h) e entre o momento 24h e 96h (Gráfico 43).

Estes resultados indicam que a aplicação de 1ml (25µg) do análogo de GnRH lecirelina é capaz de provocar um aumento na concentração sérica de progesterona em fêmeas adultas de avestruzes. Comparando-se os aumentos observados nas concentrações de progesterona e estradiol após a aplicação do tratamento, o aumento na concentração de progesterona parece ser mais evidente do que o aumento observado para o estradiol.

O gráfico 44 apresenta as médias e desvio padrão da concentração sérica de corticosterona em cada momento do tratamento com análogo de GnRH para o grupo CONTROLE e para o grupo TRATADO.

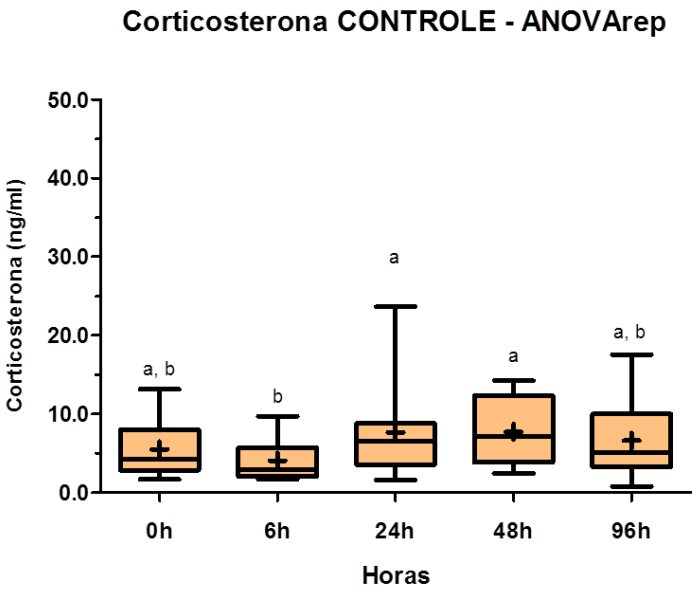
Gráfico 44 – Média ± DP da concentração sérica de corticosterona em cada momento do tratamento com análogo de GnRH no grupo CONTROLE e no grupo TRATADO – São Paulo/SP – 2012



Letra maiúscula indica diferença estatística entre grupo controle e tratado em cada horário ($p < 0,05$)

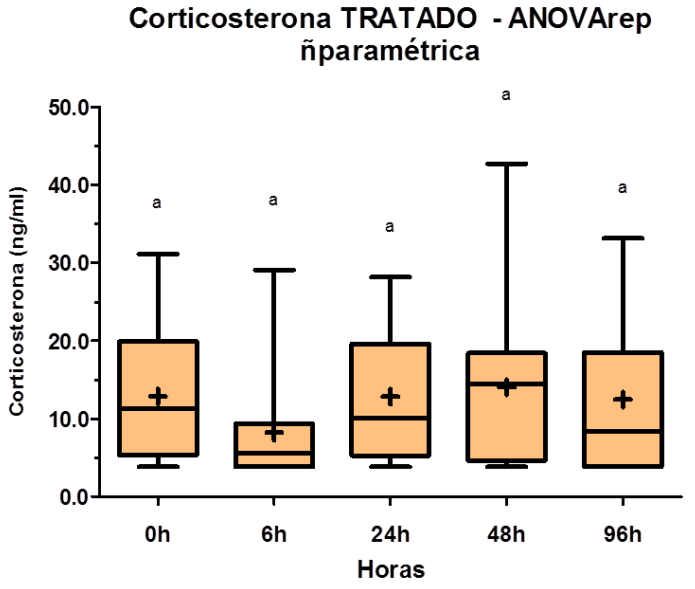
Os gráficos 45 e 46 apresentam, respectivamente, o *Box and Whiskers* das concentrações séricas de corticosterona para o grupo CONTROLE e para o grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH.

Gráfico 45 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de corticosterona no grupo CONTROLE em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012



Letras diferentes indicam diferença estatística significante entre os horários ($p < 0,05$). *Whiskers: min to max.*

Gráfico 46 – *Box and Whiskers* da concentração sérica de progesterona no grupo TRATADO em cada momento do tratamento com análogo de GnRH – São Paulo/SP – 2012



Letras diferentes indicam diferença estatística significante entre os horários ($p < 0,05$). *Whiskers: min to max.*

Analisando-se a média da concentração sérica da corticosterona entre o grupo controle e o grupo tratado em cada momento (Gráfico 44) observou-se que a concentração sérica de corticosterona foi significativamente maior no grupo tratado do que no controle nos momentos 6h e 24h.

A partir da ANOVA de repetidas no tempo para o grupo controle, verificou-se diferença estatística significante entre os momentos 6h e 24h e também entre 6h e 48h (Gráfico 45). Apesar disto estas diferenças ocorreram em valores considerados basais.

Para o grupo tratado, a ANOVA de medidas repetidas não demonstrou diferença estatística significante entre os momentos (Gráfico 46).

Os resultados obtidos nestas análises para a corticosterona sugerem que a aplicação de 1ml (25µg) do análogo de GnRH lecirelina não provoca efeito significativo na concentração sérica de corticosterona em fêmeas adultas de avestruzes.

A tabela 14 apresenta a média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona nos grupos CONTROLE e TRATADO durante toda a segunda fase do estudo.

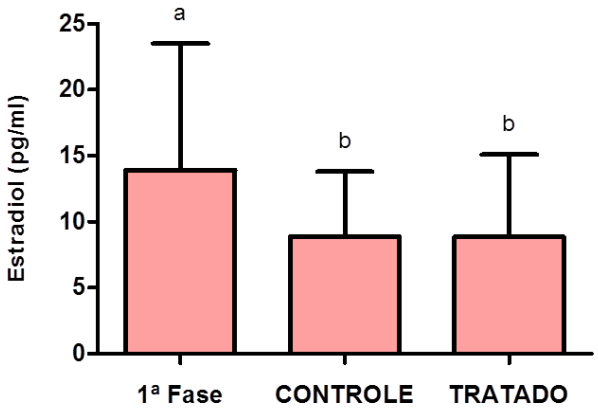
Tabela 14 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona dos grupos CONTROLE e TRATADO durante a segunda fase – São Paulo/SP – 2012

	ESTRADIOL (pg/ml)	PROGESTERONA (ng/ml)	CORTICOSTERONA (ng/ml)
CONTROLE	8,86 ± 4,95 [a]	0,48 ± 0,70 [a]	6,39 ± 4,34 [a]
TRATADO	8,86 ± 6,23 [a]	0,53 ± 0,88 [a]	10,77 ± 8,99 [b]

Letras sobrescritas diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

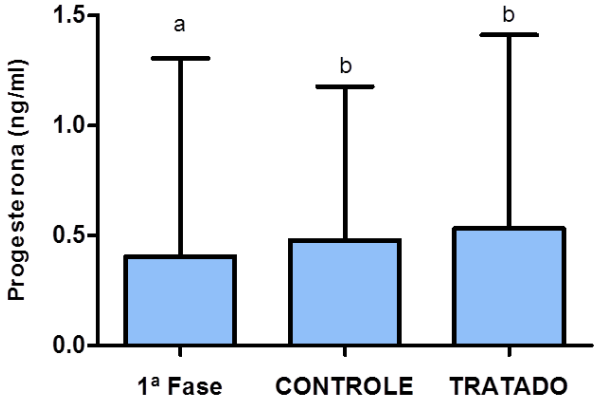
Os gráficos 47 e 48 apresentam, respectivamente, as concentrações médias de estradiol e progesterona da primeira fase, do grupo controle e do grupo TRATADO na segunda fase.

Gráfico 47 – Média ± DP da concentração sérica de estradiol da primeira fase e dos grupos controle e tratado na segunda fase do estudo – São Paulo/SP – 2012



Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Gráfico 48 – Média ± DP da concentração sérica de progesterona da primeira fase e dos grupos controle e tratado na segunda fase do estudo – São Paulo/SP – 2012



Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Comparando-se as médias de estradiol e progesterona de toda a segunda fase, não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado (Tabela 14 e Gráficos 47 e 48). Por isto, podemos sugerir que as fêmeas do estudo estavam apresentando uma mesma condição endócrino-reprodutiva durante esta fase. Com relação à concentração sérica de corticosterona, a média encontrada no grupo tratado foi significativamente maior do que a média verificada para o grupo controle. Este achado pode indicar que as fêmeas submetidas ao tratamento com

análogo de GnRH estariam mais estressadas, o que poderia explicar a menor produção de ovos deste grupo e a alta taxa de ovos malformados nos tratamentos.

Observando-se o gráfico 47, verifica-se que a concentração sérica média de estradiol é maior na primeira fase do que na segunda fase (controle e tratados). No gráfico 48, verifica-se que a concentração sérica de progesterona é menor na primeira fase do que na segunda fase. Estes resultados podem estar relacionados a ação de fatores climáticos como o fotoperíodo (Gráfico 24) ou em resposta ao estresse provocado pela aplicação e acompanhamento dos efeitos do tratamento com análogo de GnRH durante a segunda fase.

As concentrações séricas de estradiol e progesterona encontradas neste estudo foram semelhantes às encontradas na literatura em outros estudos realizados em fêmeas de avestruzes (DEGEN et al., 1994; BRONNEBERG et al., 2007a, b, 2009; SILVA, 2008).

Com o objetivo de se comparar a postura entre as 2 fases do estudo, a quantidade de ovos postos em cada fase foi dividida pelo número de fêmeas estudadas e pelo número de dias de duração da fase em questão.

Realizando este cálculo, para a primeira fase obtivemos um índice de 0,0477 ovos/fêmea/dia. Para a segunda fase o índice para as fêmeas do grupo controle foi de 0,10 ovos/fêmea/dia e para o grupo tratado foi de 0,063 ovos/fêmea/dia. Ao comparar os índices do grupo controle e tratado com o observado para a primeira fase, nota-se que a produtividade durante a segunda fase do estudo foi maior do que a da primeira fase. Uma possível causa para este aumento talvez seja o incremento do fotoperíodo (Gráfico 24), que estaria estimulando positivamente a resposta reprodutiva das fêmeas ao longo do estudo. Outra hipótese possível é a adaptação das fêmeas ao manejo do experimento. Durante a primeira fase elas podem ter apresentado um pior desempenho reprodutivo por uma resposta de estresse mais intensa até se acostumarem com o manejo, o que possibilitaria uma recuperação da atividade reprodutiva.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer do estudo e das análises dos resultados, tornou-se perceptível as dificuldades de se trabalhar com um número amostral reduzido. Apesar disto, os resultados trouxeram diversos resultados novos e interessantes.

O fato de terem sido estudados animais de um pequeno proprietário, limitou as possibilidades experimentais na medida em que se evitou ao máximo, incorrer em prejuízos financeiros. A propriedade utilizada não possuía manejo rotineiro de contenção dos animais, o que pode, em alguma medida, ter interferido com os resultados hormonais e do tratamento.

A inexistência de uma dose específica de GnRH para avestruzes, pode também ter interferido com a consistência dos resultados por ter sido utilizada uma dose recomendada pelo fabricante para outra espécie.

Como as amostras de soro estão armazenadas sob congelamento, pretende-se realizar em breve as mensurações das concentrações de corticosterona na primeira fase, o que permitirá uma análise comparativa com a segunda fase, em termos de intensidade de estresse.

7 CONCLUSÕES

Através deste estudo conclui-se que:

Foi possível caracterizar os perfis séricos dos hormônios esteroides estradiol e progesterona em fêmeas adultas de avestruz durante a estação reprodutiva;

Existem correlações entre as concentrações séricas de estradiol e de progesterona, o comportamento reprodutivo e o desenvolvimento ovariano observado por exame de ultrassonografia;

O exame ultrassonográfico permite uma boa e rápida maneira de avaliar a condição ovariana em fêmeas de avestruz, podendo ser utilizado para acompanhar futuros tratamentos reprodutivos em fêmeas de avestruzes;

A avaliação do comportamento reprodutivo através da metodologia utilizada neste estudo pode contribuir para estimar a condição reprodutiva de fêmeas de avestruz;

O tratamento proposto com o análogo de GnRH lecirelina é eficiente na indução da ovulação em fêmeas de avestruz, desde que sejam aplicados em fêmeas que apresentem ovário bem desenvolvido;

Mais estudos são necessários para que tratamento com análogos de GnRH possam ser aplicados comercialmente para melhorar a produção de ovos em fêmeas de avestruz.

REFERÊNCIAS

BAHR, J. M.; JOHNSON P. A. Reproduction in poultry. In: CUPPS, P. T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1991. p. 555-575.

BARBOSA, C. A.; CAMPELO, E. H. R.; PEREIRA, M. C.; MICHELS, I. L. Panorama da Cadeia de Estrutiocultura no Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 45., Londrina. 2007. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/6/1055.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2012.

BENNETT, E. J. **Hormonal stimulation of ovarian development, ovulation and oviposition in Japanese quail**. Thesis, Massey University, New Zealand. 2002. 198 p.

BENTLEY, G. E.; JENSEN, J. P.; KAUR, G. J.; WACKER, D. W.; TSUTSUI, K.; WINGFIELD, J. C. Rapid inhibition of female sexual behavior by gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). **Hormones and Behaviour**, v. 49, p. 550-555, 2006.

BERTRAM, B. C. R. Ostriches recognize their own eggs and disregard others. **Nature**, v. 279, p. 233-234, 1979.

BERTRAM, B. C. R. **The ostrich communal nesting system**. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 1992. 196 p.

BLUHM, C. K.; PHILLIPS, R. E.; BURKE, W. H. Serum levels of luteinizing hormone, prolactin, estradiol and progesterone in laying and nonlaying mallards (*Anas platyrhynchos*). **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 295-305, 1983.

BRONNEBERG, R. G. G. **Basic and applied aspects of female reproduction in farmed ostriches**. 2008. 162 p. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. Netherlands, Utrecht, 2008.

BRONNEBERG, R. G. G.; STEGEMAN, J. A.; VERNOOIJ, J. C. M.; DIELEMAN, S. J.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V.; TAVERNE, M. A. M. Changes in numbers of large ovarian follicles, plasma luteinizing hormone and estradiol-17β concentrations and egg production figures in farmed ostriches throughout the year. **Theriogenology**, v. 67, p. 1492-1502, 2007a.

BRONNEBERG, R. G. G.; TAVERNE, M. A. M. Ultrasonography of the female reproductive organs in farmed ostriches (*Struthio camelus* spp.). **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 617-633, 2003.

BRONNEBERG, R. G. G.; TAVERNE, M. A. M.; DIELEMAN, S. J.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V.; VERNOOIJ, J. C. M.; STEGEMAN, J. A. The relation between ultrasonographic observations in the oviduct and plasma progesterone, luteinizing hormone and estradiol during the egg laying cycle in ostriches. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 32, p. 15-28, 2007b

BRONNEBERG, R. G. G.; TAVERNE, M. A. M.; PIJPERS, A. Reproduction in farmed ostriches: a veterinary approach. In: OUTCOME AND PERSPECTIVES OF COLLABORATIVE RESEARCH, 10th SYMPOSIUM ON TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION, Utrecht, the Netherlands, 1999.

BRONNEBERG, R. G. G.; VERNOOIJ, J. C. M.; STEGEMAN, J. A.; TAVERNE, M. A. M. Follicle dynamics and its relation with plasma concentrations of progesterone, luteinizing hormone and estradiol during the egg-laying cycle in ostriches. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p 705-713, 2009.

BRUSTOLIN, V.; Panorama Atual da Estrutiocultura no Brasil 2011. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA – PECNORDESTE, 15. Fortaleza. 2011. Disponível em: <http://www.pecnordeste.com.br/pec2011/documentos/ESTRUTIOCULTURA/Panorama%20Atual%20da%20Estrutiocultura%20no%20Brasil%202011.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2011.

BUBIER, N. E.; PAXTON, C. G. M.; BOWERS, P.; DEEMING, D. Courtship behaviour of ostriches (*Struthio camelus*) towards humans under farming conditions in Britain. **British Poultry Science**, v. 39, p. 477-481, 1998.

BURKE, W. H.; COGGER, E. A. The effect of luteinising hormone releasing hormone (LH-RH) on serum LH and ovarian growth in turkeys. **Poultry Science**, v. 56, p. 234-242, 1977.

CARBÓ, C. B. **Producción del avestruz:** aspectos claves. 2. ed. Espanha: Mundi-Prensa, 2003. 798 p.

CARRER, C. C. O mercado de avestruzes no Brasil e no mundo. **Struthio & Cultura,** v. 3, n. 10, p. 14-15, 2004.

CARRER, C. C.; ELMÔR, R. A.; KORNFELD, M. E.; CARVALHO, M. C. **A criação do avestruz:** guia completo de A a Z. São Paulo: Grupo Ostrich do Brasil, 2004. 255 p.

CARRER, C. C.; KORNFELD, M. E. **A criação de avestruzes no Brasil.** São Paulo: Brasil Ostrich, 1999. 304 p.

CARTEE, R. E.; RUMPH, P. F.; ROLAND, D.; STEELE, D. E. Ultrasonographically detectable ring structure in avian (*Gallus gallus*) egg yolks. **Anatomia Histologia Embryologia** v. 21, p. 57-64, 1992.

CHATDARONG, K.; PONGLOWHAPAN, S.; KARLSSON, A.; LINDE-FORBERG, C. C. The effect of ACTH stimulation on cortisol and progesterone concentrations in intact and ovariohysterectomized domestic cats. **Theriogenology**, v. 166, n. 6, p. 1482-1487, 2006.

CLOETE, S. W. P.; VAN SCHALKWYK, S. J.; BRAND, Z. Ostrich breeding - progress towards a scientifically based strategy**.** In: INTERNATIONAL RATITE CONGRESS, 2., 1998, Oudtshoorn, South Africa. **Proceedings of the 2th International Ratite Congress**, 1998. p. 55-62.

COSTANTINI, V.; CARRARO, C.; BUCCI, F. A.; SIMONTACCHI, C.; LACALANDRA, G. M.; MINOIA, P. Influence of a new slow-release GnRH analogue implant on reproduction in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805**). Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 289-301, 2009.

CRAMP, S.; SIMMONS, K. E. L.; FERGUSSON-LEES, I. J.; GILMOR, R.; HOLLOM, P. A. D., HUDSON, R; NICHOLSON, E. M.; OGILVIE, M. A.; OLNEY, P. J. S.; VOOUS, K. H. ; WATTEL, I. J. Order *Struthioniformes*. In: **Handbook of the birds in Europe, the Middle East and North Africa.** Oxford: Oxford University Press, 1977. v. 1, p. 37-41.

DEEMING, D. C. Production, fertility and hatchability of ostrich (*Struthio camelus*) eggs on a farm in the United Kingdom. **Animal Science,** v. 63, p. 329-336. 1996.

DEEMING, D. C. (Ed.). **The ostrich:** biology, production and health**.** Cambridge: CABI Publishing, 1999. 358 p.

DEGEN, A. A.; WEIL, S.; ROSENSTRAUCH, M. K.; KAM, M.; DAWSON, A. Seasonal plasma levels of luteinizing hormone and steroid hormones in male and female domestic ostriches (*Struthio camelus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 93, p. 21-27, 1994.

DRENOWATZ, C.; SALES, J. D.; SARASQUETA, D. V.; WEILBRENNE, A. History and geography. In: DRENOWATZ, C. **The Ratite Encyclopedia.** Ratite records. San Antonio, Texas, 1995, p. 3-29.

EL HALAWANI, M. E.; SILSBY, J. L.; ROZENBOIM, I.; PITTS, G. R. Increased egg production by active immunization against vasoative intestinal peptide in the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 179-183, 1995.

ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. Wallingford, Oxon: CAB International, 1996. 318 p.

ETCHES, R. J.; CROZE, F. Plasma concentrations of LH, orogesterone and corticosterone during ACTH- and corticosterone-induced ovulation in the hen (*Gallus domesticus*) . **General and Comparative Endocrinology**, v. 50, p 359-365, 1983.

FOWLER, M. E. **Zoo & wild animal medicine.** 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. 1127 p.

HATORI, A.; ISHII, S.; WADA, M. Effects of two kinds of chicken luteinising hormone releasing hormone (LH-RH), mammalian LH-RH and its analogues on the release of LH and FSH in Japanese quail and chicken. **General and Comparative Endocrinology**, v.64, p. 446-455, 1986.

HICKS, K.D**.** Ratite reproduction. In: **Proceedings of Association of Avian Veterinarians**, p. 318-325. 1992.

HILDEBRANDT, T. B.; GÖRITZ, F. Ultrasonography as a tool in propagation of zoo animals. In: **Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians**, East Lansing, Michigan, USA, 1995. p. 356-364.

HILDEBRANDT, T.; PITRA, C.; SÖMMER, P.; PINKOWSKI, M. Sex identification in birds of prey by ultrassonography. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 26, n. 3, p. 367-376, 1995.

HURXTHAL, L. M. **Breeding behaviour of the ostrich (*Struthio camelus massaicus)***. 1979. 600p. PhD thesis, University of Nairobi, Kenya, 1979.

İPEK, A.; ŞAHAN, Ü. Effect of breeder age and breeding season on egg production and incubation in farmed ostriches. **British Poultry Science,** v. 45, n. 5, p. 643-647, 2004.

JARVIS, M. J. F.; JARVIS, C.; KEFFEN, R. H. Breeding seasons and laying patterns of the southern African ostrich *Struthio camelus*. **Ibis**. v.127, n. 4, p. 442-449, 1985.

JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. **Zoo Biology**. v. 25, n. 1, p. 25-34, Jan./Fev. 2006.

JOHNSON, A. L.; DICKERMAN, R. W.; ADVIS, J. P. Comparative ability of chicken and mammalian LHRH to release LH from rooster pituitary cells in vitro. **Life Science**, v. 34, n. 19, p. 1847-1851, 1984.

JOHNSON, A. L; JOHNSON, P. A.; VAN TIENHOVEN, A. Ovulatory response, and plasma concentrations of luteinising hormone and progesterone following administration of synthetic mammalian or chicken luteinising hormone-releasing hormone relative to the first or second ovulation in the sequence of the domestic hen. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 646-655, 1984.

JOHNSON, A. L.; VAN TIENHOVEN, A. Hypothalamo-hypophyseal sensitivity to hormones in the hen. II. Plasma concentrations of LH, progesterone, and testosterone in response to peripheral and central injections of LHRH or testosterone. **Biology of Reproduction,** v. 25, p. 153-161, 1981.

KÄHN, W. Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. **Animal Reproduction Science,** v.28, p. 1-10, 1992.

LÈCHE, A.; BUSSO, J. M.; HANSEN, C.; NAVARRO, J. L.; MARÍN, R. H.; MARTELLA, M. B. Physiological stress in captive greather rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, p. 188-191, 2009.

LUDDERS, J. W.; LANGENBERG, J. A.; CZEKALA, N. M.; ERB, H. N.; MCCORMICK, H. Serum corticosterone response to adrenocorticotropic hormone stimulation in Florida sandhill cranes. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 4, p. 715-721, 1998.

MAILHAC, J. M.; CHAFFAUX, S.; LEGRAND, J. J.; CARLIER, B.; HEITZ, F. Diagnostic de la gestation chez la chatte: utilisation de l'échografie. **Recueil de medecine veterinaire.** v. 156, n. 12, p.899-907, 1980.

MCMILLAN, M.C. Imaging Techniques. In: RITCHIE, B. W. ; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine**: principles and application. Flórida: Lake Worth, 1994. p. 246-326.

MORE, S. J. The performance of farmed ostrich hens in eastern Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 29, n. 2, p. 107-120, 1996.

MUNIZ, L. R. Estatística do atual rebanho de avestruzes no Brasil. In: _____. **Anuário da estrutiocultura brasileira - 2005/06:** edição histórica e comemorativa. São Paulo: Associação dos Criadores de Avestruzes do Brasil, 2005. p. 107-112.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology,** v.13, p. 203-216. 1980.

PINHEIRO, L. A. S.; PINHEIRO, L. E. L.; PINHEIRO, L. S. Reprodução das Aves e Avestruzes: perspectivas futuras. **Avicultura Industrial**, v. 96, n. 11, n. 1129, p. 106-112, 2004.

PINHEIRO, L. A. S.; PINHEIRO, L. E. L.; SILVEIRA, L. H.; PINHEIRO, L. M. S. Estrutiocultura brasileira: aspectos reprodutivos e econômicos – Mini-revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 4, p. 292-296, 2002.

REDDY, I. J.; DAVID, C. G.; RAJU, S. S. Effect of suppression of plasma prolactin on luteinizing hormone concentration, intersequence pause days and egg production in domestic hen. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 2, p. 167-175, 2007.

REEVES, J. J.;HARRISON, P. C.; CASEY, J. M.; Ovarian development and ovulation in hens treated with synthetic (porcine) luteinising hormone releasing hormone/follicule-stimulating hormone releasing hormone (LHRH/FSHRH). **Poultry Science**, v. 52, p. 1883-1886, 1973.

RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine:** principles and application. Flórida: Wingers, 1994.

ROBBE, D.; TODISCO, G.; GIAMMARINO, A.; PENNELLI, M.; MANERA, M. Use of a synthetic GnRH analog to induce reproductive activity in canaries (*Serinus canaria*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 123-126, 2008.

SALES, J. Slaughter and products. In: DEEMING, D. C. (Ed.). **The ostrich:** biology, production and health**.** Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 1999. p. 231-274.

SAUER, E. G. F. Aberrant sexual behaviour in the South African ostrich. **Journal of the American Ornithologists' Union**, v. 89, n. 4, p. 717-737, 1972.

SAUER, E. G. F.; SAUER, E. M. The behaviour and ecology of the South African ostrich. **Living Bird**, v. 5, p. 45-75, 1966. Supplement.

SHARP, P. J.; DAWSON, A.; LEA, R. W. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119, n. 3, pt. C, p. 275-282, 1998.

SHARP, P. J.; GOW, C. B. Neuroendocrine control of reproduction in the cockerel. **Poultry Science**, v. 62, n. 8, p 1671-1675, 1983.

SHARP, P. J.; STERLING, R. J.; DE MILTON, R. C.; MILLAR, R. P. Effect of luteinising hormone releasing hormone and its analogues on plasma luteinising hormone concentrations in incubating bantam hens. **British Poultry Science**, v. 21, n. 1, p. 129-135, 1986.

SILVA, G. C. O. **Estudo do perfil sérico dos hormônios esteróides (estradiol e progesterona) e do comportamento reprodutivo de fêmeas jovens de avestruz (*Struthio camelus*) criadas no Brasil.** 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SMIT, D. J. V. Z. Ostrich farming in the Little Karoo. **Bulletin of the Department of Agricultural Technical Services**, n. 358, p. 103, 1963.

SOLEY, J. T.; GROENEWALD, H. B. Reproduction. In: DEEMING, D. C. (Ed) **The ostrich:** biology, production and health. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 1999. p. 129-158.

SPELMAN, L. H.; FLEMING, J.; DAVIS, G. S.; STOSKOPF, M. K. Effect of exogenous adrenocorticotropic hormone administration on plasma corticosterone concentrations in american black ducs (*Anas rubripes*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p 136-141, 1995.

STERLING, R. J.; SHARP, P. J. A comparison of the luteinising hormone-releasing activities of synthetic chicken luteinising hormone-releasing hormone (LH-RH), synthetic porcine LH-RH, and Buserelin, an LH-RH analogue, in the domestic fowl. **General and Comparative Endocrinology**, v. 55, p. 403-471, 1984.

SUZAN, E.; GARNEIRO, A. H. Perspectivas e desafios do Sistema Agroindustrial do Avestruz no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 37, n. 10, p. 44-59, 2007.

TAVERNE, M. A. M.; WILLEMSE, A. H.; **Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction.** Boston: Kluwer Academic Publishers. 1989.

TSUMA, V. T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A. FORSBERG, M.; LUNDEHEIM, N. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 39, n. 1, p. 71-76, 1998.

TSUTSUI, K. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. **Progress in Neurobiology**, n. 88, p. 76-88, 2009.

UBUKA, T.; KIM, S.; YU-CHI HUANG; REID, J.; JIANG, J.; OSUGI, T.; CHOWDHURY, V. S.; KAZUYOSHI, T., BENTLEY, G. E. Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European Starling brain. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 268-278, 2008.

VAN LIER, E.; ANDERSON, H.; CLARIGET, R. P.; FORSBERG, M. Effects of administration of adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) on extragonadal progesterone levels in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 2, p 55-59, 1998.

VAN SCHALKWYK, S. J.; CLOETE, S. W. P.; de KOCK, J. A. Repeatability and phenotypic correlations for body weight and reproduction in commercial ostrich breeding pairs. **British Poultry Science** v. 37, p. 953-962, 1996.

WAGNER, W.M.; KIRBERGER, R.M. Transcutaneous ultrasonography of the coelomic viscera of the ostrich (*Struthio camelus*). **Veterinary Radiology & Ultrasound**. v. 42, p.546-552, 2001.

WILLIAMS, J. Ratites: Diagnostic imaging. **Veterinary Clinics of North America:** Food Animal Practice. v. 14, p. 427-435, 1998.

WILSON, S. C.; CUNNINGHAM, F. J.; CHAIRIL, R. A.; GLADWELL, R. T. Maturational changes in the LH response of domestic fowl to synthetic chicken LHRH-I and -II. **Journal of Endocrinology**, v. 123, p. 311-318, 1989.

YANG, P.; MOHAMED, S. M.; WATANABE, G.; TAYA, K. Developmental changes of plasma inhibin, gonadotropins, steroid hormones, and thyroid hormones in male and female Shao ducks. **General and Comparative Endocrinology**, v. 143, p. 161-167, 2005.

YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Plasma cortisol and progesterone responses to low doses of adrenocorticotropic hormone in ovariectmized lacting crows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 6, p 797-803, 2006.