

HERIBERTO BARBOSA MOYANO

**HORMÔNIOS ESTEROIDES COMO MEDIADORES
ALOSTÁTICOS E REPRODUTIVOS NA
CORUJINHA-DO-MATO (*Megascops choliba*)**

São Paulo

2022

HERIBERTO BARBOSA MOYANO

**Hormônios esteroides como mediadores alostáticos e reprodutivos na
Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*)**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2022

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. 4232
FMVZ

Moyano, Heriberto Barbosa
Hormônios esteroides como mediadores alostáticos e reprodutivos na Corujinha-do-mato
(*Megascops choliba*) / Heriberto Barbosa Moyano. – 2022.
165 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Estresse. 2. Imunoensaios. 3. PCR. 4. Strigiformes. 5. Sazonalidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Alterações sazonais testiculares, endócrinas e gênicas em rapinantes da espécie *Megascops choliba* (Strigidae), no estado de São Paulo", protocolada sob o CEUA nº 6896290419 (ID 007199), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira** e equipe; *Heriberto Barbosa Moyano* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/11/2019.

We certify that the proposal "Seasonal testicular, endocrine and genetic changes in Tropical Screech-owl *Megascops choliba* in the state of São Paulo", utilizing 25 Birds (males and females), protocol number CEUA 6896290419 (ID 007199), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira** and team; *Heriberto Barbosa Moyano* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/27/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2019** a **06/2022**

Área: **Reprodução de Aves**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **8 a 36 meses**

N: **25**

Linhagem: **Megascops choliba**

Peso: **70 a 90 g**

Local do experimento: Coleta das Amostras: Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3) e na Estação Biológica de Boracéia [] EBB no município de Salesópolis em São Paulo (Brasil) Processamento e análise das amostras: Laboratório de Dosagens Hormonais -FMVZ-USP

São Paulo, 04 de julho de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Variação e comparação na produção de metabolitos de glicocorticoides em *Athene cunicularia* e *Megascops choliba* (Strigidae)", protocolada sob o CEUA nº 8440150719 (ID 007594), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira** e equipe; *Heriberto Barbosa Moyano* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/03/2020.

We certify that the proposal "Variation and comparison in the production of glucocorticoid metabolites in *Athene cunicularia* and *Megascops choliba* (Strigidae)", utilizing 16 Birds (males and females), protocol number CEUA 8440150719 (ID 007594), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira and team; Heriberto Barbosa Moyano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/18/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2020** a **12/2020**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 24 meses**

N: **16**

Linagem: **Aves ordem Strigiformes**

Peso: **70 a 160 g**

Local do experimento: Coleta das Amostras: Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3)
Processamento e análise das amostras: Laboratório de Dosagens Hormonais -FMVZ-USP

São Paulo, 04 de julho de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Reabilitação de corujinha do mato (*Megascops choliba*), uma visão comportamental, endócrina e imunológica", protocolada sob o CEUA nº 8414141021 (ID 009199), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira e equipe; Heriberto Barbosa Moyano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/02/2022.

We certify that the proposal "Rehabilitation of Tropical screech owl (*Megascops choliba*) a behavioral, endocrine and immunological view", utilizing 12 Birds (males and females), protocol number CEUA 8414141021 (ID 009199), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira and team; Heriberto Barbosa Moyano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/03/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2021 a 02/2022**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 36 meses**

N: **12**

Linhagem: **Megascops choliba**

Peso: **90 a 130 g**

Local do experimento: **Divisão da Fauna Silvestre - Unidade Anhanguera / CeMaCAS Estr. de Perus, 300 - São Paulo - SP, 05276-110**

São Paulo, 04 de julho de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARBOSA-MOYANO, Heriberto

Título: Hormônios esteroides como mediadores alostáticos e reprodutivos na
Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*)

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.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicado a todos aqueles que perderam
seus familiares e amigos durante a pandemia.

In memoriam de Mi Tía Mary & Carmen C

AGRADECIMENTOS

Para realizar o presente estudo tive que bater em várias portas, muitas delas permitiram o meu ingresso com a minha mala cheia de *corujas*, outras permaneceram em silêncio. Sou grato a todos aqueles que acreditaram nesta bonita jornada. Juntos, estamos contribuindo de diferentes formas em prol dos animais silvestres.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, por me receber em seu grupo de pesquisa e permitir a realização de todos os projetos idealizados, obrigado pela confiança que o senhor depositou em mim.

A MSc. Carolina Lorieri Vanin, minha amiga-irmã que São Paulo me deu, que esteve sempre disponível sem se importar o quão ocupada estivesse.

Sou muito grato com todo o pessoal do CeMaCAS, sem vocês não teria sido possível esta pesquisa. Em especial para a Diretora Juliana Laurito Summa e o Veterinário e Biólogo Francisco Miguel Conde Jimenez Fernandes da Cruz, exemplos de dedicação no árduo trabalho com animais silvestres. As Médicas Veterinárias Melissa Peixoto Prospero, Ticiane Zwarg e Alice Soares de Oliveira. As biólogas Juliana Madeiros Russo, Amanda Aparecida Cardoso Coimbra, Clarice Thomaz e Patrícia Adalgisa Alves. Ofereço minhas desculpas por não incluir todos os nomes da família CeMaCAS mas saibam que sou muito grato com toda a ajuda que sempre estiverem dispostos em me brindar, incluído também o Sr. Marcio Aparecido Buava, pelo cuidado excepcional com minhas corujinhas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis, sem sua participação ativa neste projeto não teria sido possível a aprovação pela FAPESP. Às Doutoradas Thais Rose dos Santos Hamilton e Camila Mota Mendes pois fizeram possível os experimentos gênicos.

Ao Prof. Dr. Luís Fabio Silveira, cujas noites corujando acompanhadas das aulas de Tupi-Guarani ficarão guardadas para sempre. Ao Biólogo Igor Ferreira de Alvarenga pela sua disponibilidade e bonita vontade para realizar a coleta das corujas.

Ao Dr. Rogerio Loesch Zacariotti, que sempre esteve disponível, mesmo nos difíceis momentos impostos pela restrição da quarentena.

Às Professoras Dra. Silvia Gaido Cortopassi e Dra. Tania de Freitas Raso por terem me dado a oportunidade de participar no programa PAE, em especial a Dra. Silvia por esses abraços cheios de carinho.

À Dra. Claudia Stricagnolo do Departamento de Clínica Médica USP por me socorrer nos equipamentos para realizar a dosagem dos hormônios.

Às secretarias do programa VRA/USP Harumi Doi Shiraishi e Loide Her Cardoso Santos, vocês representam o bom sentido da palavra decência. Sempre estarei grato pelas orientações nos difíceis processos burocráticos.

Ao Prof. Dr. Fernando Ribeiro, Dra. Stefanny Titon, Dra. Aymam de Figueiredo pertencentes ao Instituto de Biociências, pela ajuda na realização do Capítulo 3 desta Tese de Doutorado.

À equipe do laboratório de Neuroanatomia Química do ICB, em especial ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt e a Dra. Daniela Sabino Battagello. Também sou muito grato com a Prof. Dra. Maria Inês Nogueira e Kelly Nery Borgues do ICB por sua constante amabilidade.

Ao pessoal do laboratório de Dosagens Hormonais LDH, Dra. Priscilla Viau Furtado e o Prof. Dr. Guilherme Pugliesi por me permitiram realizar a extração dos hormônios em suas instalações. Em especial a Dra. Gisele Sobral Barbosa por sua parceira e troca de ideias para a realização do Capítulo 1.

A MSc. Mayra Frediani e MSc. Ammir Yacoub Helou, pela ajuda nos experimentos de neuroanatomia, mas que por motivo de tempo não foram incluídos como Capítulos 6 e 7 no presente documento. Obrigado por me mostrarem um novo horizonte a ser explorado, por isso, e muito mais, estarei eternamente grato.

Ao Prof. Dr. Ignacio Moore, da Universidade de Virginia Tech, por sua disponibilidade e interesse em me receber no seu laboratório, infelizmente e devido às restrições da pandemia, não foi possível conhecer pessoalmente.

Experimentei e errei, tentei de novo e consegui *gracias* ao apoio de minha família e amigos quem sempre acreditaram em mim. A Oziris Oliveira e Rodrigo Luís Santos vocês também são parte de minha família, obrigado por acreditar nas minhas capacidades, por chorar juntos e me abraçar nesta jornada cheia de retos e desafios.

Agradeço também os Professores Doutores membros da Banca que aceitaram gentilmente a participação na discussão do presente documento.

Este estudo não teria disso possível sem o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP N° 2021/08898-2 e da Bolsa de Doutorado Institucional (07/2018-06/2022) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil CAPES.



Código Financeiro 001
Bolsa de Doutorado HBM
07/2018 - 06/2022



Auxílio à Pesquisa
Bolsa n° 2021/08898-2

RESUMO

BARBOSA-MOYANO, H. **Hormônios esteroides como mediadores alostáticos e reprodutivos na Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*)**. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As aves de rapina exercem um efeito estabilizador nos ecossistemas controlando a população de roedores e insetos, contribuindo desta forma na manutenção de altos índices da biodiversidade. Apesar da importância ecológica destas aves, seus processos neuroendócrinos responsivos aos fatores ambientais são pouco conhecidos. Neste contexto, foram estudadas corujas adultas da espécie *Megascops choliba* em três vertentes: dosagem hormonal, expressão gênica e comportamento, separando as hipóteses e seus respectivos resultados em cinco capítulos. Os dados endócrinos correspondem a aves avaliadas em cativeiro. Para este fim, amostras de sangue e fezes das corujas foram analiticamente processadas, e os níveis dos hormônios esteróides foram determinados por métodos de imunoenensaio enzimático (EIA). Os esteroides estudados foram corticosterona (B), estradiol (E2), testosterona (T) e seus respectivos metabólitos: glicocorticoides (MGC), estrógenos (ME) e andrógenos (MA). Os EIA foram validados analítica e fisiologicamente para *M. choliba*. A variabilidade nos níveis de MGC foi comprovada estatisticamente, identificando-se a influência de fatores externos ambientais, como o fotoperíodo, e fatores internos, como o temperamento e o padrão de atividade comportamental. No entanto, não foi identificada diferença significativa nos níveis de MGC relacionadas ao sexo. A sazonalidade reprodutiva dos machos foi comprovada por conta dos significativos aumentos serológicos de T (julho-agosto), os quais coincidiram com a presença de espermatozoides. Ainda que duas fêmeas tenham apresentado valores de pico de E2 nos meses de setembro e outubro, não foi observado eventos de postura. Análises de expressão gênica de aromatase e receptores de andrógenos (AR) e estrógenos (ESR1 e ESR2) foram descritos por técnicas de PCR no tecido testicular e hipotalâmico de machos coletados de vida livre. Um menor número de transcritos de AR e ESR1 foram descritos no tecido testicular reprodutivo, conforme o registrado em outras espécies de aves com reprodução sazonal. Acredita-se que as informações geradas neste documento ajudem a estabelecer protocolos em programas de manutenção e reprodução de aves rapinantes em cativeiro.

Palavras-chave: Estresse. Imunoensaios. PCR. Strigiformes. Sazonalidade.

ABSTRACT

BARBOSA-MOYANO, H. **Steroid hormones as allostatic and reproductive mediators in Tropical Screech Owl (*Megascops choliba*)**. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Birds of prey exert a stabilizing effect on ecosystems by controlling insect and rodent populations, thus helping to maintain high levels of biodiversity. Despite the ecologic importance of these birds, their environmental-factor-activated neuroendocrine processes are poorly known. In this context, three aspects of adult owls of the *Megascops choliba* species were studied: hormonal dosing, genetic expression, and behavior, separating hypotheses and their respective results in five chapters. Endocrine data correspond to birds evaluated in captivity. For this purpose, blood and fecal samples of the owls were collected and processed, determining steroid hormone levels by enzymatic immunoassay (EIA). The steroids studied were corticosterone (B), estradiol (E2), testosterone (T) and their respective metabolites: glucocorticoids (GCM), estrogens (EM) and androgens (AM). EIAs were analytically and physiologically validated for *M. choliba*. The variability in MGC levels was statistically confirmed, identifying the influence of external factors, such as photoperiod, and internal factors, such as temperament and activity budget. However, no significant difference was identified in MGC levels related to sex. Reproductive season of males was confirmed by serologic increases of T (July-August), coinciding with the presence of spermatozoids in semen samples. Although two females showed peak values of E2 values in September and October, no egg-laying event was registered. Also analyzed was the genetic expression of aromatase as well as androgen (AR) and estrogen (ESR1 and ESR2) receptors in testicle and hypothalamus tissue of reproductive and non-reproductive males in freedom. A smaller number of AR and ESR1 transcripts were identified in reproductive testicular tissue. We believe that the information generated in this document generates will help establish protocols for maintenance and reproduction programs of prey birds in captivity.

Keywords: Stress. Immunoassays. PCR. Strigiformes. Seasonality.

LISTA DE SIGLAS

CEMADEN	Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais
CeMaCAs	Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres – Divisão da Fauna Silvestre
CITES	Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção
IUCN	International Union for Conservation of Nature

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 –	Características morfológicas da Corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>). Espécie com “orelhas” curtas e íris geralmente amarela, com dimorfismo sexual não aparente. Em idade adulta apresenta um comprimento total de até 22 cm, envergadura de 54 cm e peso entre 97 e 134 g. A espécie apresenta uma ampla distribuição no continente americano com status de conservação pouco preocupante (do inglês <i>Least Concern</i>). 32
Figura 3-2 –	Diagrama simplificado da síntese de hormônios esteroides gerados a partir do colesterol. As enzimas: citocromo P450 clivagem de cadeia lateral=CYP11A1; citocromo P450 17 α -hidroxilase/C17,20 lyase=CYP17; 3 β -hidroxisteroide-desidrogenase/isomerase=3 β -HSD; aromatase=CYP19. As reações enzimáticas realizadas a nível mitocondrial estão ressaltadas na cor laranja e as reações no nível citoplasmático na cor verde. 37
Figura 3-3 –	Modelo esquemático do eixo hipotálamo-hipófise gonadal das aves. Os indivíduos detectam a mudança de sinais ambientais como o fotoperíodo, onde os neurônios hipotalâmicos integram sinais externos e internos, regulando a reprodução através da liberação de neuro-hormônios na eminência mediana para regular a secreção hormonal na hipófise. A hipófise anterior sintetiza e libera gonadotropinas (LH: Hormônio Luteinizante, FSH: Hormônio Folículo Estimulante), que atuam sobre as gônadas para estimular, por exemplo, a gametogênese e a secreção de esteroides sexuais nos machos..... 40
Figura 3-4 –	Representação gráfica dos domínios dos receptores nucleares. Um receptor nuclear típico contém uma região N-terminal variável, um DBD conservado, uma região de dobradiça variável (H) e o domínio de ligação dos ligantes (LBD). Em particular, os éxons que codificam os domínios DBD, H e LBD são altamente conservados em mamíferos e aves, enquanto o domínio do amino terminal é menos conservado em vertebrados..... 44

- Figura 3-5 – Representação gráfica da curva gerada pela diluição de padrão de corticosterona fator 2 detectada pelo imunoenensaio enzimático K014-H5 de Arbor assay. Os nove pontos foram gerados a partir do padrão de corticosterona disponível no kit com uma concentração inicial de 10000 pg/mL (transformado na base log10) e plotado versus a porcentagem de ligação detectada no EIA. 47
- Figura 4-1 – Teste de Paralelismo dos níveis de metabólitos de glicocorticoides detectados em corujinha-do-mato usando imunoenensaio enzimático de corticosterona CJM006 entre o padrão corticosterona e os diferentes protocolos investigados. Curva padrão de corticosterona (círculo cinza) ($Y=-24,25*X+116,6$, $r^2=0.95$); protocolo # 1: pool extrato fecal tratado com metanol 70% relação 150:1 (círculo laranja) ($Y=-25,15*X+125,2$, $r^2=0.97$); protocolo # 2: pool extrato fecal tratado com metanol 80% relação 30:1 (triângulo verde) ($Y=-23,61*X+115,9$, $r^2=0.95$); protocolo # 3: pool extrato fecal tratado com metanol 90% relação 20:1 (quadrado verde) ($Y=-24,65*X+119,0$, $r^2=0.98$); protocolo # 4: pool extrato fecal tratado com metanol 80% relação 10:1 (pentágono roxo) ($Y=-20,73*X+107,5$, $r^2=0.89$). 61
- Figura 4-2 – Níveis de metabólitos de glicocorticoides (MGC ng/g) extraídos das amostras fecais liofilizadas de *Megascops choliba* durante três dias de amostragem com intervalo de coleta de 4 horas (momento -34 até 34 horas). As linhas contínuas ilustram as concentrações de MGC na fêmea e macho tratados com análogo de ACTH em doses de 0,5 mg/Kg e 0,25 mg/Kg, respectivamente. Os valores pico foram 395,99 ng/g para a fêmea e 295,36 ng/g para o macho, o que equivale a 3,8 e 2,2 vezes o valor da média basal, respectivamente. As linhas ponteadas correspondem aos níveis de MGC dos animais tratados com solução salina, e a linhas em traços a os animais do grupo controle. 62
- Figura 4-3 – Frequência relativa de registros de atividade e inatividade em nove indivíduos de *M. choliba* de 17h00 a 07h00. As categorias comportamentais de manutenção, locomoção, alerta, alimentação e excreção agrupados na categoria “atividade”; comportamentos de repouso e em pé foram agrupados na categoria “inatividade”. 62
- Figura 4-4 – Representação gráfica dos níveis de metabólitos de glicocorticoides (MGC ng/g) extraídas de amostras fecais liofilizadas de *Megascops choliba* durante três dias de amostragem com intervalo de coleta de 4 horas (por três dias contínuos). 63
- Figura 5-1 – Ilustração da barraca onde foram realizados os testes de temperamento da corujinha-do-mato (*Megascops choliba*). A barraca foi confeccionada em canos de policloreto de vinila (PVC) de 25 mm com altura 1,50 m; comprimento 1,50 m; largura 1,25 m e coberta com tecido de algodão grosso na cor branca. A saída da caixa de papelão foi permitida de forma voluntária, evitando assim o contato visual do animal com o pesquisador. 74

- Figura 5-2 – Escores do temperamento tímido da Corujinha-do-mato. O escore tímido foi obtido das pontuações dos adjetivos passivo, vulnerável e não atento. Foram avaliadas 13 corujas adultas, representadas pelas letras A – M..... 77
- Figura 5-3 – Representação gráfica dos metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*) submetidas ao teste de predador. A linha azul representa os valores de MGC (ng/g massa seca) para fêmea A#91888 e linha laranja para o macho G#91876. Os valores sinalizados com estrela indicam as dosagens pico de MGC, superior ao 2,5 vezes o valor do desvio padrão (linhas azuis e laranja)..... 77
- Figura 6-1 – Ilustração desenho experimental. Dois dias de amostragem compreendem os tratamentos pré-estímulo (d7 e d14) e pós-estímulo (d42 e d49). No intervalo compreendido entre os dias 15° e 35° do experimento, os indivíduos foram submetidos ao estímulo auditivo, realizando três dias de amostragem neste período (d21, d28 e d35). Quatro animais compreendem o grupo não manipulado (extração de amostra de sangue) e outros 8 indivíduos compreendem o grupo manipulado. Para cada dia de amostragem, foram coletadas quatro amostras de pool de fezes e uma amostra de sangue por indivíduo. Os grupos mantiveram-se formados pelos mesmos animais durante todo o experimento. 86
- Figura 6-2 – Concentrações dos metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*) submetidas ao tratamento acústico (momentos pré-, durante e pós-estímulo). O ANOVA de duas vias mostrou que há efeito da hora da coleta e do tratamento sobre os níveis de MGC, apresentando interação significativa nos fatores [$F(2,305) = 3,70$ $p = 0,0259$]. Valores indicados com a mesma letra indicam que não são estatisticamente diferentes (pós-hoc de Duncan)..... 90
- Figura 6-3 – Paralelismo dos níveis de corticosterona livre detectados em amostras de plasma de corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) usando imunoenensaio enzimático DetectX K014 de Arbor Assay. Curva padrão de corticosterona diluído com um fator de diluição de 2 vezes (círculo) ($Y = -36,53x + 152,5$, $R^2 = 0,98$); pool plasma de corujas (quadrado) ($Y = -32,86x + 141,9$, $R^2 = 0,96$). 91
- Figura 6-4 – Níveis plasmáticos de corticosterona livre expressos em unidades de $\mu\text{g/dL}$. A ANOVA não identificou diferenças nos níveis deste hormônio esteroide entre os tratamentos..... 91
- Figura 6-5 – Representação gráfica dos níveis de corticosterona plasmática e metabólitos de glicocorticoides da Corujinha-do-mato. Na parte superior dados da fêmea A#83763 e inferior os dados do macho B#94875. No eixo Y esquerdo encontram-se em verde as dosagens dos MGC (ng/g massa seca). No eixo Y secundário direito e em laranja níveis de corticosterona plasmática ($\mu\text{g/dL}$). Valores com estrela vermelha indicam as dosagens pico de corticosterona e seus metabólitos, superior a 2,5

- vezes o valor do desvio padrão (linhas verde e laranja) sobre a média basal. As linhas verdes contínuas representam cada dia de amostragem, sendo dois dias para o tratamento pré-estímulo (d7 e d14) e dois dias para pós-estímulo (d42 e d49). No intervalo compreendido entre os dias 15 e 35 do experimento, os indivíduos foram submetidos ao estímulo auditivo, realizando três dias de amostragem neste período (d21, d28 e d35)..... 92
- Figura 6-6 – Perfil de leucócitos de *Megascops choliba* avaliados pré-, durante e após o tratamento acústico. O asterisco indica a diferença estatística para o tipo de célula sanguínea. No eixo Y da esquerda encontra-se a contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo (%) em um total de 100 leucócitos. O eixo da direita refere-se à contagem de células leucocitárias estimadas por mm³ de sangue. 93
- Figura 6-7 – Capacidade bactericida plasmática em Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) submetidas ao tratamento acústico (momentos pré-, durante e após-estímulo). As letras diferentes representam diferenças por comparações de Tukey entre os tratamentos ($p < 0,05$). 93
- Figura 7-1 – Climograma da cidade de São Paulo. Precipitação média (barras cinzas), temperatura máxima média (linha azul), temperatura mínima média (linha laranja) e fotoperíodo horas por dia (linha amarela). As médias foram obtidas a partir da série histórica da Estação Meteorológica Perus (dezembro 2019 – fevereiro 2021). 109
- Figura 7-2 – Representação gráfica da variação diária nos níveis de metabólitos de andrógenos e estrógenos de *Megascops choliba*. Níveis de metabólitos de andrógenos (MA) e de estrógenos (ME) de acordo ao sexo, sendo as figuras A, B correspondentes aos 6 machos e C, D das 6 fêmeas. As amostras de fezes foram coletadas com intervalo de 4 h em um único dia do mês reprodutivo (presença de espermatozoides). Valores indicados com a mesma letra indicam que não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post-hoc de Duncan. 111
- Figura 7-3 – Níveis séricos de testosterona nos machos de *Megascops choliba*. Amostragem realizada durante 14 meses contínuos (dezembro/2019 - fevereiro/2021). Valores indicados com a mesma letra indicam que não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Tukey. 112
- Figura 7-4 – Níveis séricos de estradiol nos machos *Megascops choliba*. O *post hoc* de Tukey identificou o mês de outubro diferente dos demais. *Pool* de soro de machos no grupo A: D, E e F; grupo B: Machos A, B, C e G. ANOVA [F (9,10) = 12,24; $p < 0,01$]. 112
- Figura 7-5 – Níveis séricos de estradiol nas fêmeas de *Megascops choliba*. Amostras da fêmea H82091 em azul e K81231 em laranja. Amostragem realizada

durante 14 meses contínuos (dezembro/2019 - fevereiro/2021), comprovando-se o valor pico de E2, com os valores superiores a 2DP..... 113

Figura 7-6 – Sequência de frames de vídeo de intenção de copula em corujas *Megascops choliba* mantidas em cativeiro..... 114

Figura 8-1 – Perfis eletroforéticos de cDNA dos genes CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2 de *Megascops choliba* em gel de agarose a 1% em TAE 1X. M corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb (SYBR, Safe DNA gel stain, Thermo Fisher). As amostras 1 e 2 correspondem aos cDNA sintetizados a partir das amostras de RNA obtidas do ovário e hipotálamo de uma fêmea. Amostras 3 e 4 correspondem ao testículo e hipotálamo de macho não reprodutivo; 5 e 6 testículo e hipotálamo de macho reprodutivo, 7 controle negativo: reação PCR realizada em ausência de cDNA..... 130

Figura 8-2 – Expressão gênica relativa de CYP19, AR, ER1 e ER2. A) amostras de tecido hipotalâmico e B) tecido testicular de machos de Corujinha-domato (*Megascops choliba*). Os resultados são apresentados como média ± SEM. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, indicando-se com as letras a b. Valores expressos em \log_2 (FC). FC = *Fold Change*. Não-R = grupo não-reprodutivo (n = 4). Reprodutivo (n = 4). 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1 - Aves rapinantes do gênero <i>Megascops</i> presentes no Brasil	31
Tabela 4-1 – Etograma <i>Megascops choliba</i> em condições de cativeiro	57
Tabela 4-2 – Resultados do teste t avaliando a similaridade entre os coeficientes angulares das curvas geradas dos diferentes tratamentos versus curva padrão de corticosterona.....	60
Tabela 7-1 – Registro da avaliação andrológica dos machos de <i>Megascops choliba</i>	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 5-1 – Correlações de Spearman entre os escores dos adjetivos.....	76
Quadro 7-1 – Parâmetros analíticos da quantificação de testosterona, estradiol e seus metabólitos em amostras de soro e extratos de esteroides fecais de Corujinha-de-mato.....	110
Quadro 8-1 – Descrição dos primers desenhados e utilizados em tecidos gonadal e hipotalâmico da Corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>)	129
Quadro 8-2 – Sequência dos produtos PCR purificados das amostras de tecido de corujas.....	130
Quadro 8-3 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos obtidas dos produtos purificados do PCR de <i>Megascops choliba</i> e as sequências disponíveis no NCBI para <i>Athene cunicularia</i>	131

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	anticorpo
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AE	androstenediona
AR	receptores de andrógenos
AREs	do inglês, <i>androgen response elements</i>
ARNm	ácido ribonucleico mensageiro
Ag	antígeno
cDNA	DNA complementar do inglês <i>complementary DNA</i>
cGnRH-I	do inglês, <i>chicken gonadotrophin-releasing hormone-I</i>
BLAST	do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CYP19	aromatase gene
CYP11A1	Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
DBD	do inglês, <i>DNA-binding domain</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
E ₁	estrona
E ₂	estradiol
EIA	imunoensaios enzimáticos
ER α	Estrogen receptor alpha
ER β	Estrogen receptor beta
ESR1	Estrogen receptor alpha gene
ESR2	Estrogen receptor beta gene
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
GnIH	hormônio inibidor da gonadotrofina
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
ha	hetare
HPG	eixo hipotálamo-hipófise gonadal
HPTR1	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase gene
HVC	Vocal control area (<i>proper name</i>)
i.e.	do latim <i>id est</i> , que significa “isto é”
LBD	do inglês, <i>ligand-binding domain</i>

LC	do inglês, <i>least concern</i>
LH	hormônio luteinizante
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
μM	micromolar
NCOR1	do inglês, <i>nuclear co-repressor 1</i>
nM	nanomolar
NSB	do inglês, <i>Non-specific Binding</i>
NTD	do inglês, <i>N-terminal domain</i>
OD	do inglês, <i>optical density</i>
pM	picomolar
PCA	Análise de Componentes Principais do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PGK1	fosfoglicerato quinase gene
PRL	prolactina
q-RT-PCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
REC	recuperação
RIA	radioimunoensaio
RP-OPC	oligos purificados por coluna de fase reversa
RSD	do inglês, <i>Reverse Size Dimorphism</i>
SRC-1	do inglês, <i>steroid receptor co-activator 1</i>
Sptz	espermatozoides
T	testosterona
VU	do inglês, <i>Vulnerable</i>
YWHAZ	gene tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1	AS CORUJAS DO BRASIL	30
3.2	GENERALIDADES SOBRE <i>Megascops</i>	30
3.3	ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>Megascops choliba</i>	32
3.4	ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS <i>EX SITU</i> E A SUA SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE.....	33
3.5	ESTRESSE E A RESPOSTA IMUNE	34
3.6	ESTUDO DO COMPORTAMENTO NOS ANIMAIS.....	35
3.7	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS HORMÔNIOS ESTEROIDES.....	36
3.8	MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS NA REPRODUÇÃO DAS AVES	39
3.9	HORMÔNIOS GONADOTRÓPICOS E SEU EFEITO NO TECIDO TESTICULAR.....	41
3.10	FATORES AMBIENTAIS E PROCESSOS REPRODUTIVOS	42
3.11	SÍNTESE E FUNÇÃO DA AROMATASE EM AVES.....	43
3.12	RECEPTORES DE HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS E ANDROGÊNICOS	43
3.13	TÉCNICAS MOLECULARES E SUA APLICABILIDADE NO USO DOS PROCESSOS REPRODUTIVO DAS AVES.....	45
3.14	VALIDAÇÃO DE IMUNOENSAIOS PARA DOSAGEM DE HORMÔNIOS ESTEROIDES.....	45
3.14.1	Quantificação de hormônios esteroides	46
4	CAPÍTULO 1: “ATIVIDADE COMPORTAMENTAL E METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM CORUJAS (<i>Megascops choliba</i>) MANTIDAS EM CATIVEIRO”	49
	GRAPHICAL ABSTRACT	49
	HIGHLIGHTS	49
	RESUMO	50
	ABSTRACT	51
4.1	INTRODUÇÃO.....	52
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.2.1	Permissão ética	53

4.2.2	Animais e alojamento.....	54
4.2.3	Validação analítica do imunoensaio	54
4.2.4	Validação fisiológica do imunoensaio	56
4.2.5	Coleta de dados comportamentais e dosagem de metabólitos de glicocorticoides.....	56
4.2.6	Análise de dados	59
4.3	RESULTADOS	60
4.3.1	Validação analítica e fisiológica do imunoensaio.....	60
4.3.2	Orçamento de atividades e metabólitos de glicocorticoides	62
4.4	DISCUSSÃO.....	64
4.5	CONCLUSÃO.....	67
5	CAPÍTULO 2 “TRAÇOS DE TEMPERAMENTO E METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM CORUJAS (<i>Megascops choliba</i>)”	68
	GRAPHICAL ABSTRACT	68
	HIGHLIGHTS.....	68
	RESUMO.....	69
	ABSTRACT	70
5.1	INTRODUÇÃO.....	71
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	72
5.2.1	Permissão ética	72
5.2.2	Animais e alojamento.....	73
5.2.3	Avaliação do temperamento.....	73
5.2.4	Metabólitos de glicocorticoides	75
5.2.5	Análises de dados.....	75
5.3	RESULTADOS	76
5.4	DISCUSSÃO.....	78
5.5	CONCLUSÕES.....	80
6	CAPÍTULO 3 “REABILITAÇÃO DE <i>Megascops choliba</i>: UMA VISÃO ENDÓCRINA E IMUNOLÓGICA”.....	81
	GRAPHICAL ABSTRACT	81
	HIGHLIGHTS.....	81
	RESUMO.....	82
	ABSTRACT	83
6.1	INTRODUÇÃO.....	84
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	85
6.2.1	Permissões éticas.....	85

6.2.2	Animais e desenho experimental.....	85
6.2.3	Corticosterona plasmática	87
6.2.4	Extração e quantificação dos metabólitos de glicocorticoides.....	87
6.2.5	Perfil de leucócitos.....	87
6.2.6	Capacidade bactericida plasmática	88
6.2.7	Análises de dados.....	89
6.3	RESULTADOS	89
6.3.1	Extração e quantificação dos metabólitos de glicocorticoides.....	89
6.3.2	Nível de corticosterona plasmática	90
6.3.3	Perfil de leucócitos.....	92
6.3.4	Capacidade bactericida plasmática de <i>M. choliba</i>	93
6.4	DISCUSSÃO.....	94
6.5	CONCLUSÃO.....	98
7	CAPÍTULO 4: “SAZONALIDADE ENDÓCRINA DE <i>Megascops choliba</i> MANTIDA EM CATIVEIRO NO SUDESTE DO BRASIL”	100
	GRAPHICAL ABSTRACTS	100
	HIGHLIGHTS	100
	RESUMO	101
	ABSTRACT	102
7.1	INTRODUÇÃO.....	103
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS	104
7.2.1	Permissão ética	104
7.2.2	Animais e alojamento	104
7.2.3	Dados meteorológicos.....	105
7.2.4	Coleta e preparo das amostras de sangue e fezes	106
7.2.5	Validação analítica e biológica dos kit imunoenaios.....	106
7.2.6	Quantificação dos hormônios por métodos de imunoensaio	107
7.2.7	Coleta de sêmen	107
7.2.8	Monitoramento do comportamento.....	108
7.2.9	Análises de dados.....	108
7.3	RESULTADOS	109
7.4	DISCUSSÃO.....	114
7.5	CONCLUSÃO.....	118

8	CAPÍTULO 5: “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE AROMATASE, RECEPTORES ANDROGÊNICOS E ESTROGÊNICOS EM CORUJAS SAZONALMENTE REPRODUTIVAS”	119
	GRAPHICAL ABSTRACT	119
	HIGHLIGHTS	119
	RESUMO	120
	ABSTRACT	121
8.1	INTRODUÇÃO	122
8.2	MATERIAIS E MÉTODOS	124
8.2.1	Permissão ética	124
8.2.2	Coleta de amostras	125
8.2.3	Desenho de primers	125
8.2.4	Isolamento ou extração de RNA	126
8.2.5	Síntese de DNA complementar - cDNA	127
8.2.6	Identificação, purificação e sequenciamento dos produtos de PCR	127
8.2.7	Quantificação relativa da expressão gênica	128
8.3	RESULTADOS	129
8.4	DISCUSSÃO	132
8.5	CONCLUSÃO	137
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
	REFERÊNCIAS	140

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cerca de 120 anos têm transcorrido desde que Starling (1905) definiu os hormônios como um composto químico mensageiro produzido para atender as necessidades fisiológicas do organismo, aceitando-se até hoje sua função como sinalizador celular (TATA, 2005). De acordo com as propriedades bioquímicas, estes mensageiros são classificados como proteicos e peptídicos, derivados de aminoácidos e esteroides (SHACKLETON, 1986); sendo estes últimos objeto de estudo da presente pesquisa.

Os hormônios esteroides são sintetizados por glândulas endócrinas localizadas por exemplo no tecido gonadal, adrenal e encefálico, a partir de um precursor comum, o colesterol. Devido a suas propriedades hidrofóbicas, a grande maioria destes hormônios são transportados no organismo via corrente sanguínea ligados a proteínas, como por exemplo as globulinas (LIN *et al.*, 2021). No tecido-alvo, estes esteroides atravessam a membrana plasmática por mecanismos de difusão simples ou por difusão facilitada ligando-se às proteínas receptoras, localizadas no nível citoplasmático ou nuclear (RENSEL *et al.*, 2018). Por fim, no núcleo, o complexo hormônio-receptor se liga a sequências específicas do DNA, agindo como um fator de transcrição que pode aumentar ou suprimir a expressão gênica das células (FALKENSTEIN *et al.*, 2001). Adicionalmente, outras ações não-genômicas dos esteroides têm sido comprovadas em ensaios onde foram inibidos os processos de transcrição (NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004).

Os hormônios esteroides podem ser classificados como corticosteroides, andrógenos, estrógenos e progestágenos, produzidos tanto em fêmeas como em machos em concentrações mínimas ($\mu\text{g/mL}$) se comparados com o tamanho corporal do indivíduo. A variação da concentração plasmática nestes mensageiros determina os estados fisiológicos metabólicos (ex. mobilização de energia) e reprodutivos (ex. produção de gametas), relacionando-se com a expressão fenotípica, como por exemplo, o comportamento e as características sexuais externas dos animais. Entre os processos fisiológicos atribuídos aos corticosteroides são citados os processos regulatórios de aquisição, deposição e mobilização de energia (BUSCH; HAYWARD, 2009; MCEWEN; WINGFIELD, 2003), exercendo um efeito nos processos alostáticos durante as atividades previsíveis (ex. atividade locomotora), quanto às situações

imprevisíveis e/ou desafiantes (LANDYS; RAMENOFKY; WINGFIELD, 2006; MASTORAKOS *et al.*, 2005; MCEWEN; WINGFIELD, 2003).

Em aves, a variação da concentração plasmática de hormônios androgênicos e estrogênicos regulam processos como a reprodução, muda de penas e migração (ANTHONY; BUSS, 1974; CHEMINEAU *et al.*, 2007; MALECKI *et al.*, 1998). Estes processos são sincronizados por fatores externos como o fotoperíodo, clima, interações sociais, entre outros (BALL, 1993; DAWSON, 2008; DAWSON; SHARP, 2007; GWINNER, 2003; LESKA; DUSZA, 2007; MORAIS *et al.*, 2012; SHINOMIYA *et al.*, 2014). Em resposta às variações hormonal e ambiental, as aves exibem plasticidade na taxa e no tempo de maturação, recrudescência e regressão das gônadas (ANTHONY; BUSS, 1974; ISLAM *et al.*, 2010). Estes processos neuroendócrinos dos animais apresentam diferenças no nível intra e interespecífico, sendo descritos em vários modelos animais que abrangem diferentes espécies de mamíferos (ex. *Mus*), aves (ex. *Coturnix*), peixes (ex. *Poecillia*) e reptéis (ex. *Trachemys*). No entanto, o entendimento destes conceitos em espécies silvestres é limitado, bem seja por questões referentes ao estado de conservação da espécie, por limitações operacionais como a possibilidade e/ou dificuldade na coleta de amostras, n experimental, entre outros.

As corujas tem um importante papel ecológico no controle de roedores e insetos (MAGRINI; FACURE, 2008; MORAES; PEDROSO-JR; BANDEIRA, 2004; MOTTA, 2006; ŠOTNÁR; PAČENOVSKÝ; OBUCH, 2015). No Brasil, várias espécies de corujas pertencentes a família Strigidae encontram-se declaradas em risco de extinção, como por exemplo, as espécies endêmicas *Pulsatrix perspicillata pulsatrix* categorizada como “vulnerável” e *Glaucidium mooreorum* considerada “extinta” (ICMBIO/MMA; BIODIVERSIDADE, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014). Tendo em vista o aumento das taxas de extinção de espécies aviárias, há uma necessidade urgente em compreender os mecanismos responsivos ao estresse e regulatórios reprodutivos que contribuem no estabelecimento de programas de reabilitação e reprodução em cativeiro.

A corujinha-do-mato (*Megascops choliba*, Vieillot 1817) apresenta uma ampla distribuição no continente americano e atualmente é classificada em estado de conservação “pouco preocupante” (BIRDLIFE, 2021), oferecendo a possibilidade de ser uma espécie modelo para o entendimento dos processos fisiológicos endócrinos em aves Strigiformes de comportamento noturno. Neste trabalho foram estudadas corujas adultas da espécie de *M. choliba* avaliando-se os níveis da corticosterona e seus metabólitos, desde uma perspectiva comportamental e responsiva a situações

desafiantes. Adicionalmente, foram elucidados processos de sazonalidade reprodutiva desta espécie, desde a perspectiva endócrina (dosagem hormonal) e gênica. Levando em consideração as hipóteses levantadas neste projeto, a presente Tese de Doutorado está organizada em cinco capítulos, descritos a seguir:

Capítulo 1: “Atividade comportamental e metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*) mantidas em cativeiro”.

Hipótese: “A maior atividade comportamental de corujas mantidas *ex situ* está associada às atividades de locomoção, alerta e alimentação durante o período noturno, relacionando-se positivamente com os maiores níveis de metabólitos de glicocorticoides”.

Capítulo 2: “Traços de temperamento e metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*)”.

Hipótese: “A produção de metabólitos glicocorticoides das corujas está relacionada com aspectos do temperamento após um estímulo estressor”.

Capítulo 3: “Reabilitação de *Megascops choliba* :uma visão endócrina e imunológica”.

Hipótese: “Corujas expostas a estímulos auditivos que reproduzem um ambiente hospitalar diminuem a função imunitária inata e incrementam a produção de glicocorticoides”.

Capítulo 4: “Avaliação da sazonalidade endócrina em corujas da espécie *Megascops choliba* mantidas *ex situ* no sudeste do Brasil”.

Hipótese: “A variação nos níveis plasmáticos de testosterona e estradiol é sazonal e estão relacionadas com a produção de espermatozoides”.

Capítulo 5: “Avaliação da expressão gênica de aromatase, receptores estrogênicos e androgênicos em aves rapinantes masculinas”.

Hipóteses: “O estradiol é um produto da aromatização da testosterona pela expressão de aromatase em rapinantes”;

“A expressão de receptores de estrógenos e andrógenos em tecidos gonadais e hipotalâmicos é sazonal”.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os mecanismos endócrinos de hormônios esteroides como mediadores alostáticos e reprodutivos na Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A presente Tese foi organizada e dividida em cinco capítulos, cada um com seus respectivos objetivos específicos.

Capítulo 1:

- Validar um imunoenensaio enzimático (EIA) para a detecção e quantificação de metabólitos de glicocorticoides (MGC) em amostras de fezes de *M. choliba*;
- Avaliar a existência de oscilações na produção de MGC em nível individual, sexual e circadiano;
- Estimar o orçamento temporal da Corujinha-do-mato em condições *ex situ*;
- Avaliar a possível relação entre os níveis de MGC e a frequência das atividades comportamentais.

Capítulo 2:

- Validar um método de análise subjetivo para a identificação do temperamento em *M. choliba*;
- Analisar se há diferentes tipos de temperamento nas corujas;
- Avaliar a relação entre o temperamento e a produção de metabólitos de glicocorticoides nas corujas.

Capítulo 3:

- Validar um imunoenensaio enzimático para a detecção e quantificação da corticosterona plasmática de *M. choliba*;

- Quantificar as concentrações de corticosterona e seus metabólitos, comparando posteriormente seus níveis antes, durante e após um tratamento acústico;
- Calcular a razão entre heterófilos e linfócitos a partir do perfil leucocitário, visando entender se há variação com o tratamento acústico;
- Avaliar a capacidade bactericida plasmática de corujas em reposta a um estímulo auditivo.

Capítulo 4:

- Validar kits de EIA para análise quantitativa de testosterona (T) e estradiol (E₂) em amostras de soro de *M. choliba*;
- Validar kits de EIA para a análise quantitativa de metabólitos andrógenos e estrógenos presentes em amostras de fezes de *M. choliba*;
- Avaliar o efeito do intervalo de amostragem de fezes na concentração dos metabólitos de esteroides reprodutivos;
- Quantificar os níveis séricos de T e E₂ em machos e E₂ em fêmeas avaliados durante 14 meses;
- Avaliar a sazonalidade da produção de esteroides sexuais;
- Determinar o período reprodutivo da espécie *M. choliba* por métodos endócrinos e andrológicos.

Capítulo 5:

- Realizar a síntese de cDNA a partir de RNA extraído do tecido gonadal e hipotalâmico de *M. choliba*;
- Desenhar os primers iniciadores para a amplificação por PCR dos genes de aromatase (CYP19A1), receptores androgênicos (AR) e receptores de estrógenos tipo 1 (ESR1) e tipo 2 (ESR2) para amostras de *M. choliba*;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente os transcritos de CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2 em tecido testicular e hipotalâmico de *M. choliba* nas fases reprodutivas e não-reprodutivas dos machos;
- Sequenciar os produtos dos PCR e avaliar a porcentagem de identidade com sequências de nucleotídeos publicados de outras espécies de corujas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AS CORUJAS DO BRASIL

Strigiformes é uma ordem que inclui aves de rapina com características específicas como visão binocular, adaptações predatórias e plumagem macia (ENRÍQUEZ *et al.*, 2017). Esta ordem de aves é composta pela família Tytonidae (suindaras) e pela família Strigidae (ex. corujas e mucurututus) (REMSSEN JR *et al.*, 2017; WINK; SAUER-GURTH, 2021). Atualmente, a família Strigidae conta com mais de 230 espécies representantes, as quais podem ser agrupadas nas subfamílias Striginae, Ninoxinae e Sruiniinae (REMSSEN JR *et al.*, 2017; WINK; SAUER-GURTH, 2021). A grande maioria das corujas são de comportamento noturno e hábitos arbóreos, embora algumas espécies sejam diurnas e de hábito fossorial (ex. *Athene cunicularia*) (ENRÍQUEZ *et al.*, 2017). Existe uma grande variabilidade no tamanho entre os representantes de Strigiformes, registrando-se espécies cujo comprimento total é inferior a 14 cm (ex. *Micrathene whitneyi*) e outras maiores que 80 cm (ex. *Bubo bubo*) (DELGADO; PENTERIANI, 2004; LIGON, 1968). As corujas podem ser encontradas em uma grande variedade de ecossistemas, localizando-se aproximadamente 35% do total de espécies na região Neotropical (ENRÍQUEZ *et al.*, 2017). Todas as espécies pertencentes a família Strigidae encontram-se registradas nos Apêndices I ou II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES, com exceção da espécie extinta *Sceloglaux albifacies*. No Brasil, pode-se encontrar 22 espécies da família Strigidae destas, a *Strix hylophila* está declarada em risco de extinção, i.e. “quase ameaçada” (BIRDLIFE, 2016a), *Strix huhula albomarginata* e *Pulsatrix perspicillata pulsatrix* como “vulnerável”, e *Glaucidium mooreorum* considerada como possivelmente “extinta”, sendo estes dois últimos táxons endêmicos do País (ICMBIO/MMA; BIODIVERSIDADE, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014). Recentemente foram descritas três novas espécies do gênero *Megascops* no território brasileiro por métodos moleculares e vocais (DANTAS *et al.*, 2021).

3.2 GENERALIDADES SOBRE *Megascops*

Megascops é um gênero de aves rapinantes pertencente à família Strigidae encontrada unicamente no continente americano. O gênero conta atualmente com 22 espécies reconhecidas (DANTAS *et al.*, 2016), das quais seis encontram-se no território brasileiro (Tabela 3-1) (BIRDLIFE, 2016b, 2016c, 2016d, 2016e, 2018; COMITÊ

BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS, 2014). Recentemente, Dantas e colaboradores (2021) descreveram três novas espécies representantes do gênero *Megascops*: *M. alagoensis*, *M. ater* e *M. stangiae*; e segundo os autores, essas espécies são endêmicas no Brasil. De acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), o estado de conservação da grande maioria das espécies pertencentes do gênero é considerado pouco preocupante (LC do inglês *least concern*) ao nível global, com exceção das espécies *M. colombianus* e *M. marshalli* registradas como quase ameaçada (NT do inglês *Near Threatened*) e as espécies *M. gilesi* e *M. barbarus* em estado vulnerável (VU do inglês *Vulnerable*) (BIRDLIFE, 2016f, 2019).

Tabela 3-1 - Aves rapinantes do gênero *Megascops* presentes no Brasil

Nome do Táxon	Nome comum em inglês	Nome em português
<i>Megascops choliba</i> (Vieillot 1817)	Tropical Screech-Owl	Corujinha-do-mato
<i>Megascops watsonii</i> (Cassin 1849)	Tawny-bellied Screech-owl	Corujinha-orelhuda
<i>Megascops usta</i> (Sclater, 1858)	Black-capped Screech-owl	Corujinha-relógio
<i>Megascops atricapilla</i> (Temminck, 1822)	Black-capped Screech-owl	Corujinha-sapo
<i>Megascops sanctaecatrinae</i> (Salvin, 1897)	Long-tufted Screech-owl	Corujinha-do-sul
<i>Megascops guatemalae</i> (Sharpe, 1875)	Guatemalan Screech-owl	Corujinha-de-roraima
<i>Megascops alagoensis</i> (Dantas et al., 2021)		Corujinha-de-alagoas
<i>Megascops ater</i> (Dantas et al., 2021)		Corujinha-de-belem
<i>Megascops stangiae</i> (Dantas et al., 2021)		Corujinha-do-xingu

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Apesar das espécies representantes do gênero *Megascops* exibirem similaridades morfológicas com as espécies do gênero *Otus*, estas últimas apresentam distribuição no Velho Mundo e possuem características vocais diferentes. Marshall e King (1988) identificaram as espécies do gênero *Otus* como corujas que emitem notas lentas; enquanto as espécies de “*Megascops*” são conhecidas como corujas gritantes com *trills* rápidos. As espécies pertencentes ao gênero *Megascops* têm dois tipos de canções, a canção primária ("*A-song*") que consiste numa sequência de notas individuais em sucessão bastante rápida usada para territorialidade, e uma canção secundária ("*B-song*") que é um trilo relativamente curto e com ritmo característico, usado no cortejo e em dueto macho-fêmea (MARSHALL; KING, 1988). Porém, a identificação das espécies do gênero *Megascops* costuma ser trabalhosa devido às suas características morfológicas muito semelhantes, além da variabilidade na plumagem apresentada nos indivíduos de uma mesma população (DANTAS *et al.*, 2016; PROUDFOOT; GENHLBACH, FREDERICK; HONEYCUTT, RODNEY, 2007; SICK, 2001).

3.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Megascops choliba*

Para fins de levantamento bibliográfico da espécie em estudo, é importante mencionar que o táxon era anteriormente conhecido como “*Otus choliba*” (BIRDLIFE, 2016b; LIMA; LIMA NETO, 2009; MOTTA-JUNIOR, 2002; OWL *et al.*, 1975), sendo considerada no presente documento como uma única espécie denominada “*Megascops choliba*”. A espécie apresenta uma ampla distribuição no continente americano (Figura 3-1), encontrando populações naturais desde Costa Rica até o norte da Argentina (BIRDLIFE, 2021). Esta coruja é encontrada em diversos ambientes incluindo floresta aberta e suas bordas, como também savanas ou até mesmo em ambientes urbanos (BARROS; MOTTA-JUNIOR, 2014; BIRDLIFE, 2016b; MENQ; ANJOS, 2015; MOTTA-JUNIOR; BRAGA, ROCHA; GRANZINOLLI, 2017; SICK, 2001).



Figura 3-1 – Características morfológicas da Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*). Espécie com “orelhas” curtas e íris geralmente amarela, com dimorfismo sexual não aparente. Em idade adulta apresenta um comprimento total de até 22 cm, envergadura de 54 cm e peso entre 97 e 134 g. A espécie apresenta uma ampla distribuição no continente americano com status de conservação pouco preocupante (do inglês *Least Concern*).

Fonte: Adaptado de Birdlife International, 2021.

M. choliba não apresenta dimorfismo sexual evidente. No entanto, De Andrea Segall et al. (2017) concluíram que o comprimento da asa e o peso dos indivíduos podem ser utilizados como indicadores na determinação do sexo, sendo que os machos costumam apresentar um tamanho e peso menor, se comparados com as fêmeas. Isto é comumente conhecido como "Dimorfismo de tamanho reverso" (RSD do inglês *Reverse*

Size Dimorphism) e geralmente é comum em aves de rapina (DE ANDRÉA SEGALL; GONZAGA; PAIVA, 2017; SICK, 2001).

A época de reprodução de *M. choliba* varia de acordo com a localização geográfica da população, registrando-se no hemisfério norte desde janeiro a julho, com pico em maio, enquanto no hemisfério sul, o pico geralmente acontece entre setembro e outubro (GUILHERME; SOUZA, 2017). Dias e Lima (2015), avaliaram corujas em vida livre no cerrado de Brasília durante 2 anos (2007-2008), registrando o período de postura de ovos na primeira semana de agosto até a última semana de outubro (DIAS; LIMA, 2015). A espécie não constrói ninhos, fazendo uso de ninhos abandonados (ex. ninhos de pica-paus) ou buracos presentes nas árvores (DIAS; LIMA, 2015; LIMA; LIMA NETO, 2009). A incubação é fornecida pela fêmea, constando a postura de dois a três ovos de cor branca com peso médio de 14,6 g e medida aproximada de 32 x 29 mm (DIAS; LIMA, 2015; GUILHERME; SOUZA, 2017). O período de incubação é de aproximadamente 30 dias, registrando-se o abandono do ninho pelos filhotes ao atingir os 100 g, por volta dos 30 dias (GUILHERME; SOUZA, 2017; LIMA; LIMA NETO, 2009; OWL *et al.*, 1975).

3.4 ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS *EX SITU* E A SUA SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE

O ambiente geofísico e social em que os animais se encontram inseridos é composto por uma ampla diversidade de elementos físicos, químicos e biológicos; que, para efeitos desta tese, serão agrupados em eventos previsíveis e eventos imprevisíveis. Entre os eventos previsíveis podemos citar, as variações diárias de luz e a sazonalidade climática. Já entre os imprevisíveis, podem ser destacados a presença de outro indivíduo, bem seja um congênere ou uma outra espécie (ex. predador, presa). Diante a variabilidade destes eventos e a depender da genética, experiência e estado do ciclo de vida do indivíduo, os animais ajustam suas funções vitais mediante diversos processos fisiológicos, os quais são denominados de alostase (MCEWEN; WINGFIELD, 2003).

A ativação destes sistemas alostáticos depende de energia, sendo a demanda metabólica cumulativa da rotina dos indivíduos denominada como carga alostática (MCEWEN; WINGFIELD, 2010). Quando a energia requerida para confrontar os eventos é maior que a disponível, diz-se que os indivíduos estão em estado de sobrecarga alostática (LANDYS; RAMENOFISKY; WINGFIELD, 2006). Os processos fisiológicos para aquisição, deposição e mobilização de energia são regulados

principalmente por hormônios glicocorticoides (BUSCH; HAYWARD, 2009; ROBERT; MORADO; WATTS, 2019), sendo estes reconhecidos como um dos mediadores alostáticos mais importantes (MCEWEN; WINGFIELD, 2010).

Em condições de cativeiro, os animais silvestres podem apresentar sobrecarga alostática devido à constante exposição a estímulos aversivos (BUSCH; HAYWARD, 2009; MCEWEN; WINGFIELD, 2003; MORGAN; TROMBORG, 2007). Se a sobrecarga alostática for persistente, as ações prolongadas dos mediadores podem resultar em desgaste, fisiopatologia ou dano, em vez de proteção (MCEWEN; WINGFIELD, 2010). Adicionalmente, estereotipias e/ou doenças oportunistas podem surgir e empobrecer o bem-estar dos indivíduos e, no pior dos casos, levá-los a morte (BROOM, 2011).

Nas avaliações de bem-estar dos animais mantidos *ex situ*, o estudo dos glicocorticoides e/ou seus metabólitos têm ganhado popularidade (PALME, 2019), pois as elevadas concentrações destes esteroides, i.e. acima dos níveis basais, podem ser um indicativo de estresse. No entanto, os níveis basais destes esteroides podem apresentar variações de acordo com grupo taxonômico, sexo ou até mesmo estágio da história de vida (GOYMANN; MOSTL, 2002).

O conceito “estresse” não está consolidado na literatura (MCEWEN; WINGFIELD, 2003; SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015). Alguns pesquisadores denominam o estresse como “estímulo” (BROOM, 2011), outros como “evento” ou “resposta” (DALLMAN, 2003), ou até mesmo “evento e resposta” (MCEWEN; WINGFIELD, 2003), dentre outras definições. Portanto, a realização de avaliações endócrinas em conjunto com outras medidas comportamentais, ecológicas e/ou fisiológicas se fazem necessárias para permitir a interpretação de todos os resultados em um contexto mais amplo e apropriado (BUSCH; HAYWARD, 2009; MCEWEN; WINGFIELD, 2003; ROMERO; BEATTIE, 2022).

3.5 ESTRESSE E A RESPOSTA IMUNE

O meio em que os animais se encontram está provido por uma grande diversidade de micro-organismos com potencial patológico. Para confrontar estas ameaças, cada indivíduo possui defesas que ocorrem através de mecanismos complexos e inter-relacionados denominados imunidade inata e adaptativa (CRUVINEL *et al.*, 2010). Reconhece-se a imunidade inata como a primeira linha de defesa caracterizada pela rápida resposta à agressão, sendo a imunidade adaptativa aquela resultante da exposição

prévia aos antígenos, por exemplo através de vacinas. A imunidade inata constitui-se por diferentes componentes celulares como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) cujos principais mecanismos são a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e ativação de proteínas do sistema complemento (MEDZHITOV; JR JANEWAY, 2000; TIELEMAN *et al.*, 2005).

De acordo com a duração de exposição dos indivíduos ao agente estressor ou desafiante, pode-se descrever respostas estimuladoras ou supressoras do sistema imune. Assim, em caso de estresse agudo, pode-se observar um incremento das respostas imunes tanto inatas como adaptativas, como por exemplo a alteração das células dendríticas e reações inflamatórias e fagocíticas dos leucócitos (CRUVINEL *et al.*, 2010; DHABHAR, 2014). Em contraste, o estresse de longo prazo (crônico) suprime e/ou desregula as respostas imunes, alterando por exemplo, o equilíbrio de citocinas Tipo 1-Tipo 2 e suprimindo o número, tráfego e função das células imunoprotetoras (DHABHAR, 2014).

3.6 ESTUDO DO COMPORTAMENTO NOS ANIMAIS

O estudo do comportamento animal ou etologia é uma ciência interdisciplinar que reúne conhecimentos integrados das áreas da Psicologia, Biologia e Ecologia (SALDANHA, 1973). O desenvolvimento destas áreas tem permitido estabelecer diferenças nos traços comportamentais entre indivíduos de uma mesma espécie (GROOTHUIS; CARERE, 2005; KOOLHAAS *et al.*, 1999). Estes traços comportamentais costumam repetir-se ao longo do tempo e em diferentes situações (RÉALE *et al.*, 2007), denominados por alguns autores como temperamento (BOISSY, 1995; RÉALE *et al.*, 2007) ou personalidade (COCKREM, 2007). Em condições experimentais, é possível de se estabelecer o temperamento dos animais por métodos qualitativos subjetivos, conforme expostos por Feaver *et al.* (1986) e Wemelsfelder *et al.* (2001). Testes de reação a espaços novos realizados em aves, por exemplo, permitiram identificar que indivíduos com personalidade proativa apresentaram níveis de corticosterona relativamente baixos, enquanto que as aves com personalidade passiva apresentaram elevados níveis de corticosterona (COCKREM, 2007). Assim, o estudo endócrino comportamental oferece uma primeira visão na identificação de estímulos nocivos para os animais (CARERE *et al.*, 2003; COCKREM, 2013) e, por sua vez, estabelece uma solução de problemas de causalidade.

3.7 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS HORMÔNIOS ESTEROIDES

Hormônios esteroides, como por exemplo corticosterona (B), estradiol (E₂) e testosterona (T), são derivados do colesterol (Figura 3-2). O primeiro passo na biossíntese destes hormônios envolve a clivagem oxidativa da cadeia lateral do colesterol pela enzima P450_{scc} (*side-chain cleavage*), gerando a pregnenolona (WINGFIELD *et al.*, 2018). Posteriormente, a pregnenolona pode receber a ação de enzimas pertencentes à família de oxidoredutases (ex. 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase) e a família citocromo P450 (ex. 17 α hidrolase), realizando a oxidação do grupo hidroxila ou a hidroxilação, respectivamente (HÄGGSTRÖM; RICHFIELD, 2014). Estas reações enzimáticas são realizadas em nível mitocondrial e citoplasmático, sendo as enzimas pertencentes à família citocromo P450, como a 17 α , 21 e 11 β hidroxilase codificadas pelos genes CYP17A1, CYP21A2 e CYP11B1, respectivamente (GRIFFITH *et al.*, 2017).

O cortisol (F) e a corticosterona (B) são constituídos quimicamente por 21 átomos de carbono (Figura 3-2), sendo a única diferença entre eles a presença do grupo OH ligado ao C17 do cortisol (SHACKLETON, 1986). Por suas ações metabólicas energéticas, ambos são denominados como glicocorticoides (GC) (RENSEL *et al.*, 2018). Nos mamíferos, a grande maioria dos GC são sintetizados no córtex adrenal, especificamente na zona fasciculada. No entanto, nas aves o parênquima da glândula adrenal não está organizado em córtex e medula já que estes tecidos se apresentam entremeados.

O cortisol está presente em peixes e na maioria dos mamíferos, já a corticosterona está presente em anfíbios, aves, répteis e roedores, registrando-se em algumas espécies de cervídeos os dois glicocorticoides. O cortisol é a forma biologicamente ativa, enquanto a cortisona é considerada inativa. O cortisol é metabolizado pelo sistema 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase (11- β -HSD) que consiste em duas enzimas: a tipo 1, 11- β HSD1 que usa o cofator NADPH para converter a cortisona biologicamente inerte em cortisol biologicamente ativo, e a tipo 2, 11- β HSD2 que usa o cofator NAD⁺ para converter cortisol em cortisona (RENSEL *et al.*, 2018). O cortisol também é metabolizado em 5- α -tetrahydrocortisol (5- α -THF) e 5- β -tetrahydrocortisol (5- β -THF), pelas enzimas 5- α -redutase e 5- β -redutase. Já as ações do 5- β -redutase são descritas para a conversão de cortisona em tetrahydrocortisona (THE).

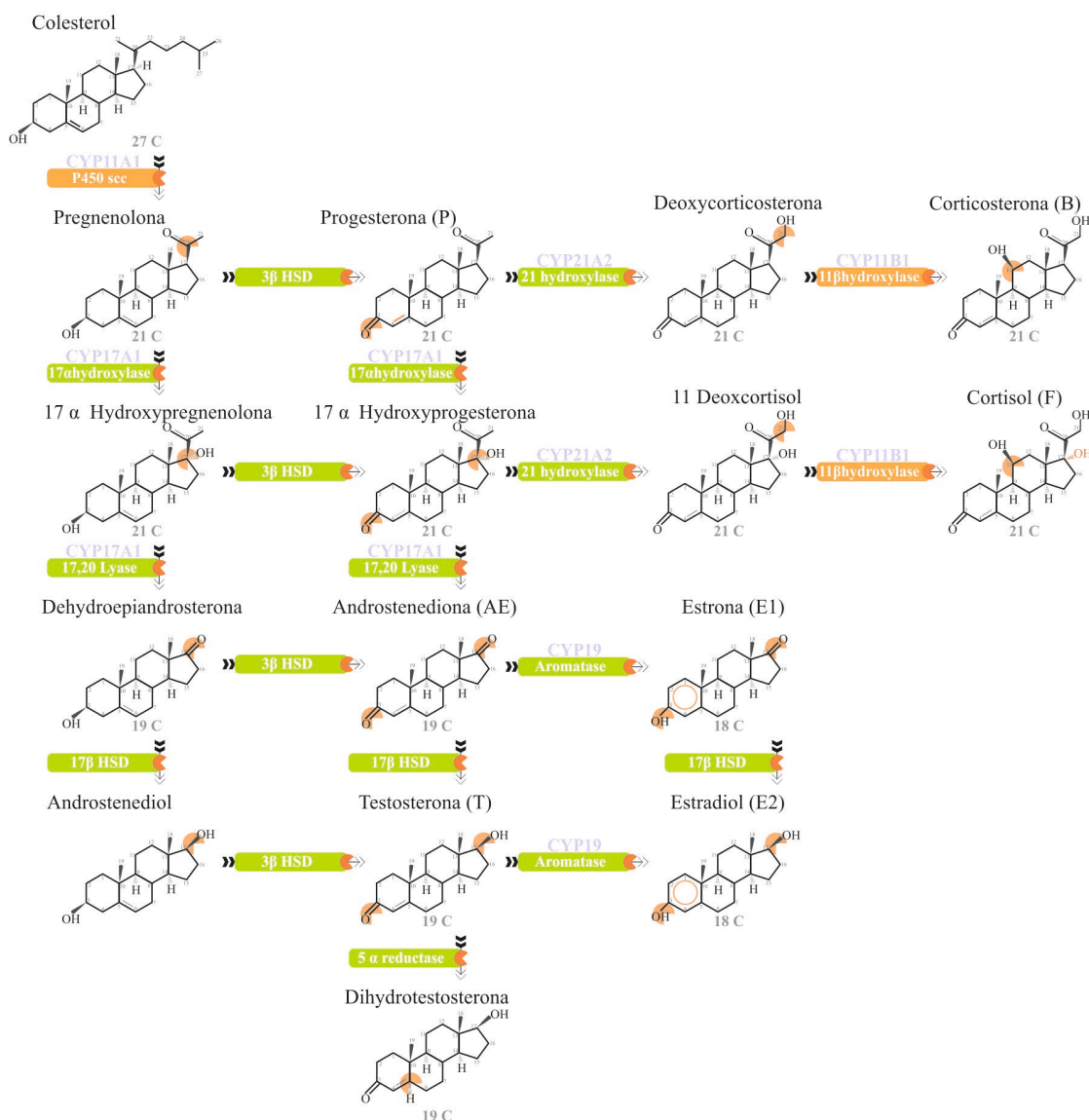


Figura 3-2 – Diagrama simplificado da síntese de hormônios esteroides gerados a partir do colesterol. As enzimas: citocromo P450 clivagem de cadeia lateral=CYP11A1; citocromo P450 17α-hidroxiase/C17,20 lyase=CYP17; 3β-hidroxiesteroide-desidrogenase/isomerase=3β- HSD; aromatase=CYP19. As reações enzimáticas realizadas a nível mitocondrial estão ressaltadas na cor laranja e as reações no nível citoplasmático na cor verde.

Fonte: Adaptado de Häggström e Richfield, 2014.

A produção de hormônios andrôgenos C19 (Figura 3-2), como a testosterona (T) e a androstenediona (AE), e os estrogênios C18 como estrona (E₁) e o estradiol (E₂) são regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise gonadal (HPG) (ELLIS; JACKSON; BOYCE, 2006; JONES, 2015). Estes mensageiros químicos são sintetizados nas gônadas a partir do colesterol (C27) (GOODSON *et al.*, 2005; JONES, 2015). No entanto, em regiões do diencéfalo e telencéfalo das aves, a sínteses de esteroides sexuais têm sido descritas de forma independente das gônadas, denominando-se como neuroesteróides (GOODSON *et al.*, 2005; MATSUNAGA; UKENA; TSUTSUI, 2002; TSUTSUI; MATSUNAGA;

UKENA, 2003; TSUTSUI; YAMAZAKI, 1995; UKENA *et al.*, 1999). Uma vez produzidos, os hormônios conjugados a proteínas ou não (DEVICHE; BREUNER; ORCHINIK, 2001; LARSON *et al.*, 2015) são direcionados ao tecido-alvo pela corrente sanguínea com a finalidade de regular, integrar e controlar as funções corporais (CREWS; MOORE., 2005; RANGEL-NEGRÍN; DUARTE DIAS; CANALES-ESPINOSA, 2011).

Os andrógenos produzidos pelas células de Leydig contribuem para a maturação das gónadas em resposta à foto-estimulação (DEVICHE *et al.*, 2006). Adicionalmente, maiores níveis plasmáticos de T estão associados aos comportamentos territoriais e, também, aos parâmetros de qualidade da concentração e morfologia espermática aviária (DUYSE; PINXTEN; EENS, 2003; PENFOLD *et al.*, 2000; SASVÁRI; PÉCZELY; HEGYI, 2009).

Os hormônios estrogênicos como E₁ e E₂ são produtos da aromatização da AE e T, respectivamente (GOODSON *et al.*, 2005). No estado embrionário das aves, esta reação enzimática se vê interrompida nos processos de diferenciação sexual, permitindo o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos (ANDREWS; SMITH; SINCLAIR, 1997; GRZEGORZEWSKA *et al.*, 2009; SHIMADA; YOSHIDA; SAITO, 1996; VAILLANT *et al.*, 2001). No estado adulto dos machos, a esteroidogênese dos hormônios estrogênicos tem sido observada nas células de Leydig, nas células germinais imaturas do testículo, em espermatozoides e no cérebro (BALTHAZART *et al.*, 2004; CARREAU; BOURAIMA-LELONG; DELALANDE, 2012; CZAJKA; SIMPSON, 2010; HESS; CARNES, 2004; KWON *et al.*, 1995; VAILLANT *et al.*, 2001).

O aumento dos níveis plasmáticos de estrógenos nos machos tem sido relacionado ao comportamento de acasalamento, cortejo e cópula (BALL; BALTHAZART, 2004; LESKA; DUSZA, 2007). Além disso, altos níveis de E₂ apresentam um efeito inibitório sobre a produção de LH (SANDBERG, 1980), produzindo um *feedback* negativo sobre a secreção de T nas células de Leydig (SHARPE, 1998). Complementarmente, a presença do estradiol e seus receptores nos ductulos eferentes do testículo está relacionada ao controle da reabsorção de fluidos, aumentando a concentração de espermatozoides no sêmen e, portanto, aumentando a probabilidade do sucesso da fertilização (HESS *et al.*, 1997; HESS; CARNES, 2004). Além da regulação primária do transporte de fluidos e íons, o estrogênio também é responsável por manter uma

morfologia epitelial diferenciada nestas células através de um mecanismo ainda a ser descoberto (HESS; CARNES, 2004).

3.8 MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS NA REPRODUÇÃO DAS AVES

No levantamento bibliográfico realizado até o presente, não foram encontradas pesquisas que descrevam o efeito regulador dos fatores ambientais sobre os processos neuroendócrinos reprodutivos em aves noturnas. Sendo assim, no presente documento serão descritos os processos fisiológicos encontrados para outras espécies de aves, acreditando-se que a variação no ambiente fótico e a presença de fotorreceptores cerebrais possam regular também as atividades sazonais reprodutivas das corujas (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2007).

A dinâmica reprodutiva das aves pode ser dividida nos estágios fisiológicos de fotossensibilidade e fotorrefratariedade (DAWSON; SHARP, 2007). A detecção de luz ocorre por meio de fotorreceptores localizados no hipotálamo basal e na eminência média (KUENZEL, 1993; LESKA; DUSZA, 2007; MENAKER *et al.*, 1970), compostos por foto pigmentos de rodopsina que transformam a energia do fóton em impulsos neurais (FOSTER; FOLLETT; LYTHGOE, 1985; WADA *et al.*, 1998) (Figura 3-3). Enquanto a informação fotoperiódica é percebida por fotorreceptores hipotalâmicos, estímulos suplementares são percebidos pelos sistemas visual e auditivo (BALL, 1993). Ambos tipos de informação convergem no sistema GnRH de neurônios no telencéfalo mais especificamente no subpálio (KUENZEL; GOLDEN, 2006), estimulando a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina tipo I (cGnRH-I do inglês *chicken gonadotrophin-releasing hormone-I*) (BALL, 1993; KUENZEL; GOLDEN, 2006).

O cGnRH-I secretado, passa através de um sistema portal sanguíneo para a hipófise onde estimula a síntese do hormônio luteinizante (LH do inglês *luteinizing hormone*) e o hormônio folículo estimulante (FSH do inglês *follicle stimulating hormone*) (SHARP; DAWSON; LEA, 1998; UBUKA; BENTLEY; TSUTSUI, 2013). Estes dois hormônios são secretados na circulação e induzem a maturação gonadal (DAWSON, 2008; SHARP *et al.*, 1990).

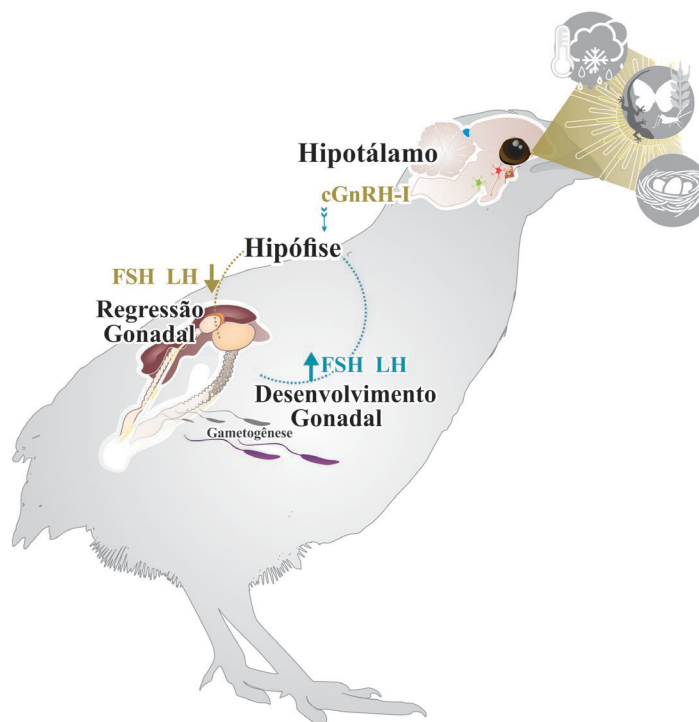


Figura 3-3 – Modelo esquemático do eixo hipotálamo-hipófise gonadal das aves. Os indivíduos detectam a mudança de sinais ambientais como o fotoperíodo, onde os neurônios hipotalâmicos integram sinais externos e internos, regulando a reprodução através da liberação de neuro-hormônios na eminência mediana para regular a secreção hormonal na hipófise. A hipófise anterior sintetiza e libera gonadotropinas (LH: Hormônio Luteinizante, FSH: Hormônio Folículo Estimulante), que atuam sobre as gônadas para estimular, por exemplo, a gametogênese e a secreção de esteroides sexuais nos machos.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022).

O estado de fotorrefratariedade pode acontecer mesmo em dias longos (DAWSON; SHARP, 2007; ROBINSON; FOLLETT, 1982), ocorrendo uma diminuição da secreção de LH e conseqüentemente a regressão gonadal, o que sinaliza o fim da época de reprodução (PERFITO *et al.*, 2011; ROBINSON; FOLLETT, 1982). A diminuição dos níveis plasmáticos de LH está relacionada aos altos níveis de prolactina (PRL) e aos efeitos antagônicos do hormônio inibidor da gonadotrofina (GnIH do inglês *gonadotrophin-inhibiting hormone*) produzido pelos neurônios do núcleo paraventricular e eminência mediana no hipotálamo (DAWSON; SHARP, 2007; TSUTSUI *et al.*, 2000). A condição refratária ou não-responsiva fornece tempo para acumular reservas nutricionais antes do inverno ou para muda de penas antes da migração (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2007).

3.9 HORMÔNIOS GONADOTRÓPICOS E SEU EFEITO NO TECIDO TESTICULAR

A produção de gametas e a atividade endócrina dos testículos são reguladas por dois hormônios gonadotrópicos pituitários: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) (RITCHIE, 2014). Estes hormônios são constituídos por duas subunidades de glicoproteínas, cada uma com subunidades alfa e beta (PIERCE; PARSONS, 1981). Uma vez que o limiar fotoperiódico é atingido, os níveis plasmáticos de FSH são aumentados de maneira gradual, coincidindo com o desenvolvimento gonadal e os comportamentos de construção do ninho (HAASE; SHARP; PAULKE, 1985; LEWIS; PERRY; MORRIS, 1999). Posteriormente, os níveis de LH alcançam seu máximo em tempo quase imediato, associados com o comportamento de territorialidade (LESKA; DUSZA, 2007; SILVERIN; KIKUCHI; ISHII, 1999).

As gonadotrofinas exercem seus efeitos nos testículos ao se ligarem aos receptores específicos na superfície das células de Leydig e de Sertoli (GRZEGORZEWSKA *et al.*, 2009). A LH atua nas células de Leydig estimulando a produção de andrógenos enquanto a FSH age concomitantemente com os andrógenos sobre as células de Sertoli e as espermatogônias promovendo a espermatogênese (DEVICHE *et al.*, 2006; LESKA; DUSZA, 2007; SAFIAN; BOGERD; SCHULZ, 2019). Quando os níveis séricos de andrógenos estão elevados, estes atuam regulando os níveis plasmáticos de LH por meio de retroalimentação negativa (LESKA; DUSZA, 2007).

A espermatogênese é o processo onde células germinais diploides testiculares são transformadas em células haploides, diferenciando-se posteriormente em espermatozoides (AIRE; GEORGE; INDIES, 2018; SAFIAN; BOGERD; SCHULZ, 2019). Neste processo, as células somáticas testiculares respondem aos sinais do sistema endócrino, modulando e fornecendo o suporte estrutural e metabólico para o desenvolvimento e sobrevivência das células germinativas (SAFIAN; BOGERD; SCHULZ, 2019). No compartimento espermatogênico do parênquima testicular, as células germinativas são expostas a um período de multiplicação por mitose, produzindo as espermatogônias (Ad) que, posteriormente, no período de crescimento sem divisão celular, dão origem aos espermátócitos primários (Ap1). Estas células sofrem dois processos de divisão meiótica, na meiose I são formados dois espermátócitos secundários (Ap2), na meiose II cada um destes espermátócitos

secundários divide-se em dois espermatídeos (B) (LIN; JONES, 1992). Finalmente, estes se diferenciam, através da espermiogênese, em espermatozoides (LIN; JONES, 1992, 1993). A duração da espermatogênese é inferida baseando-se no número de ciclos possíveis que ocorrem desde o tempo da divisão da espermatogônia inicial até a liberação das espermátidas do epitélio seminífero (JONES; LIN, 1993). Em codornas, a caracterização dos diferentes tipos de espermatogônios no epitélio seminífero determinou que a duração da espermatogênese é de aproximadamente 12,8 dias (4,75 ciclos) (LIN; JONES, 1992). Resultados similares foram obtidos na mesma espécie com técnicas de radiomarcção e autorradiografia com [³H]thymidin (AMIR; BRAUN-EILON; SCHINDLER, 1973; CLULOW; JONES, 1982).

3.10 FATORES AMBIENTAIS E PROCESSOS REPRODUTIVOS

Na maioria das espécies de aves, a sazonalidade reprodutiva se apresenta como produto de um processo adaptativo para aumentar a probabilidade de sobrevivência da prole em determinada época do ano (DAWSON; SHARP, 2007; LESKA; DUSZA, 2007; SHARP, 1996). Esta sazonalidade está associada a fatores externos como o fotoperíodo (duração de luz do dia), clima, disponibilidade de alimento, interações sociais, disponibilidade de um local de nidificação, entre outros (BALL, 1993; DAWSON, 2008; DAWSON; SHARP, 2007; LESKA; DUSZA, 2007; MORAIS *et al.*, 2012). O fotoperíodo e o relógio endógeno (*circannual clock*) são conhecidos como os fatores mais importantes para fornecer o sinal *go/no-go* que inicia o desenvolvimento gonadal (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2007; DAWSON, 2008; FOLLETT; MATTOCKS; FARNER, 1974; SHARP, 2005).

A resposta ao fotoperíodo é específica para cada espécie, mencionando-se por exemplo que na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) e no pardal branco de Gambel (*Zonotrichia leucophry*) são necessários períodos de luz mais longos para induzir o crescimento testicular (FARNER; WILSON, 1957; FOLLETT; MAUNG, 1978). No entanto, em espécies como o calafate (*Padda oryzivora*) e o emu (*Dromaius novaehollandiae*) a recrudescência gonadal é pela diminuição do fotoperíodo (BLACHE *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 1992). Além disso, outros fatores suplementares como as interações com o parceiro, aumentam a fotoindução do crescimento das gônadas e ajustam o início ou o final da reprodução (BALL, 1993; DAWSON; SHARP, 2007).

3.11 SÍNTESE E FUNÇÃO DA AROMATASE EM AVES

Como mencionado anteriormente, a aromatase é uma enzima que catalisa a conversão de hormônios androgênicos em estrogênios (BALTHAZART; BAILLIEN; BALL, 2001; GOODSON *et al.*, 2005). Em aves, essa proteína pode ser identificada no trato reprodutivo masculino e também no tecido cerebral (BALTHAZART; BAILLIEN; CHARLIER, 2003; DICKENS *et al.*, 2014; HESS; CARNES, 2004; KWON *et al.*, 1995; VAILLANT *et al.*, 2001).

Esta enzima pertence à superfamília do citocromo P450 e é produto da transcrição e tradução do gene CYP19A1 (CZAJKA; SIMPSON, 2010). A transcrição deste gene apresenta diferenças entre espécies, sexo e idade dos indivíduos (CHAO; SCHLINGER; REMAGE-HEALEY, 2016; LANCE *et al.*, 2003; SALDANHA; SCHLINGER, 1997; SMITH; ANDREWS; SINCLAIR, 1997). Registra-se, por exemplo, a presença deste gene nos testículos de galos adultos (*Gallus gallus*) mas não no estado juvenil (SMITH; ANDREWS; SINCLAIR, 1997). Em passeriformes, como o diamante mandarim e o chopim (*Molothrus ater*), a expressão de CYP19A1 ocorre no hipotálamo, telencéfalo e na área pré-óptica, encontrando-se as maiores quantidades de ARNm nesta última área (BALTHAZART *et al.*, 2004; SALDANHA; SCHLINGER, 1997; SCHLINGER; ARNOLD, 1991). No entanto, a presença do CYP19A1 não foi confirmada nos testículos do diamante mandarim, sugerindo que os níveis circulantes de estradiol nesta espécie são unicamente de origem cerebral (FREKING; NAZAIRIANS; SCHLINGER, 2000; SCHLINGER; ARNOLD, 1991).

A ação da aromatase no tecido cerebral está relacionada aos comportamentos do canto em passeriformes como o diamante mandarim (*Taeniopygia guttata*) (PETERSON *et al.*, 2005; SALDANHA *et al.*, 2000) e o comportamento sexual em codornas (*Coturnix japonica*) (BALL; BALTHAZART, 2004; BALTHAZART *et al.*, 2004; CORNIL *et al.*, 2006). Nesta última espécie, a atividade da aromatase é regulada mediante a fosforilação dependente de cálcio, permitindo assim a sua ação mais rápida (BALTHAZART; BAILLIEN; BALL, 2001; BALTHAZART; BAILLIEN; CHARLIER, 2003; DICKENS *et al.*, 2014).

3.12 RECEPTORES DE HORMÔNIOS ESTROGÊNICOS E ANDROGÊNICOS

Embora os hormônios reprodutivos possam ter efeitos não-genômicos nas células do sistema nervoso central (JOËLS, 1997; RAMIREZ; ZHENG; SIDDIQUE, 1996),

acredita-se que a maioria das ações destes esteroides sejam mediadas pelo reconhecimento e união a proteínas receptoras nucleares (VERDERAME; SCUDIERO, 2018). Neste mecanismo, o complexo hormônio/receptor atua como um fator de transcrição que se liga ao DNA a fim de regular a expressão gênica (MANGELSDORF *et al.*, 1995; VERDERAME; SCUDIERO, 2018). A testosterona e o 5 α -dihidrotestosterona apresentam uma alta afinidade pelo receptor androgênico (AR) (GRINO; GRIFFIN; WILSON, 1990). Já para os hormônios estrogênicos são descritos dois tipos de receptores com subunidades alfa e beta (ER α e ER β), podendo apresentar uma conformação em homodímeros ($\alpha\alpha$ e $\beta\beta$) ou heterodímeros ($\alpha\beta$) (BÖTTNER; THELEN; JARRY, 2014; VERDERAME; SCUDIERO, 2018), determinando-se tamanhos de 66 kDa e 61 kDa no tecido de galinhas (CAMACHO-ARROYO *et al.*, 2003; GRIFFIN *et al.*, 1999).

As proteínas receptoras AR são sintetizadas a partir da transcrição do gene AR localizado no cromossoma 4 (KATOH; OGINO; YAMADA, 2006), e os receptores ER α e ER β , a partir dos genes ESR1 e ESR2 no cromossomo 3 (FRANKL-VILCHES; GAHR, 2018). O gene de cada uma destas proteínas receptoras é formada por oito éxons codificadores (Figura 3-4): o éxon 1 codifica o domínio amino terminal (NTD, rosa), os éxons 2 e 3 codificam o domínio de ligação do DNA (DBD, laranja), o éxon 4 codifica a região da dobradiça (H, verde), os éxons 5-8 codificam o domínio de ligação dos ligados (LBD, violeta) (FRANKL-VILCHES; GAHR, 2018; MANGELSDORF *et al.*, 1995).



Figura 3-4 – Representação gráfica dos domínios dos receptores nucleares. Um receptor nuclear típico contém uma região N-terminal variável, um DBD conservado, uma região de dobradiça variável (H) e o domínio de ligação dos ligados (LBD). Em particular, os éxons que codificam os domínios DBD, H e LBD são altamente conservados em mamíferos e aves, enquanto o domínio do amino terminal é menos conservado em vertebrados.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022).

Pesquisas em aves reportam o isolamento e identificação destas proteínas receptoras em células somáticas e germinais testiculares, como também em núcleos cerebrais implicados no controle da reprodução, tais como o núcleo pré-óptico medial, o núcleo striae terminalis e o núcleo taeniae (homólogo aviário da amígdala em mamíferos) (FOIDART *et al.*, 1999; GONZÁLEZ-MORÁN, 2019; GRIFFIN *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2019; LAKAYE *et al.*, 1998; OPAŁKA *et al.*, 2008).

3.13 TÉCNICAS MOLECULARES E SUA APLICABILIDADE NO USO DOS PROCESSOS REPRODUTIVO DAS AVES

Em espécies silvestres, a implementação de técnicas moleculares tem auxiliado na identificação de novos táxons (DANTAS *et al.*, 2021), na criação e/ou confirmação de hipóteses filogenéticas (AWAD; KHALIL; ABD-ELHAKIM, 2015) e inclusive, o estabelecimento de programas contra o comércio de espécies ameaçadas de extinção (WASSER *et al.*, 2004). Entre estas técnicas moleculares, o PCR quantitativo em tempo real baseado em fluorescência (qPCR), resulta ser um dos métodos mais comumente aplicados para a quantificação de ácidos nucleicos em diferentes áreas das ciências da vida (BUSTIN *et al.*, 2009). Além da quantificação do DNA (PCR) ou do RNA (RT-PCR), pode-se citar outros métodos moleculares de muita valia no entendimento dos processos reprodutivos das aves, por exemplo, a localização ou identificação dos ácidos nucleicos (hibridização *in situ*, *Southern e Northern Blotting*) ou proteínas (*Western Blotting*) (CAMACHO-ARROYO *et al.*, 2003; FOIDART *et al.*, 1999; GONZÁLEZ-MORÁN *et al.*, 2008; KATOH; OGINO; YAMADA, 2006; KWON *et al.*, 1997; LAKAYE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SHANBHAG; SHARP, 1996).

3.14 VALIDAÇÃO DE IMUNOENSAIOS PARA DOSAGEM DE HORMÔNIOS ESTEROIDES

Imunoensaios são testes bioquímicos que identificam e/ou quantificam o analito da solução através da conjugação de um anticorpo (Ac) com um antígeno (Ag) (PORSTMANN; KIESSIG, 1992). Esta reação pode ser monitorada por meio de técnicas espectrofotométricas, como é o caso dos imunoensaios enzimáticos (EIA), ou por meio de técnicas radioquímicas, neste caso identificadas como radioimunoensaios (RIA)(SEO, 2000; YALOW, 1978). Apesar de ambas técnicas serem largamente utilizadas na quantificação de hormônios, assim como qualquer procedimento analítico, estes métodos devem ser devidamente validados para assegurar a confiabilidade dos resultados e minimizar os erros aleatórios ou sistemáticos (ANDREASSON *et al.*, 2015; STANCZYK; LEE; SANTEN, 2007). Adicionalmente, na maioria dos casos, os anticorpos utilizados nestes ensaios são obtidos a partir de tecidos de mamíferos, sendo necessário também a sua validação fisiológica para que possam ser aplicados em outros grupos vertebrados como, por exemplo, espécies aviárias.

Os principais parâmetros analíticos que devem ser avaliados nos imunoenaios são especificidade, exatidão e precisão. O teste de paralelismo é uma forma indireta de avaliar a especificidade do ensaio e é realizado através de diluições sucessivas da amostra (plasma ou extrato de esteroides fecais do animal) e do padrão do hormônio (BIELOHUBY; POPP; BIDLINGMAIER, 2012; LÈCHE *et al.*, 2009). No teste de recuperação (%REC) é avaliada a exatidão. Este teste verifica a presença de possíveis interferentes na matriz analisada (plasma ou excrementos) os quais poderiam afetar a ligação do anticorpo-hormônio e, conseqüentemente, o resultado da análise (LÈCHE *et al.*, 2009). Já a precisão do ensaio é avaliada através do coeficiente de variação obtido a partir da repetibilidade intra e interensaios (CORADELLO *et al.*, 2012).

Finalmente, é crucial demonstrar que as medidas hormonais refletem com precisão os eventos fisiológicos de interesse (BROWN *et al.*, 2005). Por exemplo, mostrar que o aumento na produção de testosterona plasmática coincide com os comportamentos reprodutivos de cópula nos machos (BARBOSA-MOYANO; SILVA; PINILLA, RAMÍREZ PATRICIA, 2020). Entre os ensaios realizados com este fim, pode-se mencionar a administração de um medicamento específico para estimular a produção hormonal por exemplo, os sintéticos de GnRH e/ou ACTH.

3.14.1 Quantificação de hormônios esteroides

Comumente os imunoenaios enzimáticos são realizados em microplacas de titulação feitas de poliestireno com 96 poços distribuídos em 8 linhas (A-H) e doze colunas (1-12). A organização das amostras dentro da placa não segue um padrão comum, no entanto, recomenda-se a realização de cada amostra ou padrão em duplicata e em sentido crescente das linhas. Ao realizar cada teste de imunoenasão, além das amostras que se desejam quantificar, a placa deve conter poços contendo: branco, zero e curva de calibração (hormônio padrão em diferentes concentrações) (BROWN *et al.*, 2005). Depois de preparadas e incubadas, as placas são levadas a um espectrofotômetro ELISA para a leitura dos poços em determinado comprimento de onda, geralmente 405 ou 450 nm, a depender do método utilizado. Os valores de densidade óptica (OD do inglês *optical density*) para cada um dos poços são registrados em duplicatas.

O poço indicado como “branco” não contém o anticorpo, e se faz necessário para determinar a influência do fundo da placa (BROWN *et al.*, 2005). O poço “zero” ou B_0 é aquele que contém apenas o conjugado enzimático e o anticorpo. Neste caso, espera-se que a densidade óptica seja máxima, uma vez que não possui o antígeno marcado

(amostra ou padrão). O valor de ligação não-específica (NSB do inglês *Non-specific Binding*) corresponde à diferença entre os valores médios OD dos poços *branco* e *zero*. Por fim, de acordo com Brown e colaboradores (2005), para determinar a porcentagem de ligação específica ou %*Binding* (do inglês) de cada amostra ou padrão, deve-se utilizar a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Binding} = \frac{\text{OD Amostra ou Padrão} - \text{NSB}}{\text{Zero}}$$

Os valores obtidos do percentual de ligação são posteriormente ajustados numa curva de regressão de quatro parâmetros (4PL). Este modelo ajusta os dados das concentrações do hormônio padrão realizando uma curva sigmoide simétrica (Figura 3-5). As concentrações desconhecidas das amostras são determinadas a partir do ajuste dos dados na curva 4PL. Estas fórmulas encontram-se disponíveis em programas de análise de dados como Prism[®], como também em recursos online disponibilizados pelos laboratórios que comercializam os imunoenaios¹.

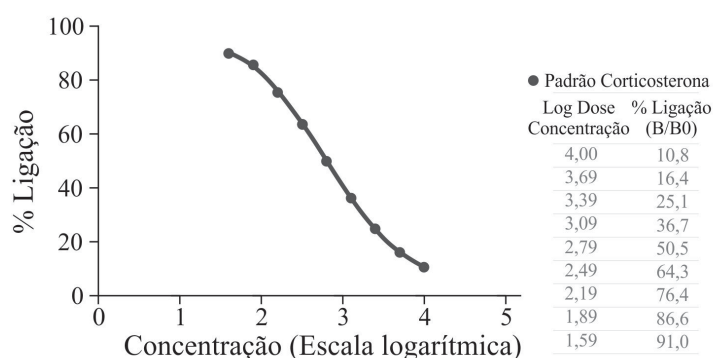


Figura 3-5 – Representação gráfica da curva gerada pela diluição de padrão de corticosterona fator 2 detectada pelo imunoenensaio enzimático K014-H5 de Arbor assay. Os nove pontos foram gerados a partir do padrão de corticosterona disponível no kit com uma concentração inicial de 10000 pg/mL (transformado na base log10) e plotado versus a porcentagem de ligação detectada no EIA.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022).

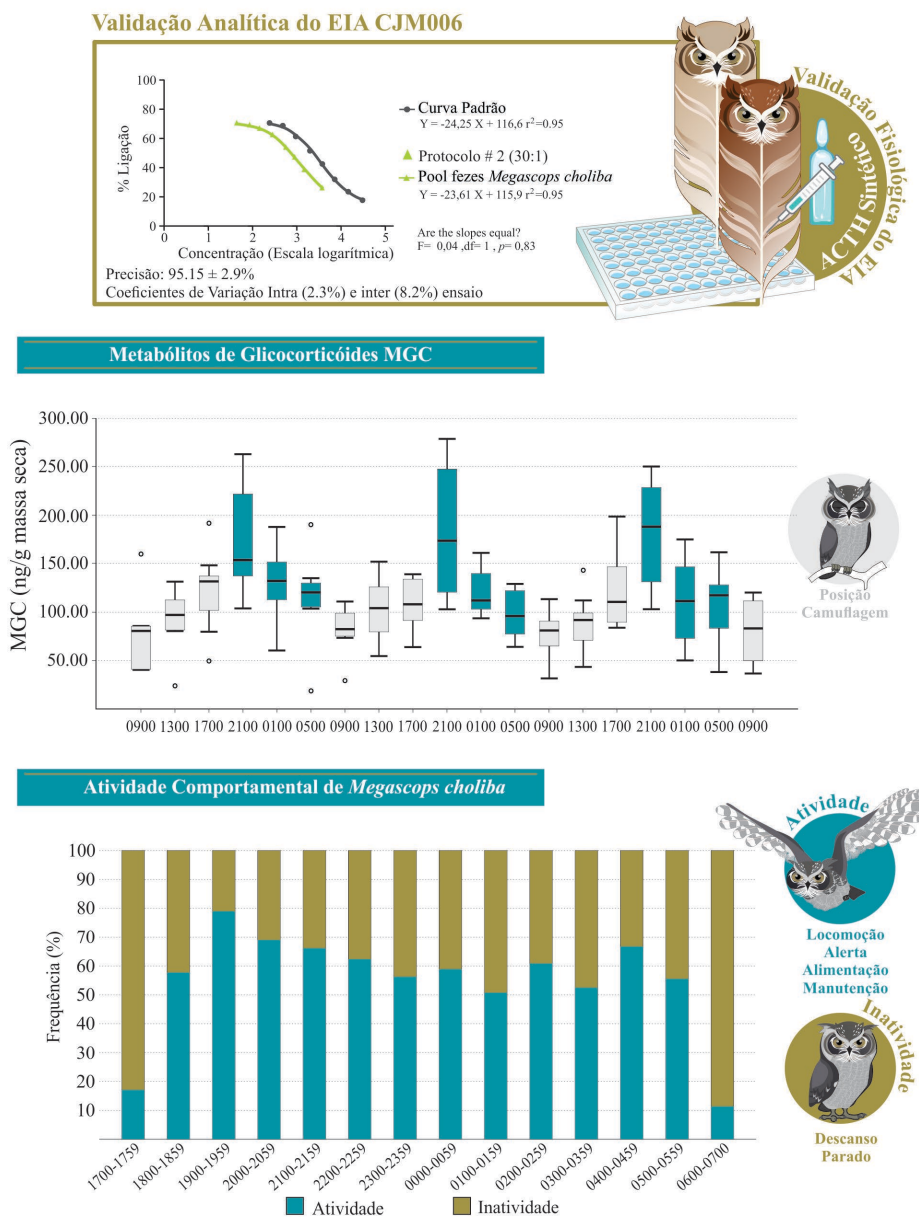
¹ Disponível em <https://myassays.com/arbore-assays-corticosterone-enzyme-immunoassay-kit-improved-sensitivity.assay>

Finalmente, para obter o teor do hormônio na amostra, deve-se considerar a quantidade da amostra inicial (ex. massa das fezes ou volume de soro), o volume adicionado e recuperado do solvente usado para a extração dos hormônios (ex. metanol), o volume do EIA buffer utilizado para ressuspender a amostra após a secagem, o fator de diluição, e o volume de EIA utilizado (PALME, 2005). De acordo com Palme *et al.* (2013), sugere-se o uso da seguinte fórmula para amostras de fezes, onde o teor final do hormônio na amostra é expresso em ng (de esteroide) / g (de fezes):

$$\text{Amostra ng/g} = \frac{\left(\text{Valor obtido em } \frac{\text{pg}}{\text{mL}}\right) \times \text{Volume do Extrato} \times \text{Fator de Diluição}}{\text{Massa Fecal} \times \text{Volume EIA} \times 1000}$$

4 CAPÍTULO 1: “ATIVIDADE COMPORTAMENTAL E METABÓLITOS DE GLICOCORTICÓIDES EM CORUJAS (*Megascops choliba*) MANTIDAS EM CATIVEIRO”

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

O EIA foi validado analítica e fisiologicamente para quantificar MGC em fezes de *Megascops choliba*.

O fotoperíodo é um fator determinante no padrão de produção de MGC em corujas.

Os níveis de MGC apresentaram relação com as atividades comportamentais de corujas.

**Atividade comportamental e metabólitos de glicocorticoides em corujas
(*Megascops choliba*) mantidas em cativeiro**

RESUMO

Os glicocorticoides mediam processos fisiológicos para a obtenção de energia, apresentando uma variação diária nos níveis basais plasmáticos que pode estar relacionada com o padrão de atividade comportamental dos indivíduos. A identificação da plasticidade na secreção destes hormônios é essencial para a compreensão de seus efeitos na fisiologia e comportamento nas aves silvestres e, portanto, o sucesso em seu ambiente natural ou artificial. Avaliações endócrinas seriadas são facilitadas pela implementação de metodologias não invasivas que minimizam o possível efeito da manipulação nas variáveis fisiológicas do animal. No entanto, estudos endócrino-comportamentais não invasivos em aves de comportamento noturno, como as corujas, são esporádicos. O presente capítulo teve como objetivo validar um imunoenensaio enzimático (EIA) para quantificação do nível de metabólitos de glicocorticoides (MGC) em *Megascops choliba*, assim como avaliar a produção de MGC para cada indivíduo e o seu efeito em função do sexo e horário de amostragem. O comportamento de nove corujas também foi registrado e analisado durante três dias contínuos. O EIA mostrou-se eficaz nos ensaios analíticos e no teste farmacológico com ACTH sintético, validando assim o imunoenensaio para a espécie estudada. Diferenças individuais no nível de MGC foram mais acentuadas entre as 17h00 e 21h00, mas não significativamente diferentes em função do sexo. Durante o período noturno, as corujas apresentaram maior atividade comportamental relacionada positivamente aos valores de MGC. Além disso, maiores concentrações de MGC foram significativamente relacionadas à maior expressão de comportamentos de manutenção. Os resultados aqui apresentados servirão para futuras avaliações de situações desafiadoras e/ou perturbadoras que resultem em alterações endócrinas comportamentais em corujas mantidas sob cuidados humanos.

Palavras-chave: ACTH. Etograma. Ritmo circadiano. Strigiformes. Validação de imunoenensaio.

Activity budgets and glucocorticoid metabolites in captive owls (*Megascops choliba*)

ABSTRACT

Glucocorticoids mediate physiological processes to obtain energy, presenting daily variation in basal plasma levels that may be related to behavioral activity pattern. Identification of plasticity in the secretion of these hormones is essential to understand their effects on physiology and behavior of wild birds and, therefore, their success in their natural or artificial environment. Serial endocrine evaluations are facilitated by implementation of non-invasive methodologies that minimize possible effects of manipulation on the animal's physiological variables. However, non-invasive endocrine-behavioral studies in nocturnal birds such as owls are sporadic. The present work aimed to validate an enzyme immunoassay (EIA) to quantify glucocorticoid metabolites (MGC) in *Megascops choliba* as well as to evaluate differences in their production at the individual, sexual or daily level. We also recorded the behavior of nine owls during three continuous days to establish activity budget under captive conditions and aiming to correlate with daily MGC variation. The EIA proved to be effective in analytical assays and in pharmacological testing with synthetic ACTH, so validating this immunoassay for the species. Additionally, individual differences in MGC production were confirmed in relation to the time of day, especially by 1700 and 2100, but do not differ according to sex. During the nocturnal period, the owls showed greater behavioral activity, positively related to MGC values. Furthermore, higher MGC concentrations were significantly related to greater expression of maintenance behaviors. The results presented here will serve for future evaluations of challenging and/or disturbing situations that result in behavioral endocrine changes in owls kept under human care.

Keywords: ACTH. Ethogram. Daily rhythm. Strigiformes. Immunoassay validation.

4.1 INTRODUÇÃO

O cortisol e a corticosterona são hormônios glicocorticoides (GC) que regulam processos fisiológicos como a aquisição, deposição e mobilização de energia (BUSCH; HAYWARD, 2009; ROBART; MORADO; WATTS, 2019). A síntese destes hormônios esteroides por parte da glândula adrenal é sensível aos fatores ambientais como por exemplo as variações fotodinâmicas diárias correspondentes ao ritmo circadiano (ALBRECHT, 2013; BOISSIN; ASSENMACHER, 1970; NICOLAIDES *et al.*, 2015). Em algumas espécies de comportamento diurno, o pico na produção de GC ocorre no final do período escuro, enquanto que em espécies de hábitos noturnos, o pico ocorre no final do período claro; associando a variação dos níveis de GC às atividades de gasto de energia (ex. locomoção e reprodução) ou aquisição de energia (ex. forrageamento e descanso) (TOUMA; PALME, 2005). No entanto, a produção destes hormônios pode ser alterada após a exposição dos indivíduos a situações perturbadoras, como interações agonísticas e/ou presença de predadores (ROMERO; BEATTIE, 2022), denominada por Cannon (1932) como resposta de luta ou fuga (do inglês *fight-or-flight*). Assim, os glicocorticoides exercem um efeito mediador fisiológico e comportamental nos processos alostáticos durante atividades previsíveis ou situações imprevisíveis e/ou desafiadoras (LANDYS; RAMENOFISKY; WINGFIELD, 2006; MASTORAKOS *et al.*, 2005; THERRIEN *et al.*, 2008).

O estágio da história de vida dos indivíduos influencia a variação dos níveis basais dos GC, registrando-se em aves, por exemplo, níveis de GC maiores durante o estabelecimento de territórios de reprodução (ROMERO; RAMENOFISKY; WINGFIELD, 1997) e durante a dispersão natal (BELTHOFF; DUFTY, 1998; HOLEKAMP; SHERMAN, 1989). Adicionalmente, a produção, síntese e metabolismo de glicocorticoides podem ser diferentes entre machos e fêmeas (GOYMANN, 2005), apresentando-se também diferenças no nível interindividual (LOVE *et al.*, 2014; MADLIGER; LOVE, 2013; OUYANG *et al.*, 2013), identificando a personalidade como um fator importante na associação entre glicocorticoides e resposta comportamental (RAULO; DANTZER, 2018).

Quando os animais percebem os estímulos do ambiente como um desafio e/ou ameaça podem apresentar reações comportamentais relacionadas com o incremento na secreção de GC (COCKREM, 2013; STOCKER *et al.*, 2016). Wielebnowski e colaboradores (2002) identificaram concentrações médias de metabólitos de

glicocorticoides (MGC) correlacionados positivamente com comportamentos de automutilação em *Neofelis nebulosa* mantidos *ex situ*. No entanto, nem sempre é possível estabelecer e/ou confirmar esta relação (CYR; ROMERO, 2008; MUNTEANU et al., 2017). No passeriforme *Sporophila angolensis*, por exemplo, foram identificados comportamentos de *freezing* ao estimular os machos com ACTH sintético, mas não foi confirmada sua correlação com os níveis de MGC (BARBOSA-MOYANO et al., 2019). Animais silvestres sob cuidados humanos são rotineiramente expostos a procedimentos de manejo que podem ser interpretados como estressores emocionais (COCKREM, 2007; CYR; ROMERO, 2008). Assim, a avaliação da saúde comportamental, emocional e mental integrados com biomarcadores fisiológicos não invasivos como MGC resultam úteis na obtenção de informação sobre o status de bem-estar de um indivíduo (MOTTA-JUNIOR; BRAGA, ROCHA; GRANZINOLLI, 2017; PALME, 2019; WHITHAM; BRYANT; MILLER, 2020). Embora úteis, as avaliações endocrinológicas comportamentais são escassas em aves noturnas como nas corujas (por exemplo, *Strix occidentalis caurina*, Wasser and Hunt (2005) e *Tyto alba*, Béziers et al. (2020)). Há cerca de 250 espécies de corujas distribuídas em todo o mundo (KÖNIG et al., 2008) sendo as corujas neotropicais pouco estudadas em comparação com as corujas de clima temperado (ENRÍQUEZ et al., 2017). Apesar da importância para o manejo em cativeiro e conservação destas espécies silvestres, faltam conhecimentos sobre endocrinologia comportamental destas aves rapinantes.

O objetivo do presente trabalho é fornecer uma avaliação endocrinológica e comportamental de uma ave noturna, compreendendo as fontes naturais de variação dos GC, ou seja, atividade diária, sexo e diferenças individuais. Nosso modelo animal é a Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*), uma espécie amplamente distribuída no continente americano em estado de conservação pouco preocupante (BIRDLIFE, 2021). Assim, pesquisas sobre esta espécie abordando questões comportamentais e endócrinas ajudarão no desenvolvimento de metodologias de conservação para esta e outras espécies de aves rapinantes noturnas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Permissão ética

Os procedimentos propostos neste capítulo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da FMVZ-USP processo N° 6896290419, pelo

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO autorização/licença processo N° 70120-1 e cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado -SisGen N°A6EEC44. Adicionalmente, as atividades que foram desenvolvidas no Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres - CeMaCAS, São Paulo, Brasil, foram aprovadas e/ou autorizadas conforme o processo N° 60272019/0000675-1.

4.2.2 Animais e alojamento

Seis corujas foram utilizadas nos testes de validação do imunoensaio (agosto/2020) e outros nove indivíduos para a quantificação dos níveis de MGC paralelamente à avaliação do orçamento de atividades (novembro/2020). Os animais avaliados estavam em idade adulta, peso médio de $118,3 \pm 9,1$ g, em período não-reprodutivo e fora da fase de muda. Todos os animais estavam na fase final de reabilitação (pré-soltura) do CeMaCAS, São Paulo, Brasil (23° 24 '47"S 46° 47' 29"W). O estado hígido dos indivíduos foi confirmado por meio de testes laboratoriais sorológicos e coprológicos.

O sexo dos indivíduos foi diagnosticado por ensaios de PCR a partir de amostras de sangue enviadas a Unigen (São Paulo, Brasil). Cada coruja foi mantida em gaiola de arame galvanizado (70 x 70 x 70 cm) contendo dois poleiros. As gaiolas foram alojadas em um recinto semiaberto de 25 m², mantendo as condições naturais do ambiente (temperatura oscilou entre 14 e 25°C com ventilação e luz natural) e evitando o contato com qualquer outra espécie. A amostragem comportamental e de fezes foi realizada entre os dias 19 e 22 de novembro de 2020, com nascer do sol próximo de 05h10 e o pôr do sol próximo de 18h30. A comunicação visual, acústica e olfativa entre os indivíduos foi permitida. As corujas foram alimentadas diariamente com presa morta (camundongos e pintinhos de codorna), oferecendo-se água *ad libitum*.

4.2.3 Validação analítica do imunoensaio

Para a determinação dos níveis de MGC presentes nas fezes das corujas, foram realizados imunoensaios enzimáticos (EIA) a base de anticorpo policlonal de corticosterona (CJM006; 1:4.000) e corticosterona conjugado com HRP (1:40.000) (Coralie Munro, Davis, CA, EUA). Devido à presença de MGC nos resíduos úricos das aves é questionável (CLAPP, 2011; WASSER; HUNT, 2005), a coleta dos excrementos

foi realizada com auxílio de uma pinça metálica evitando-se o armazenamento dos uratos. Diferentemente de outras aves, o material fecal da espécie em estudo é facilmente separável, secando-se os restos de urato com papel livre de gordura antes da armazenagem da amostra em tubos cônicos. A extração dos MGC foi realizada utilizando-se quatro diferentes protocolos conforme publicado na literatura. Brevemente, um *pool* de fezes liofilizadas de amostras coletadas às 21h00 (seis corujas) foi pesada e dividida em 4 tubos de ensaio (16 x 120 mm). As amostras de fezes liofilizadas foram incubadas com metanol com diferentes concentrações, totalizando quatro protocolos. A saber: Protocolo #1, 0,100 g de amostra + 15 mL de metanol 70%, perfazendo uma razão volume/massa de 150:1 (HAYWARD; BOOTH; WASSER, 2010); Protocolo #2, 0,050 g de amostra + 1,5 mL metanol 80%, razão 30:1 (SCHEUN; GULSON; GANSWINDT, 2020); Protocolo #3, 0,200 g de amostra + 4,0 mL metanol 90%, razão 20:1 (HUNT; TRITES; WASSER, 2004); Protocolo #4, 0,100 g de amostra + 1,0 mL metanol 80%, razão 10:1 (PALME *et al.*, 2005). Cada mistura foi agitada em multi vortex durante 5 min a 2200 rpm, por três vezes, e posteriormente centrifugada durante 10 min a 1500 g. Com auxílio de uma pipeta, os sobrenadantes foram transferidos (#1, 13,3 mL; #2, 1 mL; #3, 3,3 mL e #4, 0,65 mL) para um novo tubo de vidro e o solvente foi seco sob banho maria (60°C) e fluxo de ar. Após a secagem, 0,3 mL de solução tampão (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, BSA) foi adicionada, agitando-se a suspensão novamente no multi-vortex. Posteriormente, as amostras foram diluídas sucessivamente (14 diluições) por um fator de duas vezes. Duplicatas de cada diluição foram transferidas para as placas do EIA, e a absorbância foi lida em 405 nm utilizando um espectrofotômetro de ELISA (ELx 808TM Bio Tek Instruments Inc, USA). A curva de calibração com o padrão de corticosterona (Sigma-Aldrich C2505) foi preparada utilizando os mesmos fatores de diluições descrito acima.

Para a validação analítica do EIA foram também investigados os parâmetros exatidão e precisão. A exatidão do método foi avaliada através do ensaio de recuperação (%REC) de corticosterona: onde uma quantidade conhecida do padrão de corticosterona foi adicionada em alíquotas iguais numa amostra de extrato de esteroide com o fator de diluição de 1:16 (porcentagem de ligação próximo de 50%, resultado do teste paralelismo). O valor de %REC foi então calculado dividindo o valor resultante do EIA observado pelo esperado. A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV) intra e interensaio. As concentrações médias de CV intraensaios foram utilizadas a partir de amostras duplicadas de cada teste. O teste de CV interensaios foi

calculado a partir de controles com alta concentração (30% de ligação) e baixa concentração (70% de ligação) em cada ensaio.

4.2.4 Validação fisiológica do imunoensaio

A validação fisiológica do EIA foi realizada com seis animais adultos. Destes, uma fêmea #90089 e um macho #91876 foram tratados com análogo sintético de ACTH (Synacthen, Sigma Chemical N° A-6303) em doses de 0,5 mg/Kg e 0,25 mg/Kg, respectivamente (SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020). Um macho #88169 e uma fêmea #92166 foram tratados com 0,15 mL de solução salina, sendo a fêmea #91988 e o macho #90129 não manipulados (controle). A administração dos tratamentos foi feita via intramuscular (i.m.) com agulha de 0,13 mm, entre às 19h00 e 19h30. As amostras de material fecal foram coletadas com intervalos de 4 h, desde 34 horas antes do início dos tratamentos (momentos: -34, -30, -26, -22, -18, -14, -10, -6, -2) até 34 horas após (momentos: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34), sendo o momento “0” a hora da administração dos tratamentos. As amostras de fezes foram liofilizadas e tratadas de acordo a metodologia descrita na validação analítica do imunoensaio, Protocolo #2, 0,050 g de amostra + 1,5 mL metanol 80%, razão 30:1 (SCHEUN; GULSON; GANSWINDT, 2020). Cada amostra foi diluída em solução tampão (fator 1:16), e por fim, a concentração de MGC de cada amostra foi determinada em duplicata.

4.2.5 Coleta de dados comportamentais e dosagem de metabólitos de glicocorticoides

Durante três dias consecutivos (20 a 23 de novembro de 2020), amostras de material fecal de nove corujas (3 fêmeas e 6 machos) foram coletadas em intervalos de quatro horas (09h00, 13h00, 17h00, 21h00, 01h00 e 05h00). Este intervalo foi determinado para garantir a quantidade mínima de fezes (\pm 0,050 g) a serem processadas. As amostras foram transferidas para tubos cônicos de 2 mL que foram armazenados no freezer (80°C negativos) até sua liofilização (Liotop modelo L108). A extração de esteroides foi realizada conforme a metodologia descrita por Scheun et al. (2020), com as modificações anteriormente descritas, estimando-se a concentração de MGC em cada amostra no EIA aqui validado.

Durante os três dias de coleta de material fecal, as corujas foram monitoradas por um sistema interno de CFTV, composto por duas câmeras com resolução de imagem

HD 720p (modelo VHL 1120 B Intelbras, Brasil), acopladas a um gravador de vídeo digital DVR Multi HD (modelo MHDX 1104 Intelbras, Brasil). As câmeras possuíam um sistema de luz infravermelha que não incomodava os animais. O etograma foi elaborado com base em Barbosa-Moyano *et al.* (2019) e Ramanujam (2015), com modificações. A Tabela 4-1 descreve os 18 comportamentos que foram classificados e posteriormente separados entre padrões de atividade e inatividade para a Corujinha-do-mato.

Tabela 4-1 – Etograma *Megascops choliba* em condições de cativeiro

Categoria	Comportamento	Contexto
Descanso (Inatividade)	Camuflagem	Posição firme e estática do indivíduo, onde os movimentos da cabeça e corpo são quase nulos. As aves podem apresentar os olhos fechados ou entreabertos. Algumas vezes a ave recolhe uma pata entre a plumagem do ventre, conseguindo manter o equilíbrio no poleiro. As asas estão fechadas e o peito pode ou não estar proeminente. Ocasionalmente, as penas do corpo e cabeça não se encontram eriçadas e/ou levantadas, dando a aparência de uma ave magra e os tufo auriculares podem estar estendidos.
Parado (Inatividade)	Parar no poleiro ou no solo	Ave em pé, com as duas pernas sobre o substrato (chão da gaiola ou poleiro) e as penas não eriçadas. As asas são dobradas e mantidas sobre o uropígio, e o pescoço nem distendido ou encolhido. Inclui-se movimentos leves da cabeça e os olhos se encontram abertos.
Manutenção (Atividade)	Arrepiar as penas	As penas do corpo nas regiões do alto dorso, peito e pescoço são lentamente eriçadas e acomodadas novamente.
	Sacudir a plumagem e asas	São movimentos rápidos e em semicírculos, onde a ave sacode todas as penas do corpo junto às asas, baixando as penas depois de forma um pouco mais lenta do que do comportamento “Arrepiar as penas”. Este movimento pode ocorrer nas penas da coroa, occipício, nuca e garganta, ou somente na cauda com as retrizes entreabertas.
	Arrumar e limpar a plumagem com o bico	As aves arrumam as penas das asas, cauda, dorso e ventre com o bico. Este comportamento não apresenta padrões ou ordem de limpeza e inclui a abertura e levantamento de uma asa por vez, para acessar as penas abaixo desta. A ação de arrumar inclui a remoção de penas soltas, alisar e a organização das penas que tivessem sido deslocadas.
	Coçar as penas	A ave inclina-se um pouco para a frente, baixando a cabeça e com uma das pernas esticada para cima, coça as regiões do pescoço, cabeça e alto peito com os dedos, podendo manter as penas eriçadas nessas regiões. As regiões da cabeça e pescoço são

		esfregadas com os dedos das patas, realizando movimentos da pata de trás para frente.
	Roçar e limpar o bico	De pé, a ave roça as laterais do bico contra alguma superfície rígida, alternando o lado direito e esquerdo contra o substrato que pode ser o mesmo poleiro.
	Limpeza das patas	Os dedos são limpos com a ajuda do bico geralmente após a alimentação.
	Tomar banho	Ave está dentro do recipiente contendo água. A capacidade máxima de líquido deste recipiente é de 300 mL, podendo o indivíduo ficar em pé sem molhar o peito. A coruja sacode as asas e a cauda jogando a água em seu corpo, podendo flexionar as pernas para molhar o ventre, além de realizar movimentos rápidos e em semicírculos de todo o corpo. Mergulha a cabeça, introduzindo o bico na água e molhando até as penas do dorso da cabeça.
	Alongamento das asas e pernas	Parada de pé no poleiro, a ave ergue o corpo. As asas estendem-se e abrem-se à medida que ficam empoleiradas, podendo realizar batimento das asas quando permanecem posadas.
Locomoção (Atividade)	Voar	Deslocamento de um lado da gaiola para o outro, a partir dos poleiros, do chão ou das laterais da gaiola, envolvendo, necessariamente o batimento das asas.
	Caminhar	O animal em cima do poleiro ou no chão, deslocando-se lateralmente através de passos curtos.
	Salto	Deslocamento do indivíduo entre poleiros ou no substrato (chão), onde as asas não são completamente estendidas. O movimento é resultado do impulso simultâneo das duas pernas. Pode ter um batimento leve das asas para manter o equilíbrio ao posar.
Alerta (Atividade)	Alerta	O animal em pé com o corpo ereto ou abaixado e dirigido para a frente. A cabeça apresenta movimentos em todas as direções, podendo girar quase 180 graus.
Alimentação e excreção (Atividade)	Beber água	A ave de pé sobre o substrato inclina o corpo para frente e estica o pescoço de forma que o bico alcança a lâmina d'água, posteriormente levanta o pescoço esticando para cima e engolindo a água.
	Comer	As aves primeiramente seguram com o bico ou dedos a presa (codorna ou rato), sendo comido pequenas partes da presa ou engolindo inteira (insetos menores). Os olhos às vezes são fechados durante a ingestão. Inclui momentos de deglutição, manipulação e transporte da presa.
	Defecar	A matéria uro-fecal é excretada, podendo fazer um levantamento leve das penas da cauda.
	Regurgitar	Expulsão pelo bico de partes não digeridas das presas como penas e pelos, sob a forma de uma massa alongada.

O orçamento das atividades foi construído usando-se o método de amostragem focal instantâneo (ALTMANN, 1974), realizado por um observador treinado (HBM). Considerando que o intervalo compreendido entre 07h00 e 17h00 as corujas estavam predominantemente em posição de descanso (camuflagem); o período avaliado das corujas foi entre as 17h00 e 07h00. Os comportamentos foram estudados a cada 5 min, permitindo que os comportamentos fossem anotados em até 15 segundos; tempo necessário para diferenciar os comportamentos mais estáticos. Não foram incluídos registros que ocorreram durante a limpeza da gaiola, presença do coletor ou quando o comportamento das corujas não foi possível de se identificar (animais no ponto cego da câmera).

4.2.6 Análise de dados

Para a validação analítica do EIA, foi realizado o teste de paralelismo que consiste na avaliação estatística *Test-t* dos coeficientes angulares da equação da reta da curva de calibração do padrão de corticosterona e do *pool* de extrato de esteroides das corujas. A porcentagem de exatidão foi determinada pela divisão da concentração observada pela concentração esperada, multiplicada por 100.

As concentrações de metabólitos de glicocorticoides presentes nas fezes foram expressas em unidades de ng/g e apresentadas em valores médios com seu respectivo desvio padrão (\pm DP). A média basal da produção de MGC para cada animal foi calculada a partir dos valores reportados nas amostras coletadas antes da administração dos tratamentos (momentos -34 até -2). O valor pico de MGC foi determinado considerando-se o valor da média basal individual somado a 2,5 vezes o valor do DP.

Para avaliar a variação individual, sexual e diurna nos valores de MGC, utilizou-se modelos lineares generalizados mistos (GLMM); incluindo-se os valores de MGC como variável resposta, como variável fixa o sexo e hora e como fator aleatório a identidade da ave ($mgc \sim \text{sexo} \times \text{hora} + (1|id)$). Os modelos foram comparados com relação à distribuição dos seus resíduos (testados com o pacote DHARMA, HARTIG 2017). Os modelos estatisticamente diferentes entre si foram escolhidos com base no menor valor de AIC e, preferencialmente, no mais simples.

Para comparar comportamentos e os níveis de MGC, foi criado o orçamento de atividade individual por hora. Para tanto, o número de vezes que cada comportamento foi observado e dividido por 12 (número máximo de exames por hora por indivíduo). Além disso, as proporções horárias foram transformadas em arco seno se tal distribuição

residual melhorasse. O orçamento de atividade por hora foi calculado em blocos de 4 horas para corresponder ao intervalo de coleta de fezes. Considerando o atraso de excreção, os valores de CMG foram transferidos para os blocos de 4 horas anteriores. Os níveis de MGC foram utilizados como variáveis dependentes e independentes nos GLMMs. Uma vez que não é possível estabelecer causa e consequência entre variação hormonal e comportamento, esta abordagem é aconselhável (Becker e Breedlove, 2002). Em cada GLMM, padrões ou categorias de comportamento foram empregados separadamente. Para todas as análises foi considerado o nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Validação analítica e fisiológica do imunoensaio

Os coeficientes angulares das curvas do *pool* das corujas obtidos a partir dos quatro diferentes métodos de extração encontram-se na Tabela 4-2. Todos os quatro protocolos de extração apresentaram equações da reta estatisticamente semelhantes à equação da reta da curva do padrão de corticosterona, confirmando o paralelismo das curvas (Figura 4-1) e validando o ensaio. Este teste indica a similaridade imunogênica entre os antígenos padrão e os antígenos da amostra das corujas.

Tabela 4-2 – Resultados do teste t avaliando a similaridade entre os coeficientes angulares das curvas geradas dos diferentes tratamentos versus curva padrão de corticosterona

	Coefficiente angular	Coefficiente linear	r²	Teste de t
Padrão de Corticosterona	-24,25	116,6	0,95	
Protocolo #1	-25,15	125,2	0,97	F= 1,29 p= 0,27
Protocolo # 2	-23,61	115,9	0,95	F= 0,04 p= 0,83
Protocolo # 3	-24,65	119,0	0,98	F= 0,10 p= 0,74
Protocolo # 4	-20,73	107,5	0,89	F= 1,08 p= 0,31

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

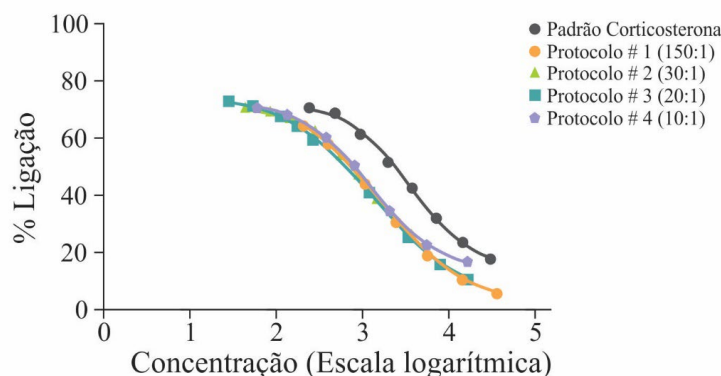


Figura 4-1 – Teste de Paralelismo dos níveis de metabólitos de glicocorticoides detectados em corujinha-do-mato usando imunoenensaio enzimático de corticosterona CJM006 entre o padrão corticosterona e os diferentes protocolos investigados. Curva padrão de corticosterona (círculo cinza) ($Y=-24,25*X+116,6$, $r^2=0.95$); protocolo # 1: pool extrato fecal tratado com metanol 70% relação 150:1 (círculo laranja) ($Y=-25,15*X+125,2$, $r^2=0.97$); protocolo # 2: pool extrato fecal tratado com metanol 80% relação 30:1 (triângulo verde) ($Y=-23,61*X+115,9$, $r^2=0.95$); protocolo # 3: pool extrato fecal tratado com metanol 90% relação 20:1 (quadrado verde) ($Y=-24,65*X+119,0$, $r^2=0.98$); protocolo # 4: pool extrato fecal tratado com metanol 80% relação 10:1 (pentágono roxo) ($Y=-20,73*X+107,5$, $r^2=0.89$).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Uma vez que não houve diferença entre os quatro protocolos de extração e o protocolo #2 necessitava de uma menor quantidade de material fecal para ser avaliado, as dosagens de todas as amostras foram realizadas utilizando este protocolo. Através das diluições sucessivas foi possível identificar a diluição ideal das amostras das corujas (1:16), uma vez que esta diluição proporcionou um percentual de ligação mais próximo de 50% da curva de padrão. A precisão do ensaio foi de $95,2 \pm 2,9\%$ e os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 2,3% e 8,2%, respectivamente.

O EIA identificou a variação na produção de MGC nas corujas do grupo ACTH, registrando um aumento de 3,8 vezes (MGC= 395,99 ng/g) na fêmea #90089 e de 2,2 vezes (MGC= 295,36 ng/g) no macho #91876 em comparação ao valor da média basal de MGC, validando fisiologicamente o EIA. Estes picos foram registrados na primeira amostra coletada após a administração do ACTH e corresponde ao *pool* fecal de duas horas (momento 2, Figura 4-2). Os animais do grupo salina e grupo controle não apresentaram valores superiores a 2,5 vezes o desvio padrão dos níveis de MGC basal. O valor basal do MGC foi determinado com o valor médio das concentrações contidas nas 52 amostras coletadas previamente à administração dos tratamentos nos seis indivíduos. Outras 53 amostras foram coletadas após os tratamentos representando todos os valores de MGC em unidades de ng/g de cada indivíduo na Figura 4-2.

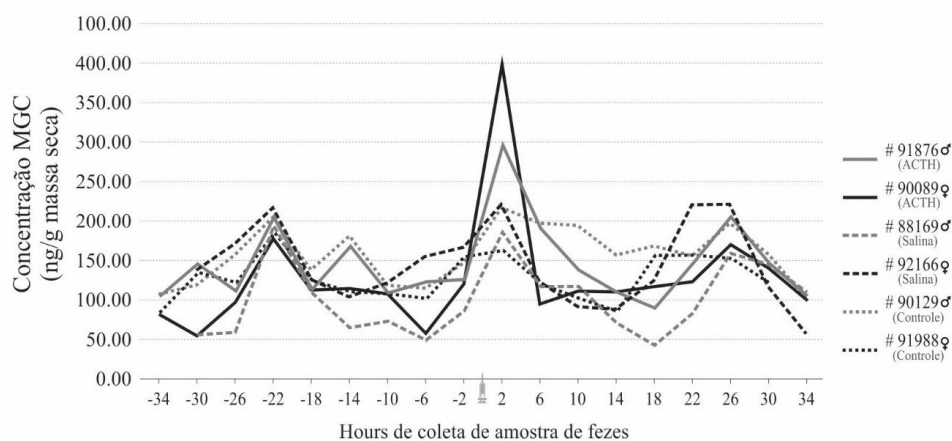


Figura 4-2 – Níveis de metabólitos de glicocorticoides (MGC ng/g) extraídos das amostras fecais liofilizadas de *Megascops choliba* durante três dias de amostragem com intervalo de coleta de 4 horas (momento -34 até 34 horas). As linhas contínuas ilustram as concentrações de MGC na fêmea e macho tratados com análogo de ACTH em doses de 0,5 mg/Kg e 0,25 mg/Kg, respectivamente. Os valores pico foram 395,99 ng/g para a fêmea e 295,36 ng/g para o macho, o que equivale a 3,8 e 2,2 vezes o valor da média basal, respectivamente. As linhas ponteadas correspondem aos níveis de MGC dos animais tratados com solução salina, e a linhas em traços a os animais do grupo controle.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

4.3.2 Orçamento de atividades e metabólitos de glicocorticoides

O comportamento de cada coruja foi monitorado durante 42 horas, obtendo-se um total de 4396 *scans*, o que corresponde a aproximadamente 504 *scans* para cada indivíduo. As frequências comportamentais registradas nos três dias de avaliação estão representadas na Figura 4-3 em unidades percentuais.

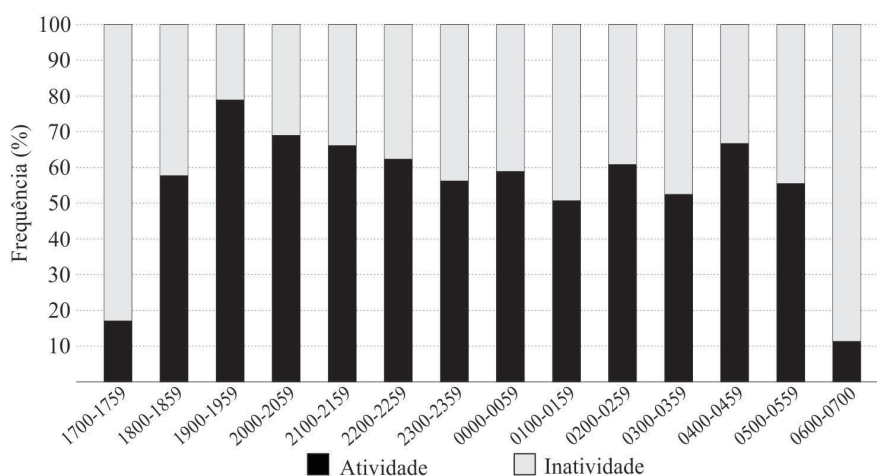


Figura 4-3 – Frequência relativa de registros de atividade e inatividade em nove indivíduos de *M. choliba* de 17h00 a 07h00. As categorias comportamentais de manutenção, locomoção, alerta, alimentação e excreção agrupados na categoria “atividade”; comportamentos de repouso e em pé foram agrupados na categoria “inatividade”.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Um total de 143 amostras de fezes foram coletadas e processadas para a determinação dos níveis de MGC nas 9 corujas avaliadas em paralelo ao orçamento temporal (Figura 4-4). Níveis mais elevados de MGC foram exibidos na coleta das 21h00 (173.0 ± 59.6 ng/g) em comparação com a coleta das 09h00 (80.4 ± 25.8 ng/g). O melhor modelo foi $\text{mgc} \sim \text{hora} * (1|\text{id})$ (AIC = 1632.5; BIC = 1657.2). Este modelo, além de incluir a identidade dos indivíduos como significativo, mostrou maior influência na variação diária nos valores de MGC na coleta das amostras coletadas às 21h00, seguido do horário de 01h00 e 05h00. Houve, contudo, valor significativo no intercepto. Em todos os modelos, não houve variação significativa nos níveis de MGC ligada ao sexo.

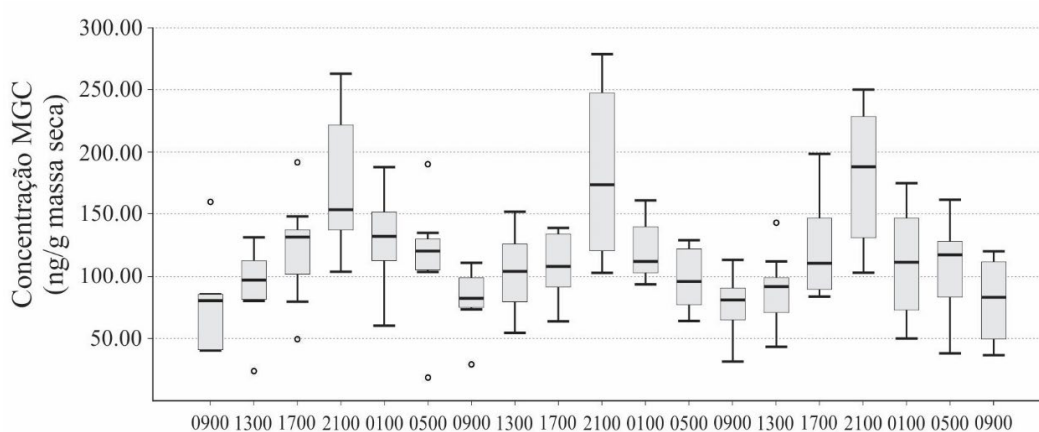


Figura 4-4 – Representação gráfica dos níveis de metabólitos de glicocorticoides (MGC ng/g) extraídas de amostras fecais liofilizadas de *Megascops choliba* durante três dias de amostragem com intervalo de coleta de 4 horas (por três dias contínuos).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Todas as variáveis foram mantidas como proporções, uma vez que a transformação arcseno não melhorou a distribuição residual. Apenas a categoria locomoção foi desconsiderada por não apresentar distribuição residual adequada, apesar da transformação arcseno. O padrão que explicou significativamente a variação do MGC foi a atividade. Quanto maior a atividade, maiores os valores de MGC, com a mesma tendência observada para a manutenção. Já para o GLMM com MGC empregado como variável dependente, a transformação arcsine não melhorou a distribuição residual da categoria de alerta, de modo que este modelo não foi utilizado. Como acima, a transformação arcsine não melhorou a distribuição residual e, portanto, as variáveis foram mantidas como proporções. A categoria de manutenção e o padrão de atividade produziram uma relação positiva significativa com os níveis de MGC. Esses

resultados combinados mostram que valores mais altos de comportamentos ativos são explicados pela maior concentração de MGC.

4.4 DISCUSSÃO

Neste capítulo foi validado um ensaio imunoenzimático para quantificar os metabólitos de glicocorticoides em *Megascops choliba*. Também verificamos que os valores de MGC na Corujinha-do-mato foram diferenciados pela identidade do animal e pela hora do dia, principalmente na coleta das 21h00, mas não pelo sexo. Além disso, constatou-se que os comportamentos associados ao gasto de energia, como manutenção, locomoção e alerta, foram majoritariamente expressos entre as 19h00 e 20h00, confirmando-se a correlação entre a produção de MGC com estes comportamentos.

O imunoensaio CJM006 avaliado neste capítulo demonstrou-se confiável na quantificação de metabólitos esteroides imunorreativos de corticosterona, uma vez que os ensaios de validação analítica (teste de paralelismo, teste de recuperação e coeficiente de variação) estiveram dentro dos limites considerados aceitáveis na literatura (BARBOSA-MOYANO; SILVA; PINILLA, RAMÍREZ PATRICIA, 2020; MÖSTL; RETTENBACHER; PALME, 2005; WASSER *et al.*, 2000). Este mesmo imunoensaio também já teve sua eficácia comprovada na literatura para o monitoramento não invasivo da atividade adrenal para uma ampla variedade de espécies, incluindo aves, répteis, anfíbios e mamíferos (WATSON *et al.*, 2013).

O EIA também foi validado fisiologicamente, uma vez que foi possível diferenciar a produção de MGC de acordo com os tratamentos implementados nas corujas (ACTH, solução salina e controle), possibilitando assim o seu uso para avaliar a atividade adrenal de *Megascops choliba*. Nas aves estimuladas às 19h00 com ACTH sintético, é possível detectar um aumento nos níveis de MGC na amostra do *pool* compreendido entre as 17h00 e 21h00, indicando que o pico acarretado pela estimulação adrenal é de, no máximo, duas horas. O intervalo de tempo entre a administração de ACTH sintético e a taxa de incremento dos MGC varia entre espécies de aves (GOYMANN, 2005; PALME, 2019). Em galinhas (*Gallus domesticus*), por exemplo, o aumento de até cinco vezes dos níveis de MGC foi verificado somente 4 h após o desafio com ACTH (DEHNHARD *et al.*, 2003). Já na coruja-pintada do Norte (*Strix occidentalis caurina*), Wasser e colaboradores (2000) descreveram o aumento significativo dos níveis MGC com apenas 2 h após a estimulação farmacológica, similar ao aqui descrito para *M. choliba*. Estudos com uso de corticosterona radiomarcada com

³H ajudaram o entendimento do mecanismo de metabolização deste hormônio, assim como o tempo da sua excreção (GOYMANN, 2005). O pico de MGC radiomarcado foi registrado, para *Strix varia* com um intervalo de 2 h, e para a *Bubo virginianus* com um intervalo de 3 h após infusão, ocorrendo uma reciclagem êntero-hepática dos metabólitos 10 horas após da infusão para esta última espécie (WASSER; HUNT, 2005). Embora nossos dados indiquem um intervalo metabólico de 2 h, são necessários testes plasmáticos (ex. radiomarcção) e ensaios metabólicos para comprovar os resultados aqui apresentados.

As corujas apresentam uma variabilidade individual na produção de MGC, similar ao descrito em outras espécies de aves (FERREIRA *et al.*, 2015; MUNTEANU *et al.*, 2017; SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020). Apesar desta variabilidade individual, não foi confirmada a diferença significativa dos níveis de MGC entre os sexos, que pode estar relacionada ao fato de que os animais avaliados se encontravam fora da fase reprodutiva. Em outras espécies de corujas, a produção nos níveis de MGC varia de acordo ao sexo e estágio reprodutivo. Os maiores valores são encontrados em machos no início da temporada reprodutiva, enquanto nas fêmeas, os maiores valores são encontrados durante a temporada de criação dos filhotes (WASSER; BEVIS; HANSON, 1997; WASSER; HUNT, 2005). Infelizmente, o conhecimento sobre a relação entre MGC e cuidado parental de corujas ainda é escasso na literatura (LYNN, 2016). Lima e Lima Neto (2009) e Guilherme e Souza (2017) não observaram machos de *M. choliba* participando da incubação dos ovos. No entanto, na coruja *Pulsatrix perspicillata*, o cuidado biparental é definido como fêmeas criando os filhotes e macho fornecendo comida (CHAPARRO-HERRERA *et al.*, 2015). Este padrão também é compartilhado com outras espécies de aves como observado em *Gymnorhinus cyanocephalus* (BATEMAN; BALDA, 1973). Portanto, seria interessante avaliar o papel dos glicocorticoides em relação ao cuidado parental em *M. choliba*.

Quanto à análise comportamental, foi encontrado na literatura um etograma para várias aves, porém poucas espécies de corujas foram descritas, como as *Athene brama* (NERLEKAR; GOWANDE; JOSHI, 2014), *Bubo bengalensis* (RAMANUJAM, 2010) e *Heteroglaux blewitii* (ISHTIAQ; RAHMANI, 2005). A avaliação do orçamento de atividade em aves noturnas torna-se difícil devido a fatores como a falta de visibilidade dos indivíduos, limitando as avaliações para o período diurno, como por exemplo na coruja-das-neves (*Nyctea scandiaca*, Boxall e Leinn (1989)). Uma melhor compreensão do repertório comportamental dos indivíduos facilita a avaliação do bem-estar dos

animais mantidos em cativeiro (GREGGOR *et al.*, 2018; KOENE, 2013). Na natureza, *M. choliba* passa a maior parte do dia empoleirado em habitats com vegetação densa e fechada, como uma possível estratégia para minimizar o risco de predação (BARROS; MOTTA-JUNIOR, 2014). Este comportamento estático de empoleirar-se também foi descrito nas corujas aqui avaliadas durante o período diurno (07h00 às 18h00). A maior proporção de comportamentos ativos foi descrita durante o período noturno, especificamente entre 19h00 e 20h00. A identificação deste período de atividade das corujas permitiu estabelecer um cronograma de amostragem em corujas desta espécie na natureza; após este período, os animais dificilmente respondiam aos diferentes estímulos sonoros (dados não apresentados).

Os resultados obtidos de MGC para *M. choliba* apresentam um ritmo diário, com maiores níveis destes esteroides no início da noite e os mais baixos no meio do período da manhã. O padrão diário de excreção de MGC em outras aves já está reportado (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019; SCHEIBER *et al.*, 2017). No entanto, desconhecemos avaliações seriadas que determinem os níveis basais destes esteroides em espécies de comportamento noturno.

Considerando as concentrações de MGC e o orçamento de atividade, detectamos que maiores taxas de atividade se correlacionaram positivamente com altos níveis de MGC. Assim, podemos supor que as concentrações plasmáticas de corticosteroides aumentam horas antes dos períodos de maior atividade. A sincronização dos processos bioquímicos e fisiológicos resulta da interação entre o ritmo circadiano endógeno e os fatores ambientais cíclicos (CASSONE, 2014), dando ao organismo a capacidade de antecipar as variações ambientais (SCHWABL; BONACCORSO; GOYMANN, 2016). As concentrações basais de glicocorticóides na maioria das aves podem variar ao longo do dia, com elevações nos níveis plasmáticos coincidindo com o início de comportamentos ativos, como locomoção e alimentação (BOISSIN; ASSENMACHER, 1970; LANDYS; RAMENOFKY; WINGFIELD, 2006; SCHWABL; BONACCORSO; GOYMANN, 2016). Em animais diurnos, o pico ocorre pouco antes do nascer do sol, enquanto em animais noturnos é pouco antes do pôr do sol (TOUMA E PALME, 2005). Curiosamente, outros estudos, também realizados em aves, incluindo uma espécie de coruja (*Megascops kennicottii*), mostraram níveis mais elevados de GC durante os períodos de inatividade (DUFTY JR E BELTHOFF, 1997; BELTHOFF E DUFTY, 1998; BREUNER ET AL., 1999; ROMERO E REMAGE-HEALEY, 2000).

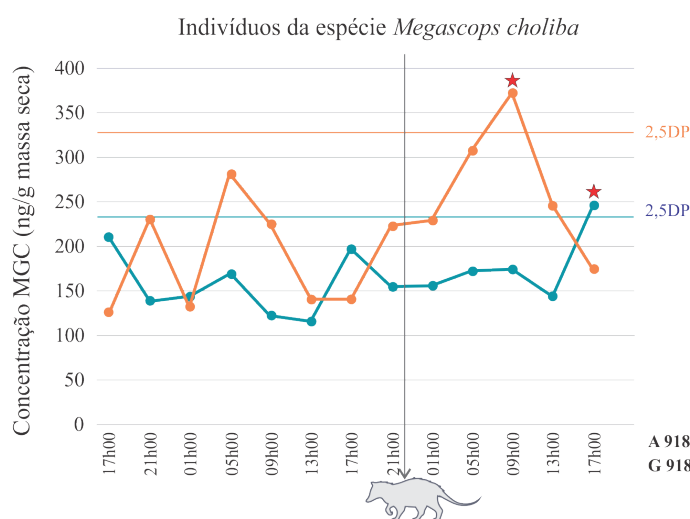
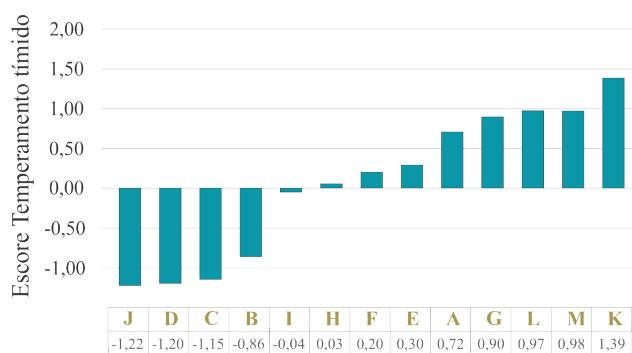
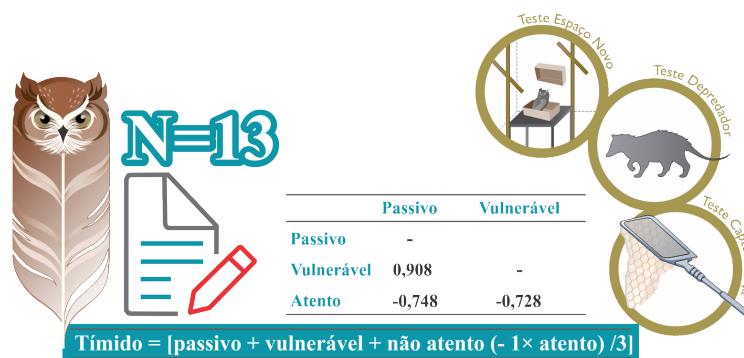
Nosso estudo também detectou taxas mais altas de comportamentos de manutenção correlacionados com níveis aumentados de MGC. Os comportamentos de manutenção são geralmente considerados como comportamentos de conforto em muitas espécies (HENSON et al., 2012), incluindo corujas (por exemplo, BOXALL E LEINN, 1989). Taxas de manutenção mais altas geralmente estão presentes quando as aves sofrem distúrbios (DELIUS, 1988), levando à colheita de penas em alguns casos (De ALMEIDA et al., 2018). Além disso, o comportamento de manutenção se correlaciona com o aumento dos níveis de MGC em algumas espécies de aves, como o ganso (*Anser anser*), onde os gansos submetidos ao estresse de manuseio apresentaram períodos de preening aumentados e mais longos (KRALJ-FISER et al., 2010). Por outro lado, em outras espécies, como estorninhos europeus em cativeiro (*Sturnus vulgaris*), a limpeza diminuiu após estressores agudos (NEPHEW E ROMERO, 2003). No entanto, a avaliação da resposta comportamental e endócrina de corujas a um estímulo estressante estava além do escopo desta pesquisa. Por isso, incentivamos o estudo de novas hipóteses com a implementação dos métodos não invasivos aqui apresentados, que consideramos extremamente úteis na avaliação do bem-estar de corujas mantidas sob cuidados humanos. Finalmente, dado que a relação entre padrões de atividade e fotoperíodo na produção basal de glicocorticóides em aves é discutível (ROMERO E REMAGE-HEALEY, 2000; PRAVOSUDOV ET AL., 2002), nosso estudo contribui para o corpo da literatura ao enfatizar a lacuna de conhecimento em fisiologia das aves noturnas.

4.5 CONCLUSÃO

A avaliação hormonal não invasiva relatada neste capítulo confirma sua aplicabilidade para a avaliação endocrinológica comportamental de corujas tropicais mantidas em cativeiro. Neste estudo, o imunoenensaio enzimático foi validado para quantificação de metabólitos de glicocorticóides. Os valores de MGC apresentaram diferenças interindividuais significativas e ao longo do nictémero, embora não-significativa entre os sexos. Adicionalmente, foi possível relacionar estatisticamente as frequências comportamentais dos indivíduos com os valores médios de MGC.

5 CAPÍTULO 2 “TRAÇOS DE TEMPERAMENTO E METABÓLITOS DE GLICOCORTICOIDES EM CORUJAS (*Megascops choliba*)”

GRAPHICAL ABSTRACT



Rho Spearman: Tímido e MGC (n= 13) [$\rho = 0,74$; $p = 0,004$]

HIGHLIGHTS

Traços de temperamento das corujas são identificáveis por métodos de análise subjetiva.

A produção de MGC está relacionada com o escore de temperamento após um estímulo estressor.

Traços de temperamento e metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*)

RESUMO

Os animais respondem constantemente a estímulos que estão presentes no seu ambiente, apresentando diferenças comportamentais e endócrinas individuais quando o estímulo é percebido como desafiante e/ou ameaçador. O temperamento de 13 corujas adultas (*Megascops choliba*) mantidas em cativeiro foi definido através a realização de três testes de desafio (espaço novo, predador taxidermizado e captura com puçá) a fim de identificar diferenças interindividuais de temperamento e sua possível relação com a produção de metabólitos de glicocorticoides (MGC). Em paralelo, a concentração de MGC de cada indivíduo foi mensurada por métodos de imunoenensaio enzimático (EIA) utilizando amostras de fezes coletadas antes e após o teste de predador. A intensidade dos 13 adjetivos selecionados para descrever o temperamento das corujas foi determinada por três juízes durante os testes comportamentais, selecionando-se apenas 3 adjetivos (passivo, vulnerável e atento) cujos coeficientes de correlação entre testes e intraindividual eram maiores a 0,70. Posteriormente, a pontuação destes adjetivos foi reagrupada em uma única dimensão denominada como “*tímido*”, o qual possibilitou obter um escore para cada indivíduo. O índice de temperamento das corujas apresentou correlação com a concentração de MGC ($\rho = 0,74$; $p < 0,001$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de MGC antes e depois do teste de predador, registrando-se unicamente dois indivíduos com valores pico de MGC após do teste. Espera-se que a informação aqui gerada ajude no estabelecimento de protocolos para a manutenção de aves rapinantes noturnas em cativeiro.

Palavras-chave: Alostase. Estresse. Strigiformes. Teste de predador.

**Temperamental traits and glucocorticoid metabolites in tropical screech owl
(*Megascops choliba*)**

ABSTRACT

Animals constantly respond to stimuli from their surroundings, showing individual behavioral and endocrine differences upon perceived challenging and/or threatening stimuli. The temperament of 13 adult captive burrowing owls (*Megascops choliba*) was defined by performing three challenge tests (novel space, taxidermied predator and trapping) in order to identify inter-individual differences in temperament and their possible relationship with the production of glucocorticoid metabolites (GCM). Feces samples of each bird were taken pre-and-post predator challenge to quantify GCM concentration by means of enzymatic immunoassay (EIA). The intensity of 13 adjectives selected to describe the owls' temperament was determined by three judges during behavioral testing. Only 3 adjectives (passive, vulnerable, and attentive) that showed strong inter-test and intra-individual correlation coefficients were considered. These adjectives were later grouped in a single dimension named "shyness", enabling establishment of individual scores. The temperament of the owls showed strong correlation to concentration of GCM ($r = 0.79$; $p < 0.001$). However, no significant differences were found in GCM levels before and after predator challenge. We expect the information generated by this study will help establish protocols for conservation programs for nocturnal prey birds in captivity.

Keywords: Allostasis. Stress. Strigiformes. Predator Test.

5.1 INTRODUÇÃO

Os animais estão em constante exposição a diferentes estímulos presentes no ambiente geofísico e social. Estes estímulos possuem potencial para ativar processos alostáticos (MCEWEN; WINGFIELD, 2003), gerando respostas endócrino-comportamentais relacionadas a fatores como o sexo, idade, genética, experiência e etapa de história de vida (BOISSY, 1995; COCKREM; SILVERIN, 2002; KOOLHAAS et al., 1999; SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015). Quando estes estímulos são percebidos como desafiantes, é possível identificar diferenças nos traços comportamentais nos níveis intra- e interespecífico (RÉALE et al., 2007; SIH; BELL; JOHNSON, 2004). Estas variações comportamentais têm sido denominadas como personalidade ou temperamento (COCKREM, 2007; GOSLING, 2001; RÉALE et al., 2007), apresentando algumas vezes uma correlação com os níveis plasmáticos de glicocorticoides (GC) e seus metabólitos (MGC) (COCKREM, 2007; GROOTHUIS; CARERE, 2005; RAULO; DANTZER, 2018; STOCKER et al., 2016).

O temperamento de um indivíduo costuma se manter ao longo do tempo e em diferentes contextos, abrangendo características como agressividade ou sociabilidade, timidez ou ousadia e, inclusive, exploração ou evitação do desconhecido (RÉALE *et al.*, 2007). A partir de uma perspectiva evolutiva, a avaliação do temperamento tem permitido o estabelecimento e/ou confirmação de hipóteses relacionadas à aptidão dos animais (DINGEMANSE *et al.*, 2004; RÉALE *et al.*, 2007; SIH; BELL; JOHNSON, 2004) (COCKREM, 2007). Estas diferenças entre indivíduos também têm demonstrado afetar vários traços de importância ecológica como a dominância e a dispersão natal (DINGEMANSE *et al.*, 2003; DINGEMANSE; GOEDE, 2004). Em programas de reintrodução de espécies silvestres, por exemplo, avaliações do índice de ousadia dos indivíduos tem permitido prever a sobrevivência do animal após a soltura no seu ambiente natural (BREMNER-HARRISON; PRODOHL; ELWOOD, 2004).

Animais silvestres mantidos sob cuidados humanos, bem seja com finalidade de recuperação/reabilitação ou exposição (ex. zoológicos ou aquários), os animais silvestres são expostos a interações sociais com coespecíficos e outras espécies (MASON, 2010). Estas interações prolongadas possuem a capacidade de sobrecarregar os sistemas alostáticos do indivíduo (BUSCH; HAYWARD, 2009; LANDYS; RAMENOFISKY; WINGFIELD, 2006; MORGAN; TROMBORG, 2007). Se a sobrecarga alostática persiste, as ações prolongadas dos mediadores, como os

glicocorticoides, podem resultar em desgaste, fisiopatologia e dano, em vez de proteção (MCEWEN; WINGFIELD, 2010).

Investigações endócrino-comportamentais são úteis ao desvendar as necessidades biológicas de cada espécie, permitindo formar grupos animais nas instalações que não represente estresse (McDOUGALL *et al.*, 2006b). Por exemplo: estudos realizados em *Corvus corax*, determinaram que indivíduos socialmente integrados apresentaram níveis aumentados de MGC quando isolados de seus congêneres. Porém, aves classificadas como menos integradas apresentaram altas concentrações de MGC quando eram agrupadas (STOCKER *et al.*, 2016). Assim, a implementação de métodos de avaliação qualitativa do comportamento complementados com estudos endócrinos permitem examinar o bem-estar de animais silvestres mantidos em condições de cativeiro (WEMELSFELDER, 2007). No entanto, é preciso mencionar que um indivíduo estressado não necessariamente irá apresentar níveis de glicocorticoides elevados e vice-versa (BUSCH; HAYWARD, 2009). Neste contexto, o presente capítulo tem como objetivo analisar possíveis tipos de temperamento na Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) e avaliar a sua relação com a produção de metabólitos de glicocorticoides. Espera-se que os resultados apresentados neste capítulo aportem para o entendimento da resposta alostática destes rapinantes noturnos e que os métodos aqui expostos sejam úteis na avaliação do bem-estar das corujas mantidas em cativeiro.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Permissão ética

Os procedimentos propostos neste capítulo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da FMVZ-USP processo Nº 6896290419 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO autorização/licença processo Nº 70120-1. Adicionalmente, as atividades que foram desenvolvidas no Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres - CeMaCAS, foram aprovadas e/ou autorizadas conforme o processo Nº 60272019/0000675-1. Este projeto também foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado -SisGen NºA15F992.

5.2.2 Animais e alojamento

Foram avaliados 7 machos e 6 fêmeas da espécie *M. choliba* em idade adulta e em período não-reprodutivo. O sexo dos indivíduos foi diagnosticado por ensaios de PCR a partir de amostras de sangue enviadas a Unigen (São Paulo, Brasil). Todos os animais encontravam-se na fase final de reabilitação do CeMaCAS, São Paulo, Brasil (23° 24' 47"S 46° 47' 29"W). O estado hígido de cada animal foi confirmado por meio de testes laboratoriais sorológicos e coprológico. Cada coruja foi mantida em gaiola de arame galvanizado (70 x 70 x 70 cm) contendo dois poleiros. As gaiolas foram alocadas em recinto semiaberto de 25 m², mantendo as condições naturais do ambiente (ventilação e luz natural com temperatura oscilante entre 18 e 26 °C). As corujas foram alimentadas diariamente com presa morta (camundongos e pintinhos de codorna), com água disponível *ad libitum*.

5.2.3 Avaliação do temperamento

A identificação do temperamento das corujas foi realizada pelo método de análise subjetiva (*subjective rating scale*) de acordo com a metodologia de Feaver *et al.* (1986). Para este fim, foram listados 45 possíveis adjetivos descritores do temperamento escolhidos com base em pesquisas previamente publicadas (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019; PAULINO; NOGUEIRA-FILHO; SIQUEIRA, 2018; WEMELSFELDER *et al.*, 2000). Os adjetivos foram avaliados por quatro biólogos e quatro veterinários com experiência em processos de reabilitação de corujas, indicando a seguinte classificação: 1) discordo totalmente; 2) discordo parcialmente; 3) não sei ou não se aplica; 4) concordo parcialmente; 5) concordo totalmente. Após análise, apenas 13 adjetivos (agitado, alerta, desconfiado, medroso, nervoso, observador, passivo, vulnerável, atento, estressado, tenso, irritado e curioso) foram selecionados por atingiram os critérios de validação do índice de conteúdo (PEDROSA; SUÁREZ ÁLVAREZ; GARCÍA CUETO, 2013).

Treze corujas foram submetidas a dois testes de comportamento, cada uma compostos de uma sequência de duas situações durante as quais seu comportamento foi analisado: 1) ambiente novo seguido de captura com puçá 2) exposição a um gambá taxidermizado (*Didelphis marsupialis*) seguido de captura com puçá. Os testes foram realizados de forma individual, transportando cada animal no interior de uma barraca retangular (altura 1,50 m; comprimento 1,50 m; largura 1,25 m). Os animais foram

transferidos de ambiente com auxílio de uma caixa de papelão (12 x 12 x 22 cm) com tampa, a qual foi fixada sobre uma mesa (30 x 30 x 30 cm) localizada no centro da barraca. Os indivíduos saíram da caixa de forma voluntária após a retirada da tampa com auxílio de um barbante, evitando assim o contato visual das corujas com o pesquisador (Figura 5-1). Nas laterais da mesa foram disponibilizados quatro poleiros de madeira (25 x 1,5 cm) conforme ilustrado na Figura 5-1. O teste de espaço novo foi realizado em 23/Nov/2020 e o teste de predador em 19/Dez/2020. A resposta com puçá foi avaliada logo após os testes de predador e espaço novo. Em cada teste, o comportamento de cada coruja foi gravado durante 6 min contínuos. Os primeiros 5 min foram utilizados para registrar os comportamentos frente ao espaço novo ou predador, sendo o tempo final utilizado para registrar o comportamento de captura com puçá. O animal taxidermizado encontrava-se oculto dentro da barraca, sendo exposto ao retirar o tecido cobridor mediante um segundo barbante, evitando-se novamente a percepção da presença do pesquisador. O ensaio foi realizado em um recinto semi-aberto e ausente de luz artificial durante o período das 19h30 e 22h00, horário em que as corujas possuem maior atividade (Barbosa-Moyano 2022, capítulo 1).

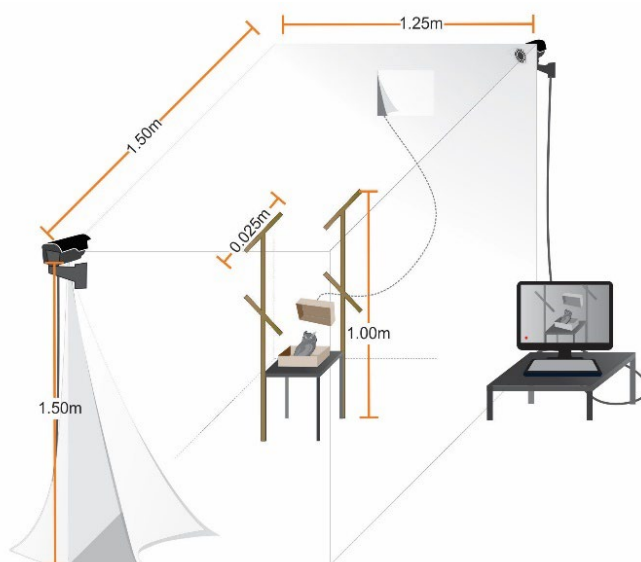


Figura 5-1 – Ilustração da barraca onde foram realizados os testes de temperamento da corujinha-domato (*Megascops choliba*). A barraca foi confeccionada em canos de policloreto de vinila (PVC) de 25 mm com altura 1,50 m; comprimento 1,50 m; largura 1,25 m e coberta com tecido de algodão grosso na cor branca. A saída da caixa de papelão foi permitida de forma voluntária, evitando assim o contato visual do animal com o pesquisador.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Os comportamentos foram gravados de forma contínua por um sistema de monitoramento interno CFTV, composto por 2 câmeras de resolução de imagem HD 720p (modelo VHL 1120 B Intelbras, Brasil) e luz infravermelha, acopladas a um

gravador de vídeo digital DVR Multi HD (model MHDX 1104 Intelbras, Brasil). A análise dos vídeos foi feita por três pesquisadores com experiência na técnica de análise subjetiva de temperamento. Os juízes avaliaram os vídeos e julgaram a intensidade com que cada indivíduo expressava os 13 adjetivos. A intensidade do comportamento dos indivíduos para cada adjetivo foi mensurada com auxílio de uma escala visual analógica representada por uma linha horizontal de 125 mm, sendo que a escala com menor valor corresponde à ausência da expressão comportamental, enquanto a escala máxima corresponde a manifestação mais intensa (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019).

5.2.4 Metabólitos de glicocorticoides

O período de amostragem das fezes foi realizado 28 horas antes do início dos testes de temperamento e até 24 h após, mantendo-se um intervalo de amostragem de quatro horas (09h00, 13h00, 17h00, 21h00, 01h00 e 05h00). O tratamento das amostras fecais para a quantificação dos MGC encontra-se detalhado no Capítulo 1 do presente documento.

5.2.5 Análises de dados

Para avaliar o temperamento da Corujinha-do-mato, foi verificado inicialmente o índice de concordância (ICC) entre juízes na avaliação dos 13 adjetivos descritores de temperamento (ICC inter-observadores), seguido da comparação dos escores dos adjetivos atribuídos aos indivíduos quando avaliados nos três testes (ICC inter-objetos), sendo considerados unicamente os adjetivos cujo ICC fosse $\geq 0,70$. Na sequência, as médias dos escores destes adjetivos foram transformados em valores de Z-escore, calculado pela diferença entre as médias de cada descritor divididas pelo seu desvio padrão. Dessa forma se reduz a influência dos efeitos de distribuição dos escores dos adjetivos (Feaver *et al.* 1986), apresentando-se uma média zero e desvio padrão 1,0. Estes valores foram correlacionados e combinados em uma dimensão de temperamento seguindo o critério de correlação de Spearman ($rS \geq 0,70$ ou $rS \leq -0,70$).

As concentrações de metabólitos de glicocorticoides contidos nas fezes foram expressas em unidades de ng/g e apresentadas como valores médio e desvio padrão (\pm DP). O nível basal da produção de MGC para cada animal foi calculado a partir dos valores médios reportados para as amostras coletadas antes do teste temperamento. O valor pico de MGC para cada indivíduo corresponde às dosagens que superam 2,5 vezes

o valor DP da média basal. Um ANOVA de medidas repetidas foi utilizado para avaliar o efeito do teste do gambá taxidermizado nos níveis de MGC (ng/g) em função do sexo e momento de coleta das fezes (pré- ou pós-teste). Finalmente, um teste de correlação Rho de Spearman foi realizado entre os escores de temperamento e os valores médios de MGC das amostras após do teste de temperamento. Todos os dados foram analisados utilizando o SPSS Inc. Statistica para Windows (versão 17.0 - Chicago, EUA). Para todas as análises foi considerado o nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

5.3 RESULTADOS

Dos 13 adjetivos descritores de temperamento, somente os adjetivos “passivo”, “vulnerável” e “atento” apresentaram valores ICC superiores a 0,70: 0,85, 0,88 e 0,81, respectivamente. As correlações entre estes adjetivos apresentaram valores superiores a 0,70 e menores que -0,7 (Quadro 5-1).

Quadro 5-1 – Correlações de Spearman entre os escores dos adjetivos

	Passivo	Vulnerável	Atento
Passivo	-		
Vulnerável	0,908	-	
Atento	-0,748	-0,728	-

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Os Z-escores de cada descritor foram combinados, resultando na dimensão de temperamento denominado como tímido = [passivo + vulnerável + não atento (- 1×atento) /3]. Assim, os indivíduos: A, E, F, G, H, K, L e M foram classificadas como positivamente tímidos, e os demais indivíduos (B, C, D, I e J) como negativamente tímidos (Figura 5-2).

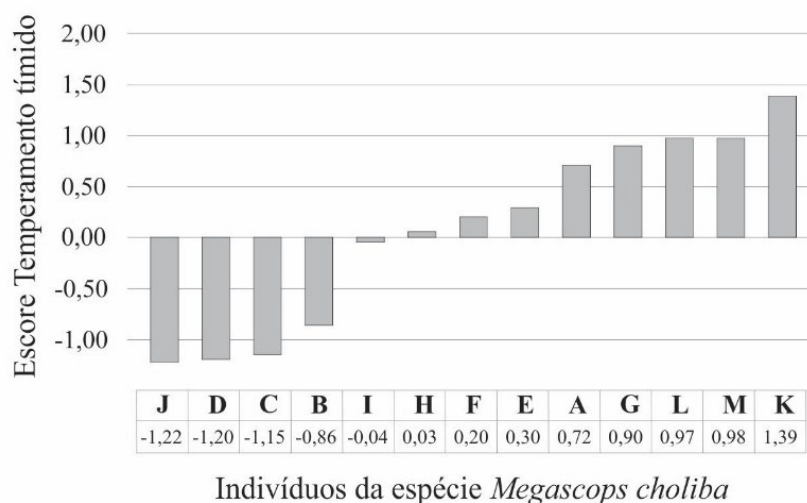


Figura 5-2 – Escores do temperamento tímido da Corujinha-do-mato. O escore tímido foi obtido das pontuações dos adjetivos passivo, vulnerável e não atento. Foram avaliadas 13 corujas adultas, representadas pelas letras A – M.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Das treze corujas avaliadas, unicamente a fêmea A#91888 e o macho G#91876 apresentaram valores picos de MGC após o teste de temperamento. Os picos destes esteroides foram registrados em horários diferentes para as duas corujas e encontram-se sinalizados (estrela vermelha) na Figura 5-3.

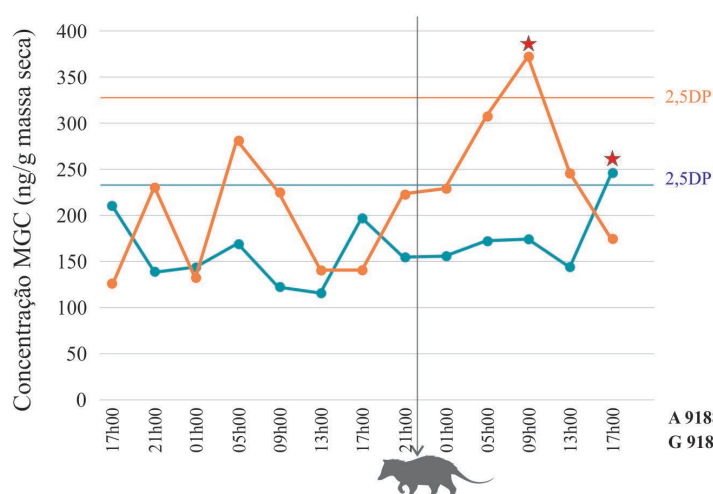


Figura 5-3 – Representação gráfica dos metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*) submetidas ao teste de predador. A linha azul representa os valores de MGC (ng/g massa seca) para fêmea A#91888 e linha laranja para o macho G#91876. Os valores sinalizados com estrela indicam as dosagens pico de MGC, superior ao 2,5 vezes o valor do desvio padrão (linhas azuis e laranja).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Os resultados indicaram uma forte correlação positiva entre os escores na dimensão do temperamento “tímido” com a concentração média de MGC (n=13, $\rho=0,74$; $p=0,004$). A intensidade da correlação foi atribuída de acordo com Akoglu

(2018). Um total de 167 amostras de fezes foram processadas e analisadas pelo EIA, porém a ANOVA não confirmou diferença na produção de MGC de acordo com o sexo [F (1,165) = 0,03 $p=0,87$], ou tratamento [F (1,165) = 2,49 $p=0,14$], registrando-se concentrações de MGC no pré-teste: $509,37 \pm 188,7$ ng/g e de $461,35 \pm 208,36$ ng/g no pós-teste.

5.4 DISCUSSÃO

Diferenças comportamentais das corujas foram observadas no contexto qualitativo ao expor os indivíduos ao teste predador, espaço novo e captura com puçá. Três adjetivos foram combinados na dimensão de temperamento *tímido* o qual categorizou os indivíduos com pontuações negativas e positivas. A correlação indica que o temperamento das corujas está relacionado aos níveis de metabólitos de glicocorticoides, independentemente da resposta alostática a situações desafiantes.

Nas aves, como em outros vertebrados, a ativação dos processos alostáticos após serem expostos a mudanças no seu ambiente local gera respostas comportamentais e endócrinas que variam acentuadamente entre os indivíduos (COCKREM, 2007; MCEWEN; WINGFIELD, 2010). Estas diferenças comportamentais são consistentes ao longo do tempo e representam estratégias que os animais usam para lidar com as demandas de seu ambiente (COCKREM, 2007; RÉALE *et al.*, 2007), equivalentes à definição de síndrome comportamental (SIH; BELL; JOHNSON, 2004), temperamento (RÉALE *et al.*, 2007) e personalidade (CARERE *et al.*, 2003).

A avaliação qualitativa do comportamento tem sido previamente implementada em diferentes espécies animais (FLEMING *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2021; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013), permitindo determinar o temperamento em espécies de aves Galliformes, Passeriformes e Psitaciformes (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019; COCKREM, 2007; PAULINO; NOGUEIRA-FILHO; SIQUEIRA, 2018; RAMOS *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2021). No entanto, não foi reportado na literatura nenhum estudo similar em aves Strigiformes. Diferentes pesquisas conseguiram validar este tipo de método ao descartar a percepção subjetiva não confiável dos avaliadores (WALKER *et al.*, 2016; WEMELSFELDER *et al.*, 2000). Ainda que a aplicação deste método seja difundida na literatura como facilmente realizável por observadores não-treinados (WALKER *et al.*, 2016), acreditamos que a participação de biólogos e veterinários com experiência nos processos de reabilitação dos indivíduos, ou seja, profissionais que conhecem suas características biológicas, é de

fundamental importância para que a seleção e avaliação dos adjetivos sejam mais próximas do comportamento do animal em estudo.

Diferentes métodos estatísticos permitem a redução da dimensionalidade dos dados obtidos após os testes de temperamento (RAMOS; AZEVEDO; SANT'ANNA, 2022; RÉALE *et al.*, 2007; WEMELSFELDER *et al.*, 2000). Para os resultados obtidos na avaliação do temperamento em duas espécies de papagaios (*Amazona vinaceae* e *Psittacara leucophthalmus*), Ramos e colaboradores (2022) avaliaram três técnicas de redução de dados: (i) o proposto por Feaver (FEAVER; MENDEL; BATESON, 1986), (ii) Análise de Fatores e (iii) Análise de Componentes Principais. O Método Feaver, o mesmo que foi implementando nesta pesquisa, mostrou resultados similares se comparados com outros métodos, sendo este o método indicado quando o n amostral é pequeno (FEAVER; MENDEL; BATESON, 1986; RAMOS; AZEVEDO; SANT'ANNA, 2022).

Estudos realizados em mamíferos (*Vulpes velox*) indicaram que os animais classificados como “ousados” apresentaram maior taxa de mortalidade após da sua reintrodução em comparação com indivíduos classificados como “tímidos” (BREMNER-HARRISON; PRODOHL; ELWOOD, 2004). Para aumentar o índice de sobrevivência nos animais após a sua libertação, os autores sugerem que os candidatos a serem reintroduzidos sejam selecionados com base no parâmetro “tímido”. No entanto, a decisão de selecionar animais de acordo com o seu temperamento deve ser realizada com cautela, uma vez que as diferenças individuais em prol da evitação de predadores podem também afetar outros contextos (COCKREM, 2007; MCDOUGALL *et al.*, 2006), como por exemplo as interações sociais intraespecíficas (COLEMAN; WILSON, 1998). Adicionalmente, a seleção artificial (antropogênica) em programas de reprodução com base em traços de temperamento que facilitem o manejo em cativeiro de espécies silvestres (ex. indivíduos menos agressivos) deve ser considerada apenas em iniciativas não conservacionistas (McDOUGALL *et al.*, 2006b).

A variação da resposta adrenal entre indivíduos de uma mesma espécie já foi descrita em aves como passeriformes, codornas, galinhas, pinguins e papagaios, entre outras (COCKREM, 2007; COCKREM; POTTER; CANDY, 2006; LITTIN; COCKREM, 2001; POPP *et al.*, 2008; STOCKER *et al.*, 2016). No presente Capítulo foi possível identificar um padrão individualizado ao expor as corujas ao teste do predador. Os animais com *score* positivamente tímido estão correlacionados com os altos níveis de MGC, sendo que duas corujas deste grupo apresentaram valores pico

destes esteroides. Este resultado é similar ao reportado por Cockrem (2007), onde mencionou-se que aves com personalidades reativas e resposta comportamental passiva submetidas a estresse apresentam níveis altos de corticosterona ao se comparar com as aves com personalidades proativas. A resposta alostática dos indivíduos a situações desafiantes, em especial a produção de glicocorticoides e/ou seus metabólitos têm sido associada a variação a caracteres próprios do temperamento (COCKREM, 2007), todavia, tal relação nem sempre é possível de ser comprovada (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019; MUNTEANU *et al.*, 2017; NOGUEIRA *et al.*, 2021).

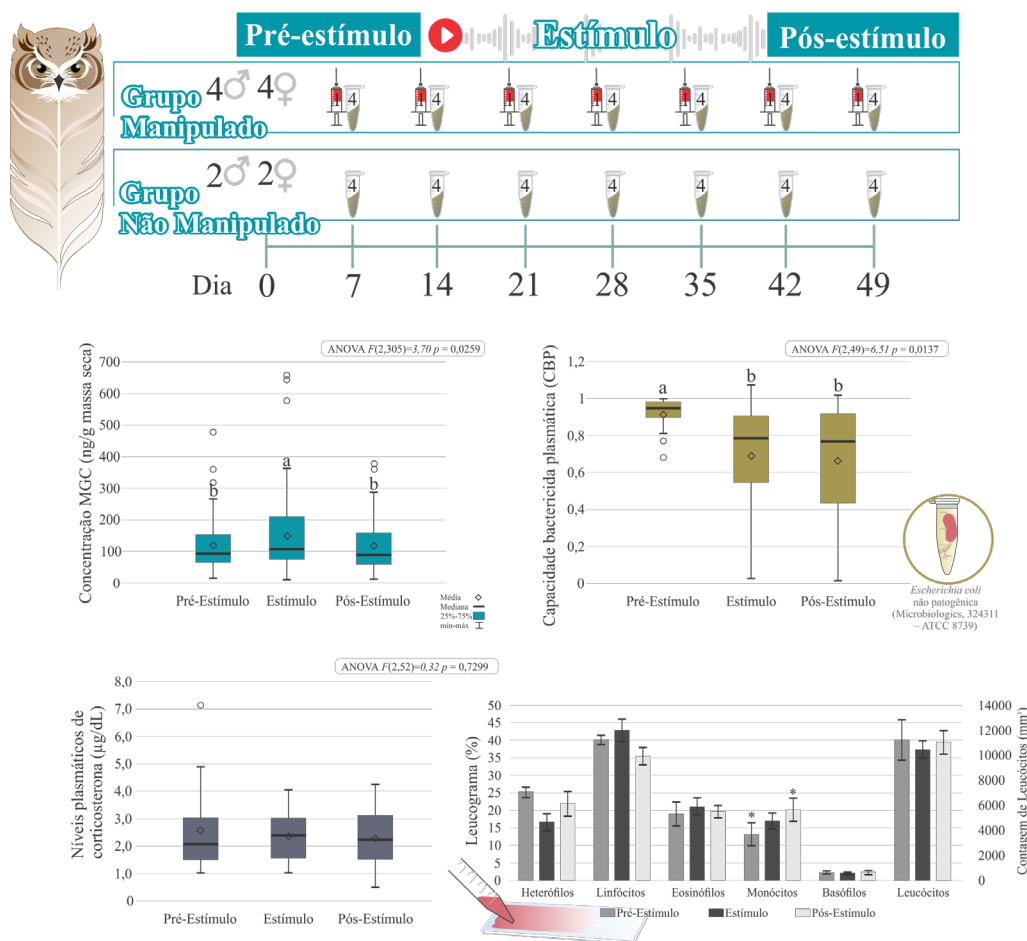
A espécie *M. choliba* apresenta um tamanho médio de área de vida de 51,2 hectares por indivíduo (BARROS; MOTTA-JUNIOR, 2014) e seria lógico que em condições de cativeiro os animais permaneçam isolados. No entanto, está premissa é de difícil execução nos centros de triagem sendo, portanto, necessário o agrupamento dos indivíduos. A realização de testes comportamentais como os expostos aqui mostram-se úteis para o estabelecimento destes grupos (McDOUGALL *et al.*, 2006b), onde animais classificados como tímidos sejam dispostos em gaiolas isoladas. Em comunicação pessoal com os técnicos do centro de triagem onde os ensaios do presente estudo foram realizados, foi mencionado que se observou por mais de uma vez corujas num modo isolado privando-se, inclusive, de atividades fundamentais como a alimentação. Sugere-se a implementação de mais estudos onde corujas possam ser avaliadas em um contexto social, para confirmar, por exemplo, o comportamento territorialista ou dominante da espécie.

5.5 CONCLUSÕES

Verificou-se que há diferentes traços comportamentais entre as corujas, caracterizando os animais na dimensão de temperamento tímido. Notou-se também que as corujas apresentaram diferenças endócrinas individuais relacionadas à produção de hormônios adrenocorticais. Os traços de temperamento tímido estão correlacionados positivamente com as concentrações de MGC, postulando os métodos endócrino comportamentais aqui implementados com um avaliador de bem-estar a ser executado nos programas de manejo de corujas em cativeiro.

6 CAPÍTULO 3 “REABILITAÇÃO DE *Megascops choliba*: UMA VISÃO ENDÓCRINA E IMUNOLÓGICA”

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

Foi validado o EIA para a quantificação de corticosterona plasmática em *M. choliba*.

As corujas apresentam uma resposta endócrina e imunológica individual a estímulos auditivos.

A concentração de MGC aumenta ao expor as corujas a ruídos de um hospital de um centro de triagem.

Ao expor as corujas aos ruídos de um hospital sua capacidade bactericida plasmática se vê alterada, diminuindo em várias das corujas avaliadas.

A razão entre heterófilos e linfócitos não se vê alterada ao expor as corujas a um tratamento acústico.

Reabilitação de *Megascops choliba*: uma visão endócrina e imunológica

RESUMO

Para atenuar as consequências advindas do tráfico de animais silvestres, entidades governamentais de cada país disponibilizam centros de triagem para a recepção e atendimento de indivíduos apreendidos. Geralmente, os processos de recuperação e/ou reabilitação são realizados em cativeiro, expondo os animais a situações desafiantes que podem comprometer a saúde do paciente. O objetivo deste capítulo foi avaliar os parâmetros endócrinos e imunes de 12 corujas adultas (*Megascops choliba*) durante 49 dias consecutivos em condições de cativeiro. No intervalo compreendido entre o décimo quinto e trigésimo quinto dia, as aves foram expostas à reprodução de áudios previamente gravados em um ambiente hospitalar de um centro de triagem. A cada sete dias, foram coletadas amostras de fezes de todos os indivíduos, assim como amostras de sangue em oito destes animais. O nível plasmático de corticosterona e seus metabólitos (MGC) foram quantificados por métodos de imunoenensaio enzimático. Também foram avaliados o perfil leucocitário e a capacidade bactericida plasmática (CBP) contra *Escherichia coli*. Nas amostras coletadas durante a exposição ao tratamento acústico, duas das oito corujas apresentaram valores pico de corticosterona plasmática. Estatisticamente, a maior concentração de MGC foi obtida nas amostras coletadas durante o tratamento acústico independente do sexo. Os maiores valores de CBP foram obtidos no dia pré-estímulo, comparando-se com os valores obtidos nos dias do estímulo ou pós-estímulo. No entanto, não foi comprovada uma diferença significativa na contagem das células do hemograma (neutrófilos e linfócitos), com exceção das células de monócitos que aumentaram ao longo do período avaliado. Os resultados indicam que a exposição aos ruídos de um ambiente hospitalar gera alterações fisiológicas em nível individual levando, inclusive, à sobrecarga alostática em algumas das corujas.

Palavras-chave: Cativeiro. Corujas. Glicocorticoides. Bactericida. Indução de estresse.

Rehabilitation of *Megascops choliba*: an endocrine and immunologic perspective

ABSTRACT

As part of the measures developed to counter wild species trade, governmental entities in each country receive and rehabilitate rescued animals in special centers. The recovery and rehabilitation processes are usually carried out in captivity, exposing the animals to challenging situations that may compromise their health. This chapter aims to evaluate the endocrine and immunologic parameters of tropical screech owl (*Megascops choliba*) over 49 consecutive days in captivity. Between days 15 and 35, twelve adult owls were exposed to reproduction of audios recorded in the hospital setting of a rescue center. Feces samples were taken every seven days, as were blood samples from eight of these animals. Plasmatic level of corticosterone and its metabolites (GCM) was quantified by enzymatic immunoassay. Leucocyte profile and plasmatic bactericidal competence (PBC) to counter *Escherichia coli* were evaluated. Regarding samples collected during exposure to acoustic treatment, two of the eight owls showed peak corticosterone in plasma values. The highest GCM concentration in the samples was taken during acoustic treatment, independently of gender. The highest PBC values were registered on the day before stimulus, as compared with the values registered on the days with or after stimulus. Nevertheless, no significant difference was established in the cell Hemogram (neutrophils and lymphocytes), except for monocyte cells, which showed a rise along evaluation period. The results indicate that exposure to hospital-setting noise generated physiological changes at the individual level, even indicating allostatic load in some of the owls.

Keywords: Captivity. Owls. Glucocorticoids. Bactericidal. Stress induction.

6.1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização das Nações Unidas, o tráfico de animais silvestres é classificado como a terceira maior organização criminosa e lucrativa no mundo, contribuindo na redução do número de animais na natureza e, conseqüentemente, acelerando os processos de extinção de diversas populações de espécies (ZAIN, 2020). Com a finalidade de reduzir os prejuízos ambientais gerados por esta atividade ilícita, centros de triagem e de reabilitação são fundamentais para a reintrodução dos animais no seu ambiente natural (GIOVANINI, 2002). No entanto, a grande maioria dos processos de recuperação e/ou reabilitação dos animais silvestres são realizados em cativeiro, expondo os indivíduos a uma variedade de estímulos que acionam processos alostáticos de ordem comportamental, endócrina e imune (ELLIS; JACKSON; BOYCE, 2006; MCEWEN; WINGFIELD, 2003). Adicionalmente, estes estímulos têm o potencial de sobrecarregar os sistemas de controle do indivíduo (BROOM, 2011; MCEWEN; WINGFIELD, 2010) e resultar no desenvolvimento de doenças oportunistas diminuindo o grau do bem-estar dos animais (BROOM; MOLENTO, 2004; MORGAN; TROMBORG, 2007).

Com o propósito de minimizar o impacto dos estímulos nos animais silvestres gerados pelas condições do cativeiro, diversas técnicas têm sido implementadas para o diagnóstico do comumente chamado “*estresse*” (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004). Os glicocorticoides mediados por vários tipos de receptores apresentam efeitos pleiotrópicos que influenciam na expressão de milhares de genes, regulando por exemplo o metabolismo, crescimento e o gerenciamento da alocação de recursos (BREUNER; DELEHANTY; BOONSTRA, 2013; PHUC LE *et al.*, 2005). Alguns destes processos são cooptados como parte de uma resposta ao estresse (MACDOUGALL-SHACKLETON *et al.*, 2019).

Sabendo-se que o estresse pode gerar uma resposta multissistêmica nos indivíduos (MACDOUGALL-SHACKLETON *et al.*, 2019), pesquisadores procuram a integração de outros parâmetros fisiológicos, como por exemplo a avaliação da resposta comportamental (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019; STOCKER *et al.*, 2016; WILSTERMAN *et al.*, 2020) juntamente com o estudo da imunidade inata dos animais. No entanto, a modulação do sistema imune pelo estresse é complexa e multideterminada, considerada, em algumas pesquisas, como um agente imunossupressor (ILMONEN *et al.*, 2003; KELLER *et al.*, 1983; KUSHIMA *et al.*,

2003) ou imunostimulador (DHABHAR, 1998; VISWANATHAN; DAUGHERTY; DHABHAR, 2005). Estudos em aves já demonstraram um efeito negativo do estresse sobre o perfil dos glóbulos brancos (GROSS; SIEGEL, 1983; ILMONEN *et al.*, 2003; KUSHIMA *et al.*, 2003), como também na capacidade de eliminação de bactérias (MATSON; TIELEMAN; KLASING, 2006) (TIELEMAN *et al.*, 2005). No entanto, vale a pena destacar que cada espécie apresenta uma alta diversidade nas repostas imunes e que pouco se conhece sobre este tipo de avaliação em aves rapinantes noturnas.

Na grande maioria dos países sul-americanos encontram-se populações naturais de Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) (BIRDLIFE, 2021), sendo esta uma das espécies rapinantes recebidas com maior frequência nos centros de triagem brasileiros (LIMA *et al.*, 2021). O presente trabalho estabelece como hipótese que parâmetros endócrinos e imunológicos da Corujinha-do-mato são responsivos frente a estímulos acústicos que reproduzem um ambiente hospitalar de um centro de triagem.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Permissões éticas

Este trabalho cumpre com os regulamentos brasileiros em matéria de pesquisa com espécies silvestres, sendo cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado -SisGen N°A15F992. A coleta do material biológico foi concedida no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO processo N° 70120-1. Este capítulo foi aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP sob o registro do processo N° 8414141021. As atividades que foram desenvolvidas no Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres (CeMaCAS) foram também aprovadas e devidamente registradas no processo N°6027.2020/0005242-0.

6.2.2 Animais e desenho experimental

Seis machos e seis fêmeas adultas da espécie *M. choliba* foram avaliados durante 49 dias contínuos fora da temporada reprodutiva. Cada indivíduo foi mantido dentro de uma gaiola de arame galvanizado (0,7 m × 0,6 m × 0,7 m). Todas as gaiolas contendo as corujas foram mantidas em um recinto isolado e semiaberto localizado nas instalações do CeMaCAS (23°24'43" S 46°47'29" W). A hígidez dos indivíduos foi confirmada pela

avaliação clínica veterinária, complementada pela avaliação laboratorial coprológico e sorológica. Os animais receberam diariamente água *ad libitum* e alimentação a base de camundongo e codorna oferecidos como presa morta.

Durante o período compreendido entre o décimo quinto e trigésimo quinto dia, os animais foram expostos a áudios contendo diferentes sons comumente encontrados durante a rotina no manejo hospitalar em um centro de triagem. Os áudios continham vozes dos funcionários, barulhos relacionados às transferências de gaiolas e vocalizações de diferentes espécies como papagaios e passeriformes, até mesmo grunhidos de gambá. Cinco diferentes áudios foram reproduzidos em horários aleatórios no período da manhã e tarde, evitando-se um possível efeito previsível ao estímulo. Cada áudio teve uma duração de 5 min e não superaram os 62 dB. Para todos os indivíduos foram coletadas quatro amostras de fezes em intervalos de quatro horas (09h00, 13h00, 17h00 e 21h00) a cada sete dias (Figura 6-1). Adicionalmente, em oito das doze corujas avaliadas, foram obtidas amostras de sangue semanalmente (grupo manipulado, Figura 6-1), sendo que a manipulação de cada indivíduo não superou 1 minuto. Amostras de até 200 μ L de sangue foram coletadas por punção da veia jugular com seringa de 1 mL contendo heparina. Essas amostras foram posteriormente centrifugadas por 5 min (3500 g), retirando e armazenando o plasma em tubos cônicos de 2 mL. Todas as amostras foram transportadas a 4°C e armazenadas a -80°C.

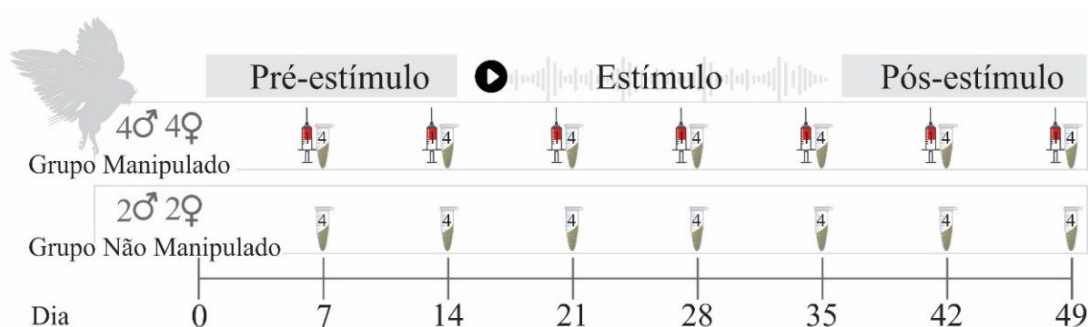


Figura 6-1 – Ilustração desenho experimental. Dois dias de amostragem compreendem os tratamentos pré-estímulo (d7 e d14) e pós-estímulo (d42 e d49). No intervalo compreendido entre os dias 15° e 35° do experimento, os indivíduos foram submetidos ao estímulo auditivo, realizando três dias de amostragem neste período (d21, d28 e d35). Quatro animais compreendem o grupo não manipulado (extração de amostra de sangue) e outros 8 indivíduos compreendem o grupo manipulado. Para cada dia de amostragem, foram coletadas quatro amostras de pool de fezes e uma amostra de sangue por indivíduo. Os grupos mantiveram-se formados pelos mesmos animais durante todo o experimento.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

6.2.3 Corticosterona plasmática

Para a dosagem de corticosterona total presente nas amostras de plasma das corujas, foram realizados testes de especificidade do imunoenensaio DetectX K014 (Arbor Assays™, Eisenhower Place Ann Arbor, MI, USA). Para este fim, 30 µL de plasma de 2 machos (K #95849 e B #94875) e 2 fêmeas (A #83763 e D #97263) foram adicionadas num tubo cônico de polipropileno, obtendo um *pool* de 120 µL de plasma. Posteriormente, foram adicionados 120 µL de dissociador e misturados no vortex. Em seguida, foram realizadas nove diluições sucessivas da amostra num fator de 2 vezes com solução tampão EIA. A curva de calibração foi preparada nas mesmas condições utilizando o padrão de corticosterona do kit EIA. Cada amostra foi analisada em duplicata, conforme as especificações do fabricante. As placas de ELISA foram lidas usando o comprimento de onda de 450 nm em um espectrofotômetro (ELx 808™ Bio Tek Instruments Inc, USA). Testes de precisão e exatidão também foram realizados para a validação do kit EIA. A precisão foi realizada pelo teste de recuperação (%REC) onde uma quantidade conhecida do padrão de corticosterona foi adicionada em alíquotas iguais numa amostra de plasma de coruja previamente quantificada. O teste de precisão, ou seja, a repetibilidade dos valores medidos foi analisada pelos coeficientes de variação (CV) intra e interensaios para uma mesma amostra de plasma de coruja.

Todas as amostras de plasma coletadas durante os tratamentos (momentos pré-, durante e pós-estímulo auditivo) foram tratadas com agente dissociador na proporção 1:1 e posteriormente diluídas em tampão EIA com um fator 34 vezes (fator determinado através do ensaio de paralelismo). A corticosterona total de cada amostra de plasma foi avaliada por duplicata no EIA, reportando-se os resultados em unidades de µg/dL.

6.2.4 Extração e quantificação dos metabólitos de glicocorticoides

As amostras de fezes das corujas foram tratadas como descrito no Capítulo 1 do presente documento. Neste capítulo também estão descritos os processos de extração dos esteroides assim como a dosagem dos metabólitos de glicocorticoides por métodos de imunoenensaio enzimático CJM006.

6.2.5 Perfil de leucócitos

Imediatamente após a coleta de sangue, uma gota do sangue foi espalhada em lâminas de vidro para microscópio, confeccionando-se um esfregaço sanguíneo. Após a

secagem natural, a amostra foi corada pelo método de Rosenfeld. A concentração de leucócitos por mm^3 de sangue foi efetuada utilizando a metodologia proposta por Ilmonen *et al.* (2003), na qual estima-se o número total de células brancas (*white blood cell counts* WBC) contando-se o número de leucócitos em ~ 10.000 eritrócitos. A fim de se obter a razão entre heterófilos e linfócitos, a contagem diferencial das células leucocitárias foi calculada multiplicando-se a proporção das mesmas pelo WBC.

6.2.6 Capacidade bactericida plasmática

Pellets de *Escherichia coli* não patogênica (Microbiologics, 324311 – ATCC 8739) foram diluídos em 1 mL de solução estéril de tampão fosfato de sódio salina (PBS). Em um Erlenmeyer, 100 μL da solução (*E. coli* + PBS) foram misturados com 5 mL de solução de tripticaseína de soja esterilizado (TSB) e a mistura ficou incubando *overnight* à temperatura constante de 37°C (DE ASSIS *et al.*, 2013). No dia seguinte, 300 μL deste cultivo foram colocados em uma microplaca Elisa de 96 poços para posterior determinação da concentração das bactérias na solução através da leitura da densidade óptica utilizando um espectrofotômetro ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Para obtenção da concentração de trabalho (1×10^6 micro-organismos/mL) foram realizadas diluições com solução ringer estéril [1 L contém 6,5 g de NaCl; 2,0 g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 100 μL de NaH_2PO_4 (10%); 400 μL de KCL (25%); 450 μL de CaCl_2 (25%) e 0,2 g de NaHCO_3].

Em tubos de polipropileno, 10 μL de cada amostra de plasma das corujas foram diluídos em solução estéril de ringer (190 μL). Foram adicionados a este preparo, 10 μL da diluição de *E. coli* (5×10^4 micro-organismos/mL). O controle positivo do ensaio foi determinado pela adição de 10 μL da solução de trabalho de *E. coli* a 200 μL de ringer estéril e o controle negativo consistiu em 210 μL de solução ringer estéril. Todas as amostras de plasma contendo a diluição *E. coli*, controles positivos e negativos foram incubados a 37°C por 1 h e, na sequência, 500 μL da solução TSB foram adicionados a cada amostra. A seguir, 300 μL de cada amostra foram agitados e transferidos em duplicata para a placa de cultura de 96 poços (previamente aquecida a 37°C) mantendo-se a temperatura controlada (37°C) durante 6 h. Após o tempo decorrido foram realizadas quatro leituras da placa com intervalos de 1 h. A atividade antimicrobiana do plasma das corujas foi calculada (atividade = $1 - [\text{densidade óptica da amostra} / \text{densidade óptica do controle positivo}]$), representando a proporção de micro-organismos mortos nas amostras em relação ao controle positivo.

6.2.7 Análises de dados

A especificidade do imunoenensaio para a quantificação de corticosterona plasmática foi confirmada pelo teste de paralelismo, i.e., o teste *t* de *Student*, comparando os coeficientes angulares das equações da reta das curvas do padrão de corticosterona e da curva do *pool* de plasma das corujas. O %REC foi calculado dividindo a porcentagem de ligação obtido pela porcentagem de ligação esperado. Os valores de CV foram expressos em unidades de percentual e foram calculados dividindo-se o desvio padrão pelo valor médio. As análises estatísticas do paralelismo foram realizadas no GraphPad Prism (versão 5.0, Windows, EUA). A média basal da produção de corticosterona e de MGC para cada animal foi calculada a partir dos valores reportados nas amostras coletadas nos dias prévios ao tratamento acústico, determinando-se o valor pico destes esteroides quando o valor da amostra superava a média basal individual somado a 2,5 vezes o valor do desvio padrão.

As concentrações de corticosterona e seus metabólitos, hemogramas e capacidade bactericida plasmática dos indivíduos foram analisados por estatística descritiva considerando os diferentes momentos de coleta de amostra (pré-, durante e após tratamento acústico). A normalidade dos dados foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk, transformando as variáveis não-paramétricas de acordo com a sua tendência. Uma ANOVA de medidas repetidas foi utilizado para avaliar o efeito do estímulo auditivo nos níveis de MGC (ng/g) em função do sexo e do grupo de animais manipulados para extração de sangue *versus* não-manipulados. Posteriormente, um segundo ANOVA foi realizado para avaliar todas as variáveis dependentes em função do sexo e tratamento (momentos pré-, durante e após-estímulo). Os grupos com diferenças significativas foram identificados pelos testes post-hoc de Tukey e Duncan. As análises foram realizadas utilizando o *software Statistical Analysis System* (versão 9.3 - SAS, Windows, EUA), considerado o nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Extração e quantificação dos metabólitos de glicocorticoides

Um total de 308 amostras de fezes de Corujinha-do-mato foram avaliadas e processadas. No ANOVA, os níveis de MGC não apresentaram valores significativos referentes ao grupo de animais manipulados *versus* não-manipulados [F (1,305) = 2,43

$p= 0,1499]$ considerando-se os valores de MGC independente do grupo. A ANOVA de duas vias mostrou que não há efeito do sexo nos níveis de MGC, mas sim do grupo de tratamento. A concentração média de MGC registrada para cada grupo foi de $120,63 \pm 85,76$ ng/g (pré-estímulo), $151,81 \pm 115,56$ ng/g (durante o estímulo) e $120,23 \pm 84,43$ ng/g (pós-estímulo). Estes dados estão apresentados na Figura 6-2, informando-se pelo teste de Duncan que a concentração do MGC no dia do tratamento acústico é significativamente superior aos níveis obtidos durante as fases anterior e posterior ao teste [$F(2,305) = 3,70$ $p=0,0259$].

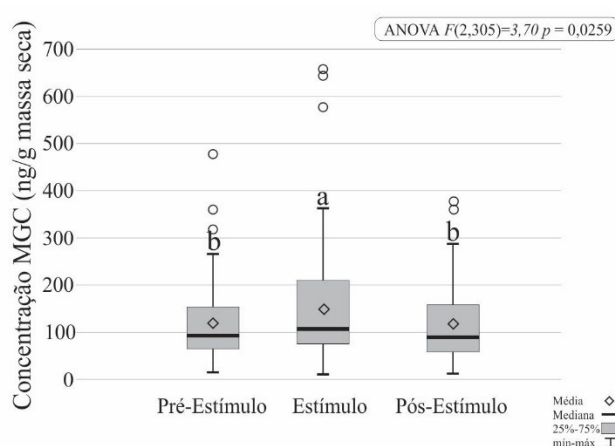


Figura 6-2 – Concentrações dos metabólitos de glicocorticoides em corujas (*Megascops choliba*) submetidas ao tratamento acústico (momentos pré-, durante e pós-estímulo). O ANOVA de duas vias mostrou que há efeito da hora da coleta e do tratamento sobre os níveis de MGC, apresentando interação significativa nos fatores [$F(2,305) = 3,70$ $p= 0,0259$]. Valores indicados com a mesma letra indicam que não são estatisticamente diferentes (pós-hoc de Duncan).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

6.3.2 Nível de corticosterona plasmática

Para a validação analítica do imunoenensaio, verificou-se que o coeficiente angular da curva obtida do *pool* de plasma das corujas ($slope = -32,86$) é estatisticamente semelhante ao da curva padrão de corticosterona ($slope = -36,53$, $F = 1,08$, $p = 0,321$), confirmando assim o paralelismo entre as duas curvas (Figura 6-3). Este resultado indica a similaridade imunogênica entre os antígenos do padrão e das amostras de Corujinha-do-mato. Através das diluições sucessivas do *pool* de plasma foi possível encontrar a diluição ideal (1:34) das amostras, a qual corresponde a porcentagem de ligação mais próxima de 50%. A precisão do ensaio apresentou uma recuperação média do hormônio de $95 \pm 10\%$. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram 3,5% e 8,1%, respectivamente.

A corticosterona plasmática apresentou valores médios de $2,6 \pm 1,6$ $\mu\text{g/dL}$ para o tratamento pré-estímulo; de $2,4 \pm 0,9$ $\mu\text{g/dL}$ no estímulo e de $2,3 \pm 1,0$ $\mu\text{g/dL}$ no pós-estímulo (Figura 6-4). No entanto, estes valores médios não apresentaram diferença entre os tratamentos [$F(2,52) = 0,32$ $p = 0,7299$] ou entre os sexos [$F(1,53) = 0,40$ $p = 0,5525$]. Em contraste, foi confirmado uma diferença significativa [$F(7,47) = 5,82$ $p < 0,0001$] ao avaliar os níveis de corticosterona plasmática de modo individual, sendo que duas corujas apresentaram valores pico deste esteroide durante a realização do tratamento acústico (Figura 6-5).

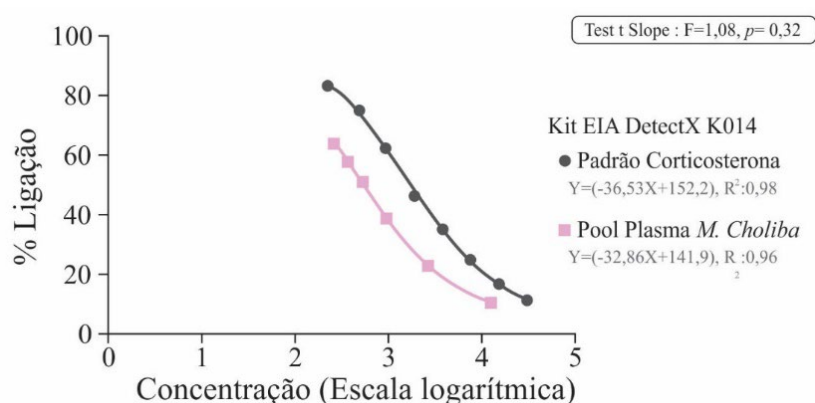


Figura 6-3 – Paralelismo dos níveis de corticosterona livre detectados em amostras de plasma de corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) usando imunoensaio enzimático DetectX K014 de Arbor Assay. Curva padrão de corticosterona diluído com um fator de diluição de 2 vezes (círculo) ($Y = -36,53x + 152,5, R^2 = 0,98$); pool plasma de corujas (quadrado) ($Y = -32,86x + 141,9, R^2 = 0,96$).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

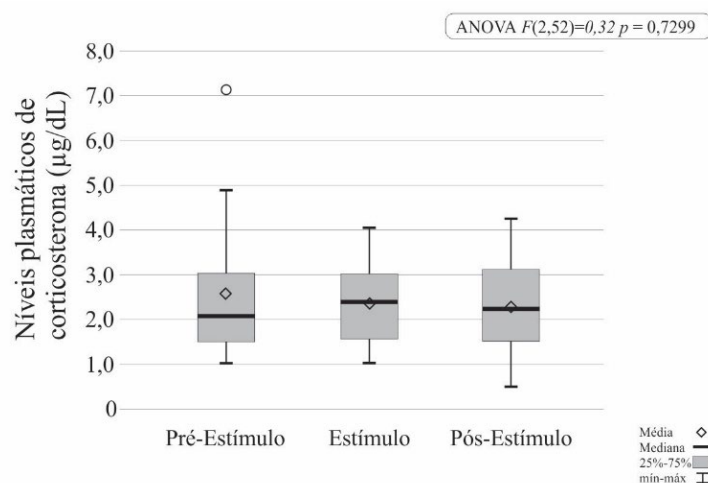


Figura 6-4 – Níveis plasmáticos de corticosterona livre expressos em unidades de $\mu\text{g/dL}$. A ANOVA não identificou diferenças nos níveis deste hormônio esteroide entre os tratamentos.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

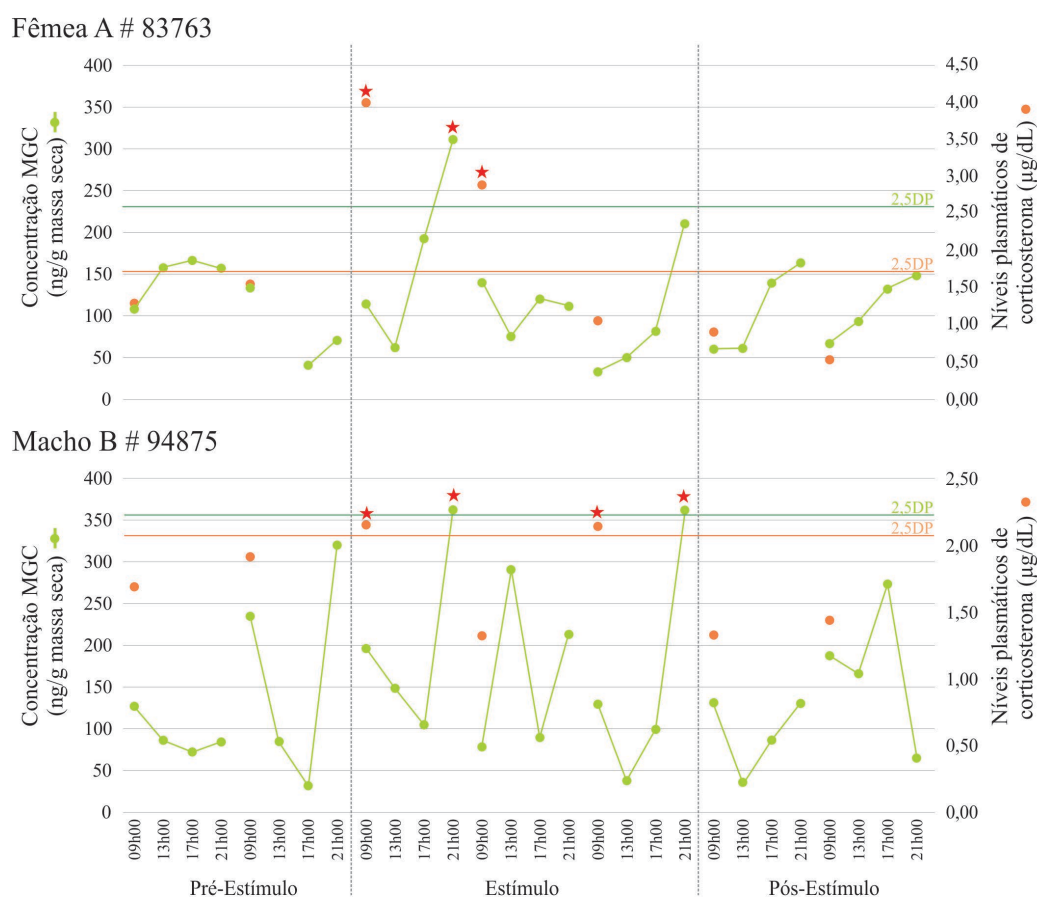


Figura 6-5 – Representação gráfica dos níveis de corticosterona plasmática e metabólitos de glicocorticoides da Corujinha-do-mato. Na parte superior dados da fêmea A#83763 e inferior os dados do macho B#94875. No eixo Y esquerdo encontram-se em verde as dosagens dos MGC (ng/g massa seca). No eixo Y secundário direito e em laranja níveis de corticosterona plasmática (µg/dL). Valores com estrela vermelha indicam as dosagens pico de corticosterona e seus metabólitos, superior a 2,5 vezes o valor do desvio padrão (linhas verde e laranja) sobre a média basal. As linhas verdes contínuas representam cada dia de amostragem, sendo dois dias para o tratamento pré-estímulo (d7 e d14) e dois dias para pós-estímulo (d42 e d49). No intervalo compreendido entre os dias 15 e 35 do experimento, os indivíduos foram submetidos ao estímulo auditivo, realizando três dias de amostragem neste período (d21, d28 e d35).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

6.3.3 Perfil de leucócitos

As contagens das células no hemograma procedentes de 55 esfregaços analisados, com exceção dos monócitos, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 6-6). Na contagem dos monócitos, o ANOVA de duas vias indicou que há efeito da interação entre o sexo e o tratamento [$F=4,62$ $p= 0,0325$]. O teste de Duncan identificou que os maiores níveis destas células foram obtidos no após-estímulo (18,5%), enquanto na fase pré-estímulo (12,12%) e durante o estímulo (14,91%) a contagem de monócitos não apresentou diferença significativa.

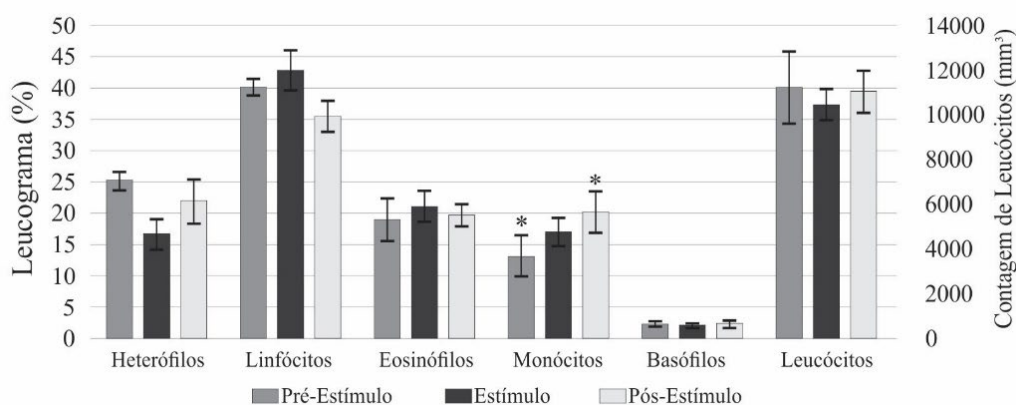


Figura 6-6 – Perfil de leucócitos de *Megascops choliba* avaliados pré-, durante e após o tratamento acústico. O asterisco indica a diferença estatística para o tipo de célula sanguínea. No eixo Y da esquerda encontra-se a contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo (%) em um total de 100 leucócitos. O eixo da direita refere-se à contagem de células leucocitárias estimadas por mm^3 de sangue.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

6.3.4 Capacidade bactericida plasmática de *M. choliba*

Os valores de capacidade bactericida plasmática apresentaram diferença entre os tratamentos [$F(2,49) = 6,51$ $p = 0,0137$]. O teste de Tukey informa valores superiores de CBP para os dias pré-estímulo ($0,91 \pm 0,09$), enquanto os valores durante o estímulo ($0,62 \pm 0,28$) e após-estímulo ($0,66 \pm 0,30$) apresentaram valores semelhantes entre si (Figura 6-7).

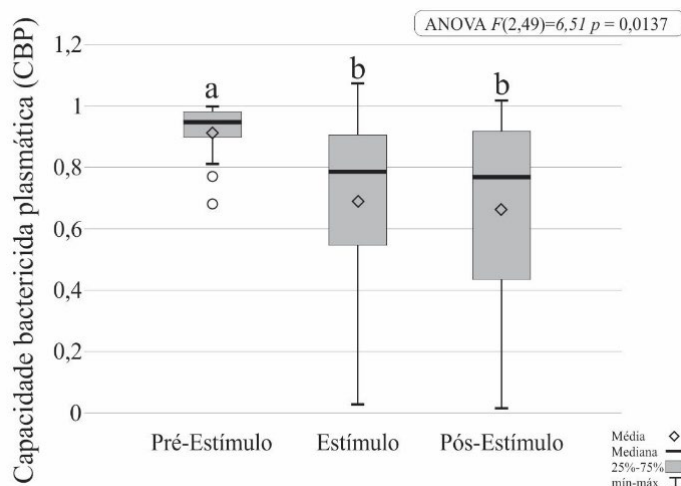


Figura 6-7 – Capacidade bactericida plasmática em Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) submetidas ao tratamento acústico (momentos pré-, durante e após-estímulo). As letras diferentes representam diferenças por comparações de Tukey entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

6.4 DISCUSSÃO

Ao expor as corujas a um áudio que simulava as condições hospitalares de um centro de triagem, obteve-se respostas fisiológicas de tipo endócrina e imune. Apesar dos níveis plasmáticos de corticosterona não apresentarem diferenças estatísticas entre os tratamentos, foi possível identificar a variabilidade na produção deste esteroide entre indivíduos, sendo observado valores picos de corticosterona durante o período do tratamento acústico em duas corujas.

A diferença intraespecífica na produção de corticosterona em aves submetidas a situações desafiadoras foi relatada previamente por Cockrem (2013) e pode estar relacionada a fatores como a idade, sexo, estado corporal, genética e temperamento (BÉZIERS *et al.*, 2020; COCKREM, 2007; GOYMANN; MOSTL, 2002; HAHN, 2011). Outra possível explicação para a resposta adrenal individual é a provável habituação às condições de cativeiro, condição relatada anteriormente para a espécie *Megascops kennicottii* (DUFTY JR; BELTHOFF, 1997). O possível efeito deste fator foi levado em consideração ao planejar o projeto, mas para alcançar o número amostral, não foi possível uniformizar a data de ingresso dos animais ao centro de triagem. Entre as hipóteses levantadas para explicar o aumento da corticosterona em situações desafiadoras, podemos mencionar a ativação dos processos do balanço energético dos indivíduos que regulam por exemplo, mecanismos que inibem a captação da glicose no nível celular (HORNER; MUNCKLL; LIENHARD, 1987; ROMERO; BEATTIE, 2022).

A grande maioria dos imunoensaios disponíveis no mercado quantificam a corticosterona total (DELEHANTY *et al.*, 2020). O EIA aqui avaliado apresentou parâmetros analíticos aceitos para sua validação (BROWN *et al.*, 2005) similar ao registrado em outras pesquisas com espécies aviárias em que este mesmo kit foi implementado (MOHAMMED *et al.*, 2021; RAMOS-GÜIVAS; JAWOR; WRIGHT, 2021; WILSTERMAN *et al.*, 2020). No entanto, a avaliação da corticosterona total é debatida na comunidade científica. Alguns autores consideram que o nível de corticosterona total é um indicador não-confiável como resposta ao estresse (BREUNER; DELEHANTY; BOONSTRA, 2013). Um grande conjunto de evidências apoia a hipótese de que os glicocorticoides ligados ao CBG (do inglês *corticosteroid binding globulin*) são inativos e indisponíveis para sua captação no tecido (PEROGAMVROS *et al.*, 2011; QIAN *et al.*, 2011). Estes achados sugerem a

necessidade de integrar outros métodos laboratoriais como a quantificação diferenciada da corticosterona livre e total assim como da quantificação do CBG (BREUNER; DELEHANTY; BOONSTRA, 2013; MALISCH *et al.*, 2010). Tendo isto em consideração, sugere-se a leitura do artigo realizado por Delehanty *et al.* (2020) onde descrevem os métodos analíticos para a quantificação da corticosterona livre.

Uma alternativa não invasiva para a avaliação dos eventos plasmáticos dos glicocorticoides é o estudo de seus metabólitos (GOYMANN, 2012). No Capítulo 1 do presente documento, foi discutida a validação do EIA para dosagem de MGC em amostras de fezes para a espécie em estudo, explicando-se também sua variação circadiana. Os MGC podem oferecer um panorama mais preciso da intensidade da resposta ao estresse quando comparados com níveis plasmáticos de glicocorticoides, uma vez que representam secreções cumulativas de horas ou dias dependendo da espécie (GOYMANN; MOSTL, 2002; PALME, 2019). No entanto, a interpretação da concentração de MGC para explicar um evento estressante em particular deve ser realizada de maneira cautelosa, considerando-se entre outros, o tempo de eliminação destes esteroides (ROMERO; BEATTIE, 2022). Desta forma, esperava-se que as corujas avaliadas apresentassem aumento dos MGC no período de amostragem (09h00 - 21h00) uma vez que o valor pico na concentração de MGC foi registrado até 2 h após o desafio com ACTH (Capítulo 1). Nas corujas aqui avaliadas, o valor médio dos níveis de MGC apresentou-se maior quando os indivíduos foram submetidos ao tratamento acústico. Este aumento no nível de MGC também foi observado em outras espécies aviárias submetidas ao estresse. Assim por exemplo, estudos realizados em corvos (*Corvus corax*) classificados pelos pesquisadores como sociais, altos níveis de MGC foram mais evidentes ao isolar os indivíduos de seus congêneres (STOCKER *et al.*, 2016). Em ararajuba (*Guaruba guarouba*) o pico nos níveis de MGC foi coincidente com comportamentos de automutilação após da estimulação com ACTH sintético (SINHORINI; PIZZUTTO; PALME, 2020). No entanto, vale a pena mencionar que nem todas as corujas apresentaram valores pico na produção de MGC, indicando uma vez mais que as respostas adrenais ao tratamento acústico são individuais (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004).

Evidências de outras pesquisas com aves confirmam que há uma variabilidade nas reações comportamentais aos agentes estressores (COCKREM, 2013). Assim, animais expostos a situações desafiantes suprimem a expressão de comportamentos sociais em favor de comportamentos que apoiam a automanutenção, por exemplo, a deslocamento

à procura de novas fontes de alimento (WILSTERMAN *et al.*, 2020; WINGFIELD *et al.*, 1998). Quando submetidos a situações de estresse, espera-se a manifestação de comportamentos específicos que possam relacionar-se com níveis de corticosterona e seus metabólitos. No entanto, nem sempre é possível estabelecer e/ou confirmar esta relação. No passeriforme *Sporophila angolensis*, por exemplo, foram identificados comportamentos de *freezing* ao estimular os machos com ACTH sintético, porém não foi confirmada sua correlação com os níveis de MGC (BARBOSA-MOYANO *et al.*, 2019). Em outra pesquisa, corvos isolados socialmente apresentaram comportamentos de estresse, mas não foi comprovada uma diferença nos níveis de MGC e/ou sua relação entre as variáveis (MUNTEANU *et al.*, 2017). No presente estudo foram também registrados os comportamentos de forma contínua das corujas durante todo o experimento; infelizmente, a qualidade das imagens não permitiu a diferenciação dos estados comportamentais descritos no etograma do Capítulo 1, sendo, portanto, desconsiderada a avaliação comportamental no presente capítulo.

O tratamento acústico afetou negativamente os componentes plasmáticos das corujas que matam *in vitro* a cepa de *E. coli*. No entanto, alguns indivíduos mantiveram sua capacidade bactericida ao longo do experimento. Esta variabilidade individual foi descrita em outras espécies de aves (TIELEMAN *et al.*, 2005), apresentando-se uma diminuição de até 40% da capacidade bactericida após sua exposição ao estresse de contenção (MATSON; TIELEMAN; KLASING, 2006). A capacidade de lise bacteriana *in vitro* resulta ser um ensaio eficiente para avaliar a imunidade inata dos indivíduos (TIELEMAN *et al.*, 2005) sendo um método menos exigente ao se comparar, por exemplo, com ensaios de anticorpos específicos (MATSON; TIELEMAN; KLASING, 2006). O efeito imune estimulador ou imunodepressor após situações estressantes é amplamente discutido na comunidade científica (DHABHAR, 2014; ILMONEN *et al.*, 2003; KELLER *et al.*, 1983; KUSHIMA *et al.*, 2003) e o resultado aqui obtido evidencia uma realocação dos componentes bactericidas presentes no plasma em direção talvez ao sistema linfático dos indivíduos (MATSON; TIELEMAN; KLASING, 2006). Este processo de realocação tem uma importante implicação para a saúde dos animais silvestres já que pode comprometer os processos de recuperação e/ou reabilitação feitos em cativeiro. No entanto, para o melhor entendimento destes processos de realocação e como eles modulam os sistemas alostáticos dos animais, sugere-se a implementação de mais estudos que considerem n amostral maior, incrementar o período de estudo, ou inclusive incorporar nas análises outras cepas

bacterianas, como por exemplo, bactérias associadas ao desenvolvimento de *bumblefoot*, doença comum em aves rapinantes mantidas em cativeiro (POORBAGHI; JAVDANI-GANDOMANI; NAZIFI, 2012).

Previamente tem sido demonstrado que em aves submetidas a condições estressantes a proporção relativa de heterófilos (H) aumenta na circulação, enquanto a proporção de linfócitos (L) diminui, levando a um aumento geral na razão H/L (BREUNER; DELEHANTY; BOONSTRA, 2013; DAVIS; MANEY, 2018). Assim, pintinhos submetidos a diferentes tipos de estresse, por exemplo, debicagem, choque elétrico, estresse térmico e ruído contínuo, apresentaram um aumento na razão H/L (MCFARLANE; CURTIS, 1988). Em filhotes de aves rapinantes da espécie *Falco tinnunculus* a razão H/L era maior quando os indivíduos eram competitivamente inferiores aos restantes da ninhada (MÜLLER; JENNI-EIERMANN; JENNI, 2011). A relação H/L também resulta ser útil ao avaliar que tipo de tratamento pode minimizar o estresse nos animais, por exemplo, a razão H/L foi reduzida ao suprir frangos com um simbiótico alimentar após submeter os animais a um estresse térmico (MOHAMMED *et al.*, 2021). No entanto, as corujas aqui avaliadas não apresentaram diferenças na razão H/L ou na contagem dos leucócitos antes, durante ou após do estímulo auditivo, com exceção dos monócitos. Em outras espécies de corujas (*Athene cunicularia*), esta razão de H/L também não apresentou diferença entre populações que habitavam em áreas urbanas (CAVALLI *et al.*, 2018). A maior porcentagem de monócitos tanto em fêmeas quanto em machos, foi registrado nos hemogramas realizados após o tratamento acústico. Entre as funções fisiológicas atribuídas aos monócitos se cita a mediação nas reações inflamatórias agudas (CRUVINEL *et al.*, 2010). O aumento na contagem destas células nos esfregaços das corujas pode, talvez, estar relacionado a impactos dos indivíduos com a grade da gaiola, porém, durante o experimento não foram observadas lesões aparentes dos animais que possam confirmar esta hipótese, além de que não foi possível estimar as frequências de deslocamento dos animais.

Em cativeiro, os animais são expostos a estímulos com capacidade de sobrecarregar os sistemas alostáticos do indivíduo (BUSCH; HAYWARD, 2009; LANDYS; RAMENOFKY; WINGFIELD, 2006; MORGAN; TROMBORG, 2007). Assim, animais silvestres mantidos em cativeiro podem experimentar interações sociais com outras espécies, seja com coespecíficos ou até mesmo humanos (MASON, 2010). Esta exposição prolongada pode levar à manifestação de comportamentos atípicos associados ou não ao aumento dos níveis de glicocorticoides (CABEZAS *et al.*, 2013).

Como mencionando anteriormente, os glicocorticoides ajudam nas respostas a situações energeticamente caras e potencialmente estressantes. A frequência e a duração destes desafios podem fazer com que um animal tenha níveis persistentemente altos de glicocorticóides, entrando num estado denominado como 'sobrecarga alostática' (ARLETTAZ *et al.*, 2015; BUSCH; HAYWARD, 2009). Se a sobrecarga alostática persiste, as ações prolongadas dos mediadores (ex. glicocorticoides) podem resultar em desgaste, fisiopatologia e dano, em vez de proteção (MCEWEN; WINGFIELD, 2010). Nas avaliações de bem-estar em animais silvestres mantidos em cativeiro, o aumento da concentração destes esteroides, i.e. acima do nível basal, tem sido utilizado como indicador de estresse. No entanto, vale a pena ressaltar que valores absolutos de hormônios resultantes de quantificação por EIA devem ser tratados com moderação, pois os laboratórios geralmente fornecem estimativas diferentes de concentração dos esteroides, devido a discrepâncias na padronização de configurações e procedimentos (ROMERO 2004; PALME *et al.*, 2013). Por isto, ao se implementar métodos EIA para a estudar a resposta adrenal dos animais, devem considerar-se as variações individuais próprias em resposta por exemplo ao fotoperíodo ou desafio (Capítulo 1 e 2 do presente documento), tendo em conta também, que as linhas bases dos esteroides mudam para cada animal. Há uma literatura crescente sobre estudos dos níveis de MGC em animais submetidos à carga alostática, como por exemplo a presença de turistas (ARLETTAZ *et al.*, 2015) ou mudança do status social (MUNTEANU *et al.*, 2017). No entanto, deve-se considerar a integração destes resultados junto com métricas de função imunológica e comportamental a fim de se obter uma melhor compreensão dos processos de adaptabilidade dos animais às condições de cativeiro. As corujas aqui avaliadas mostraram uma variedade no nível individual de respostas ao estímulo acústico, sendo a compreensão destes eventos fundamentais para o sucesso da reabilitação nos centros de triagem.

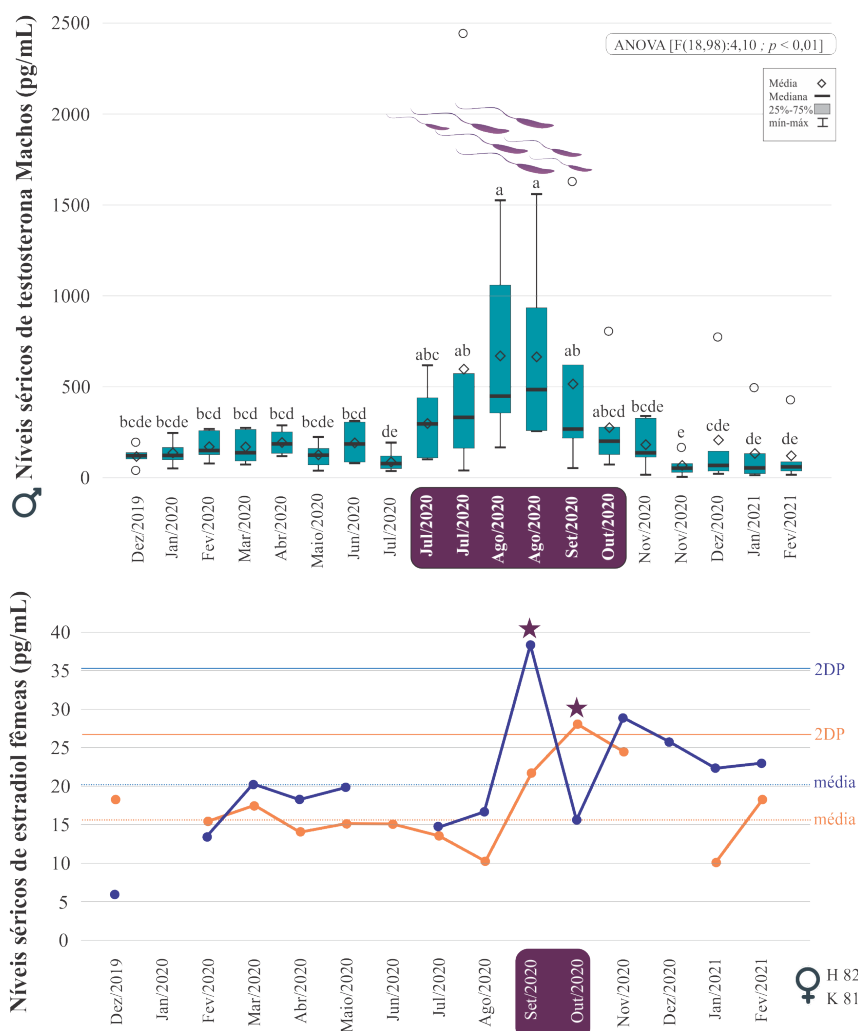
6.5 CONCLUSÃO

A exposição acústica que simula o ambiente hospitalar de um centro de triagem gera alterações endócrinas e imunológicas nas corujas. A resposta alostática apresentou diferenças em nível individual, sugerindo-se que algumas corujas podem ser mais suscetíveis às respostas externas que ocorrem rotineiramente no cativeiro. Dado que o aumento prolongado dos níveis de glicocorticoides e a imunidade inata comprometida afeta negativamente a saúde dos animais, sugere-se a implementação de protocolos que

considerem a separação dos indivíduos de acordo com as características biológicas como predadores/presa, assim as corujas devem ficar distantes de espécies predadoras como os gambas. Sabendo-se que os recursos destinados para os processos de reabilitação/recuperação dos animais silvestres são limitados, sendo muitas vezes insuficientes para realizar uma readequação das instalações. Neste caso aconselha-se a adoção de medidas simples, como por exemplo, evitar movimentos bruscos nas gaiolas durante a limpeza e que a comunicação entre o pessoal técnico seja realizada, preferencialmente, em lugares distantes do alojamento dos animais.

7 CAPÍTULO 4: “SAZONALIDADE ENDÓCRINA DE *Megascops choliba* MANTIDA EM CATIVEIRO NO SUDESTE DO BRASIL”

GRAPHICAL ABSTRACTS



HIGHLIGHTS

Os EIA são eficientes para quantificar testosterona, estradiol e seus metabólitos na Corujinha-do-mato.

Os machos possuem variação sazonal nos níveis séricos de T e E₂ que coincidem com a presença de espermatozoides;

As fêmeas possuem variação sazonal nos níveis plasmáticos de E₂.

Sazonalidade endócrina de *Megascops choliba* mantida em cativeiro no sudeste do Brasil

RESUMO

Nas aves, a atividade reprodutiva é regulada pela variação dos níveis plasmáticos de hormônios andrógenos e estrógenos cuja produção é desencadeada por estímulos presentes no ambiente geofísico e social. A dosagem e monitoramento de testosterona (T) e estradiol (E₂) por métodos de imunoenaios enzimáticos (EIA) permite o diagnóstico da atividade reprodutiva dos animais. O presente capítulo objetivou validar os kits EIA para a dosagens de T, E₂ e seus metabólitos numa espécie de coruja (*Megascops choliba*), além de identificar as possíveis diferenças nos níveis hormonais relacionadas ao momento da coleta de amostra, sexo e estado reprodutivo. Para este fim, amostras de soro e fezes de corujas adultas foram coletados em temporada reprodutiva e não-reprodutiva (Grupo 1: 6 machos e 6 fêmeas). A temporada reprodutiva foi comprovada pelas tentativas de cópula e presença de espermatozoides nos machos. Os kits EIA mostraram especificidade analítica, exatidão e precisão para a identificação e quantificação dos hormônios esteroides presentes nas amostras de soro e fezes da Corujinha-do-mato. Um segundo grupo de corujas adultas também foi avaliado durante 14 meses em condições de cativeiro (Grupo 2: 7 machos e 4 fêmeas). As amostras de sangue foram coletadas mensalmente, submetendo os machos a eletroestimulação cloacal como tentativa de coleta de sêmen. Os níveis séricos de T nos machos foram significativamente maiores nos meses de julho e agosto, os quais coincidem com a presença de espermatozoides. Por outro lado, duas das quatro fêmeas avaliadas apresentaram pico do nível sérico de E₂ nos meses de setembro e outubro, não sendo registrada a presença de ovos celômicos ou sua postura. Os métodos EIA se mostraram úteis no diagnóstico do estado reprodutivo de machos e fêmeas de corujas, sendo possível a sua utilização em programas de reprodução de rapinantes. Além disso, a espécie *M. choliba* apresenta sazonalidade reprodutiva no inverno da cidade de São Paulo, mesmo estando em condições de cativeiro.

Palavras-chave: Corujinha-do-mato. Validação imunoenaios. Comportamento reprodutivo. Eletroejaculação.

**Endocrine seasonality of *Megascops choliba* kept in captivity
in Southeast Brazil**

ABSTRACT

Reproductive activity of birds is regulated by the variation of plasmatic levels of hormones, androgens and estrogens, whose production obeys to stimuli present in their geophysical and social setting. Dosing and follow-up of testosterone (T) and estradiol (E2) by means of enzymatic immunoassay (EIA) allows diagnosis of their reproductive activity. The initial aim of this work was to validate the EIA kits for dosing of T, E2 and their metabolites in the Tropical Screech Owl (*Megascops choliba*), as well as to identify possible hormonal level differences related to sample-taking moment, gender, and reproductive seasonability. For this purpose, we collected serum and fecal samples of adult owls in reproductive and non-reproductive season (Group 1: 6 males and 6 females). Reproductive seasonability was confirmed by mating behavior and presence of spermatozoids in the males. EIA kits showed analytical specificity, accuracy, and precision to identify and quantify steroid hormones present in the Tropical Screech Owl serum and fecal samples. A second group of adult owls was also evaluated along 14 months of captivity (Group 2: 7 males and 4 females). Blood sampling was collected monthly, with males subjected to electric cloacal stimulation aiming to collect semen. T-serum levels in males were significantly higher along months of July and August, coinciding with the presence of spermatozoids. Additionally, two of the four females showed E2 serum level peak in September and October, with absence of cellomic eggs or their laying. We concluded that in São Paulo, *M. choliba* shows reproductive activity during winter, even under captivity conditions. EIA methods have proven useful for diagnosing reproductive seasonability of males and females, allowing their use in owl breeding programs.

Keywords: Tropical Screech Owl. Immunoassay validation. Reproductive behavior. Electroejaculation.

7.1 INTRODUÇÃO

A família Strigidae representa o maior grupo de aves rapinantes de comportamento noturno, comumente chamadas como corujas (WINK *et al.*, 2009). No Brasil, vários táxons representantes desta família encontram-se com algum grau de ameaça de extinção como, por exemplo, as espécies endêmicas *Pulsatrix perspicillata pulsatrix* categorizada como “vulnerável” e *Glaucidium mooreorum* considerada “extinta” (ICMBIO/MMA; BIODIVERSIDADE, 2018; PEREIRA *et al.*, 2014). Recentemente, duas novas espécies de corujas foram descritas como endêmicas do País: a Corujinha-do-xingú (*Megascops stangiae*) e a Corujinha-de-alagoas (*Megascops alagoensis*) (DANTAS *et al.*, 2021). Devido à limitada área de distribuição destas espécies, os autores sugerem ser categorizadas como “criticamente ameaçadas”. Apesar da importância ecológica dos rapinantes noturnos por atuarem no controle de roedores e insetos (MAGRINI; FACURE, 2008; MORAES; PEDROSO-JR; BANDEIRA, 2004; MOTTA, 2006; ŠOTNÁR; PAČENOVSKÝ; OBUCH, 2015), estas aves representam um grupo pouco estudado quanto à sua fisiologia reprodutiva, sendo um desafio para sua conservação (MARTIN *et al.*, 2010). Tendo em vista o aumento das taxas de extinção de espécies aviárias, há uma necessidade urgente em compreender os mecanismos regulatórios reprodutivos que auxiliem os programas de reprodução em cativeiro.

Entre as espécies de corujas com maior distribuição no continente americano pode-se citar a Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) (BIRDLIFE, 2021). Esta espécie é reconhecida como uma das corujas mais populares devido à facilidade em encontrá-las, tanto no ambiente urbano, como rural (BARROS; MOTTA-JUNIOR, 2014), oferecendo ser uma espécie modelo para o entendimento dos processos endócrinos em aves rapinantes de comportamento noturno. A espécie é monomórfica, sendo o estado adulto identificado quando apresenta uma envergadura entre 52 e 56 cm e comprimento total de até 22 cm (DE ANDRÉA SEGALL; GONZAGA; PAIVA, 2017; SICK, 1997). No Brasil, a temporada reprodutiva de *M. choliba* tem sido evidenciada em diferentes meses: no Norte do País foi registrada entre janeiro e julho, com um pico no mês de maio (GUILHERME; SOUZA, 2017); no Sudeste, os registros reprodutivos ocorrem entre agosto e outubro (DIAS; LIMA, 2015; MOTTA-JUNIOR; BRAGA, ROCHA; GRANZINOLLI, 2017).

A reprodução das aves é orientada por fatores ambientais sazonais tais como: clima, disponibilidade de alimento, locais de nidificação, interação social, entre outros (GWINNER, 2003). Os processos fisiológicos internos funcionam em combinação com fatores externos para promover o desenvolvimento gonadal (BALL; KETTERSON, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Entre os fatores internos pode-se mencionar as variações plasmáticas nos níveis de testosterona (T) e estradiol (E₂) controlados pelo relógio biológico, regulando e integrando funções fisiológicas como o metabolismo, a reprodução e o comportamento (DUNLAP, 1999). A dosagem e monitoramento de T, E₂ e de seus metabólitos por métodos de imunoenaios enzimáticos (EIA), permite o diagnóstico da atividade reprodutiva dos animais (BROWN *et al.*, 2005). No entanto, para assegurar a confiabilidade dos resultados, estes métodos EIA devem ser devidamente validados para cada tipo de amostra e espécie animal (GOYMANN, 2005). Com o intuito de descrever a sazonalidade reprodutiva de *M. choliba* mantida em condições de cativeiro, estabelecemos como hipótese inicial que os EIA avaliados são eficientes para quantificar T, E₂ e seus metabólitos na espécie em estudo. Adicionalmente, prevemos que a Corujinha-do-mato apresenta maior concentração sérica de T e E₂ no inverno, acompanhado da manifestação de comportamentos reprodutivos e presença de espermatozoides.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Permissão ética

As atividades experimentais como manutenção das corujas e coleta das amostras foram realizadas no Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres – CeMaCAS, previamente autorizadas mediante o processo N° 60272019/0000675-1 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da FMVZ-USP (N° 6896290419). A pesquisa também foi registrada no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (N° 70120-1) e no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado -SisGen N°A757E55.

7.2.2 Animais e alojamento

Um total de 23 corujas da espécie *Megascops choliba*, todas em idade adulta foram mantidas nas instalações do CeMaCAS, São Paulo, Brasil (23° 24 '47,0"S 46° 47' 29,0"W). Primeiramente, os indivíduos foram sexados utilizando métodos moleculares,

confirmando o estado hígido por testes laboratoriais sorológicos e coprológico. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. No Grupo 1, seis machos e seis fêmeas foram agrupados também em casais e mantidos em gaiolas de arame (1,4 m × 0,6 m × 0,7 m) para a realização dos ensaios de validação fisiológica dos kits EIA (05/2021 – 08/2021). O grupo 2 estava composto por sete machos e quatro fêmeas foram avaliados durante 14 meses (12/2019 – 02/2021), coletando-se mensalmente amostras de sangue, juntamente com registro do peso e condição corporal. Estes animais foram divididos em 4 casais (1 macho e 1 fêmea) em gaiolas de arame (1,0 m × 1,0 m × 1,0 m). Os três machos restantes desse grupo 2 foram mantidos em outra gaiola com a mesma dimensão. As gaiolas contendo os indivíduos foram mantidas em recintos semiabertos de 25 m², permitindo a exposição dos indivíduos a variação natural das condições climáticas. Cada gaiola foi acondicionada com tela Sombrite® 80% e lona, possibilitando aos animais pontos de fuga do sol e da chuva. Todos os animais tinham a disposição água *Ad libitum* e eram alimentados diariamente com dieta proteica a base de camundongo e codorna, oferecidos como presa morta.

7.2.3 Dados meteorológicos

De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, a cidade de São Paulo é identificada como clima subtropical úmido Cwa, caracterizado por um inverno notadamente seco e um verão bastante chuvoso (ALVARES *et al.*, 2013). Para a cidade de São Paulo é comum descrever o clima dividido em 4 estações: verão (dezembro, janeiro e fevereiro); outono (março, abril e maio); inverno (junho, julho e agosto), e primavera: (setembro, outubro e novembro). Os dados foram adquiridos da estação meteorológica Perus D2574, localizada a ~5 km do CeMaCAS, fornecidas pelo Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais – CEMADEN². Os dados de fotoperíodo para a cidade de São Paulo encontram-se disponíveis no site Time and Date³.

² Disponível em <http://www2.cemaden.gov.br/mapainterativo/>

³ Disponível em <https://www.timeanddate.com/sun/brazil/sao-paulo?month=2&year=2021>

7.2.4 Coleta e preparo das amostras de sangue e fezes

Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular com seringa de 1 mL e agulha 27,5 G x ½", e armazenadas em tubo sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3500 g por 5 min, retirando-se apenas o soro com auxílio de micropipeta. As amostras de soro foram identificadas e armazenadas em tubos cônicos a -30° C, até a realização dos imunoenaios. Como mencionado anteriormente, no Grupo 1, foram coletadas mensalmente amostras de sangue, diminuindo o intervalo a ~12 dias durante os meses de julho, agosto e setembro. Para os animais do Grupo 2 foram coletadas uma única amostra de sangue de cada indivíduo nos meses de maio e agosto de 2021, assim como amostras de fezes com intervalo de 4 horas (09h00, 13h00, 17h00, 21h00, 01h00 e 05h00) no mesmo dia da coleta de sangue.

Para minimizar o efeito matriz das amostras de soro, estas foram tratadas de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante dos kits EIA. Sucintamente, cada amostra do soro foi submetida a uma extração líquido-líquido com acetato de etila na proporção 1:5 (amostra:solvente, v/v). Assim, 200 µL de soro foram misturados com 800 µL de acetato de etila, agitadas no vórtex (15 min x 1000 rpm) e a fase orgânica (700 µL) foi transferida para outro tubo. O procedimento foi repetido por mais uma vez obtendo-se então 1400 µL de fase orgânica, os quais foram concentrados até a secura utilizando um SpeedVac (Vacfuge™). Por fim, as amostras foram ressuspendidas com volume apropriado de solução tampão EIA para posterior uso nos kits EIA. As amostras de fezes foram coletadas, liofilizadas e preparadas conforme procedimentos descritos no Capítulo 1.

7.2.5 Validação analítica e biológica dos Kit imunoenaios

A quantificação do nível sérico de T e seus metabólitos nas amostras foi realizada com o kit EIA DetectX Testosterona K032. Enquanto para o E₂ e seus metabólitos, os kits EIA utilizados foram o DetectX Serum 17β-Estradiol KB30 e o DetectX 17β-Estradiol K030, respectivamente. Todos esses kits EIA são comercializados pelo Laboratório Arbor Assays™ (Eisenhower Place Ann Arbor, MI, USA). Para cada imunoenensaio utilizado foi realizado a validação analítica (ensaio de especificidade, exatidão e precisão) e validação biológica para a amostra (matriz: soro ou extrato de esteroides fecais). A especificidade foi confirmada indiretamente através do ensaio de

paralelismo entre as equações das retas geradas pela diluição das amostras com a curva padrão dos hormônios E₂ e T. A exatidão foi avaliada com ensaios de fortificação da amostra e recuperação (%REC), que corresponde à diferença entre os valores observados e esperados, expressos em valor percentual. Para este fim, uma alíquota com concentração conhecida do padrão de hormônio (E₂ ou T) foi adicionada a uma amostra de coruja previamente quantificada. A precisão foi avaliada a partir do coeficiente de variação (CV) que corresponde à dispersão dos resultados de uma amostra quantificada várias vezes em um mesmo ensaio (CVI intraensaios) e em diferentes ensaios (CVE entreensaios).

A validação biológica foi efetuada pela comparação das concentrações dos hormônios contidas nas amostras coletadas em temporada reprodutiva e não-reprodutiva dos animais do Grupo 2. Para os machos, o estado reprodutivo foi confirmado pela presença de espermatozoides coletados pela técnica de eletroejaculação, descrita abaixo. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em duplicatas e seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro de ELISA (Elx 808™ Bio Tek Instruments Inc, USA) no comprimento de onda de 450 nm.

7.2.6 Quantificação dos hormônios por métodos de imunoensaio

Uma vez que os kits EIA foram validados, os níveis séricos de T (7 machos) e E₂ (4 fêmeas) dos animais do Grupo 1 foram quantificados. A amostragem foi realizada ao longo de 14 meses contínuos (dez/2019 – fev/2021). Também foram realizados dois *pools* com as amostras de soro dos machos (Pool A: 3 machos; Pool B: 4 machos), com a finalidade de quantificar os níveis séricos de E₂ no período compreendido entre junho e novembro.

7.2.7 Coleta de sêmen

A coleta de sêmen nas corujas foi realizada com massagens na cloaca juntamente com a técnica de eletroestimulação. Esse procedimento foi realizado mensalmente durante 14 meses, reduzindo a um intervalo de ~12 dias para o período entre julho e setembro, o qual corresponde à temporada reprodutiva da *M. choliba* (MOTTA-JUNIOR, 2002). Os animais foram anestesiados com Isoflurano (2-3%) (GUNKEL; LAFORTUNE, 2005). Após anestesiados, as massagens cloacais foram realizadas como primeira tentativa de coleta de material seminal. Posteriormente, os machos foram

expostos a um eletroestimulador com controle de voltagem, composto por uma probe plástica com eletrodo bipolar (2 cm de comprimento e de 0,3 cm de diâmetro). A probe foi introduzida na cloaca procurando o contato com a sua porção dorsal, visando o estímulo dos nervos responsáveis pela contração dos ductos deferentes. O protocolo de eletroestimulação utilizado foi o mesmo proposto por Frediani *et al.* (2019). Foram proporcionadas duas series de quatro estímulos, utilizando-se uma onda quadrática e frequência de 30 Hz, aumentando-se a tensão (Volts = V) gradualmente a cada estímulo. A série iniciou-se com 0,6 V e finalizou-se com 2,4 V. Após a eletroestimulação, uma nova massagem cloacal foi realizada para a tentativa de coleta do sêmen. A presença ou ausência de espermatozoides no material seminal foi verificada por microscópicos ópticos de luz com aumento de 40x.

7.2.8 Monitoramento do comportamento

Os comportamentos das corujas foram registrados utilizando um sistema de vídeo-monitoramento interno CFTV composto por 4 câmeras de resolução de imagem HD 720p (modelo VHL 1120 B Intelbras, Brasil), acopladas a um gravador de vídeo digital DVR Multi HD (model MHDX 1104 Intelbras, Brasil). O registro dos vídeos foi realizado de forma contínua das 18h00 às 06h00. Os vídeos foram analisados, baseados no etograma descrito no Capítulo 1, contabilizando-se unicamente os comportamentos de tentativa de cópula. Foram selecionadas imagens gravadas no período noturno prévio as tentativas de eletroestimulação e colheitas de sangue, usando-se o método de amostragem (ALTMANN, 1974).

7.2.9 Análises de dados

Os níveis séricos de T e E₂, assim como os metabólitos presentes nas fezes, foram apresentados em valores de média \pm desvio padrão (DP). Para cada coruja, os valores basais para cada hormônio foram calculados através de um processo iterativo onde valores altos que excederam a média + 2 DP foram excluídos e removidos temporariamente do banco de dados; a média dos valores restantes foi recalculada, repetindo o processo de remoção de dados até que nenhum valor ultrapassasse a média + 2 DP (PEREIRA *et al.*, 2018). Os valores maiores que o dobro da linha de base foram definidos como “picos” para T e E₂ sérico. A normalidade dos dados foi confirmada

através dos resíduos e homogeneidade das variâncias, sendo posteriormente transformados em escala logarítmica base 10. O teste de paralelismo para a validação dos kits EIA foi confirmado através do *test-t*, comparando os coeficientes angulares das equações das retas das curvas analíticas do padrão (T e E₂) e do *pool* de amostra. A exatidão do método foi calculada pela divisão da concentração observada pela concentração esperada, multiplicada por 100. Para a validação fisiológica dos kits EIA, um ANOVA de medidas repetidas foi usado para determinar as possíveis variações dos níveis de T, E₂ e seus metabólitos em amostras coletadas antes e durante a presença de espermatozoides. Para determinar a sazonalidade nos níveis séricos de E₂ e T, foi realizado um segundo ANOVA de medidas repetidas, acompanhados de Testes *Post-hoc* Duncan e Tukey. As análises foram realizadas no *software SAS System for Windows* versão 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA), aceitando-se valores $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.

7.3 RESULTADOS

Os dados referentes à precipitação (mm³), temperatura máxima e mínima (°C) e fotoperíodo (horas/dia) coletados durante a avaliação das corujas (dez/2019– fev/2021), encontram-se ilustrados na Figura 7-1. A precipitação mensal variou de 0,0 a 439,1 mm³, com pouca precipitação durante os meses de julho e setembro, sendo máxima em fevereiro. A temperatura mínima ocorreu em julho (10,6 °C), enquanto a temperatura máxima foi registrada em fevereiro (36,8 °C). O fotoperíodo médio mensal variou de 10,6 a 13,5 horas de luz do dia, registrando-se as horas de luz mais curtas e longas nos meses de julho e dezembro, respectivamente.

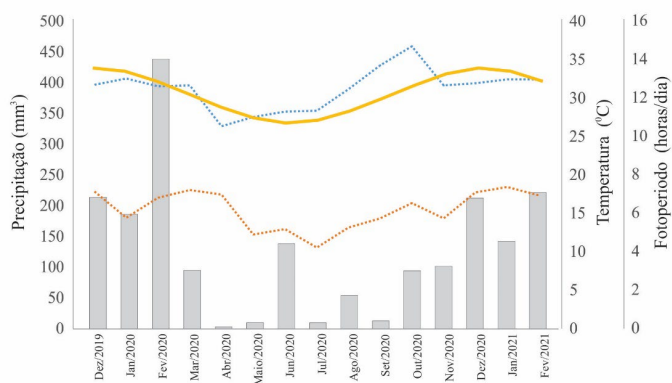


Figura 7-1 – Climograma da cidade de São Paulo. Precipitação média (barras cinzas), temperatura máxima média (linha azul), temperatura mínima média (linha laranja) e fotoperíodo horas por dia (linha amarela). As médias foram obtidas a partir da série histórica da Estação Meteorológica Perus (dezembro 2019 – fevereiro 2021).

Fonte: CEMADEN (2022)

Os coeficientes angulares da concentração logarítmica de porcentagem de ligação das amostras de soro e extratos fecais foram estatisticamente similares aos da curva padrão dos hormônios ($p > 0,05$) (Quadro 7-1), validando os kits EIA para a quantificação de T, E₂ e seus metabólitos na Corujinha-do-mato. As diluições ideais dos extratos de esteroides, aquelas que apresentaram a porcentagem de ligação próxima de 50%, foram de 1:40 para os ensaios de metabólitos de andrógenos, e de 1:16 para metabólitos estrogênicos. Os resultados para os ensaios de exatidão e precisão de cada kit EIA também se encontram no Quadro 7-1.

Quadro 7-1 – Parâmetros analíticos da quantificação de testosterona, estradiol e seus metabólitos em amostras de soro e extratos de esteroides fecais de Corujinha-de-mato

Parâmetros analíticos	Kits EIA analisados			
	T ⁽¹⁾	MA ⁽¹⁾	E ₂ ⁽²⁾	ME ⁽³⁾
Sensibilidade (pg/mL)	9,92	9,92	2,21	39,6
Equação da reta padrão	$y=-35,1x+148,3$	$y=-32,9x+135,5$	$y=-58,5x+148,4$	$y=-35,5x+140,1$
R ²	0,97	0,98	0,96	0,96
Linearidade				
Equação da reta amostra	$y=-39,4x+160,5$	$y=-32,0x+133,3$	$y=-60,7x+123,3$	$y=-34,2x+137,4$
R ²	0,97	0,97	0,95	0,96
Test t	F= 0,54 p= 0,48	F= 0,06 p= 0,80	F= 0,04 p= 0,83	F= 0,04 p= 0,83
Exatidão				
Recuperação (%)	89,12 ± 2,29	99,78 ± 1,59	86,89 ± 1,47	98,02 ± 3,56
Precisão				
Intra ensaios CVI (%)	8,29	8,6	14,72	8,28
Entre ensaios CVE (%)	15,57	10,13	16,34	10,08

⁽¹⁾ Kit EIA DetectX T K032 para análise de testosterona (T) e metabólitos de andrógenos (MA) em amostras de soro sanguíneo e extratos fecais; ⁽²⁾ Kit EIA DetectX E2 KB30 para análise de estradiol (E₂) em amostras de soro sanguíneo; ⁽³⁾ Kit DetectX E2 K030 para análise de metabólitos de estrógenos (ME) em amostras de extratos fecais.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Para as amostras de fezes coletadas do Grupo 2, os níveis de MA e ME mostraram diferenças significativas se comparados em função do período de amostragem (hora e mês de coleta) ($p < 0,05$). A interação dos fatores (hora × mês de coleta) não apresentou valor significativo estatístico. Na Figura 7-2 está ilustrado a variação dos níveis de MA e ME dos machos e fêmeas de acordo com a hora da coleta das fezes no mês reprodutivo, identificando-se com letras as diferenças obtidas no teste *post hoc* de Duncan. Nas amostras de soro dos machos e fêmeas foi possível identificar diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de T e E₂ entre os meses avaliados.

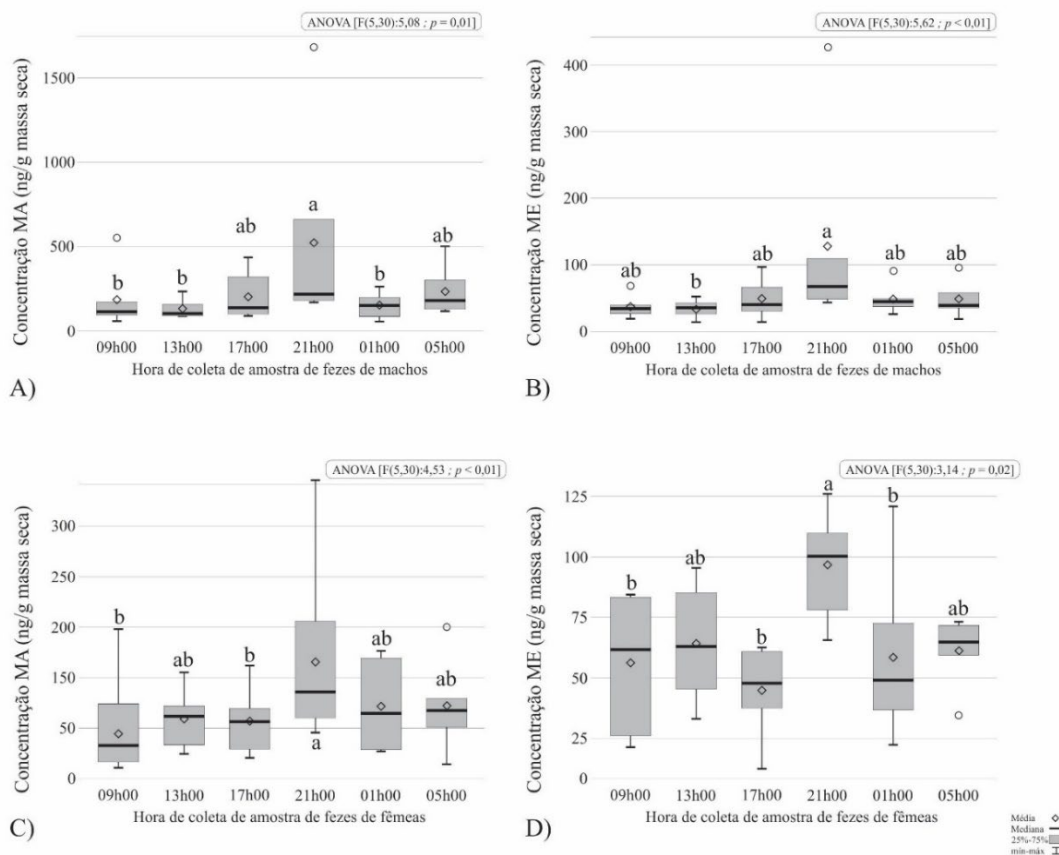


Figura 7-2 – Representação gráfica da variação diária nos níveis de metabólitos de andrógenos e estrógenos de *Megascops choliba*. Níveis de metabólitos de andrógenos (MA) e de estrógenos (ME) de acordo ao sexo, sendo as figuras A, B correspondentes aos 6 machos e C, D das 6 fêmeas. As amostras de fezes foram coletadas com intervalo de 4 h em um único dia do mês reprodutivo (presença de espermatozoides). Valores indicados com a mesma letra indicam que não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post-hoc de Duncan.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Nos animais avaliados do Grupo 2 as médias mensais das concentrações séricas de T dos 7 machos mostraram diferença significativa [F (18,98) = 4,10; $p < 0,01$]. A variação dos níveis de T nos 14 meses de amostragem encontra-se na Figura 7-3, identificando-se por letras os resultados obtidos do teste *post hoc* de Tukey. Na Figura 7-4, encontram-se os níveis séricos de E₂ para os pools de soro dos machos, confirmando-se diferença significativa entre os meses de amostragem [F (5,9) = 5,63; $p = 0,01$]. Finalmente, na Figura 7-5 encontram-se registrados os valores mensais de estradiol para as duas fêmeas que apresentaram valores picos (>2DP) deste esteroide nos meses de setembro e outubro.

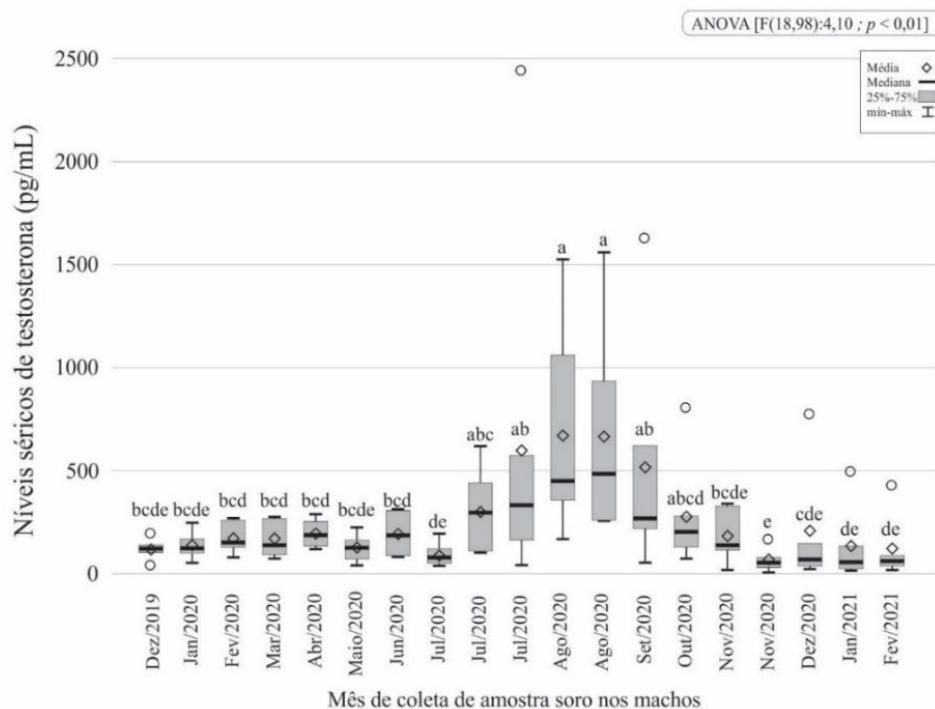


Figura 7-3 – Níveis séricos de testosterona nos machos de *Megascops choliba*. Amostragem realizada durante 14 meses contínuos (dezembro/2019 - fevereiro/2021). Valores indicados com a mesma letra indicam que não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste post hoc de Tukey.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

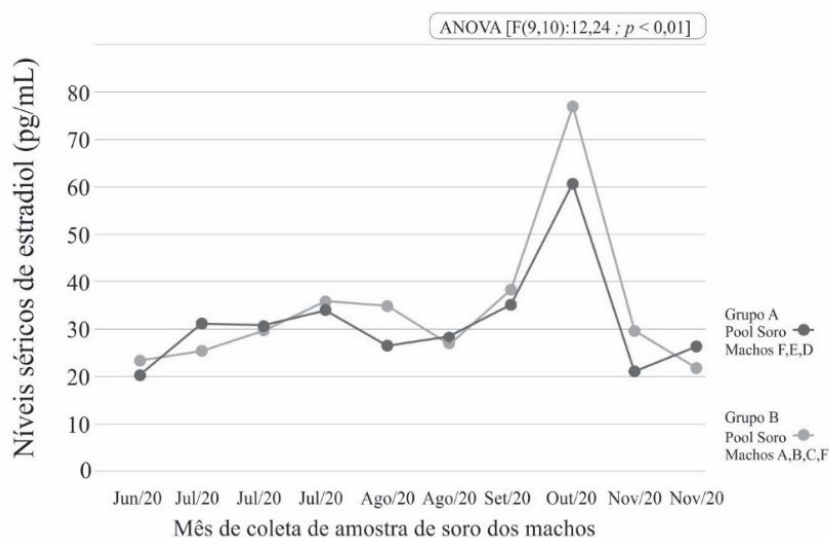


Figura 7-4 – Níveis séricos de estradiol nos machos *Megascops choliba*. O *post hoc* de Tukey identificou o mês de outubro diferente dos demais. Pool de soro de machos no grupo A: D, E e F; grupo B: Machos A, B, C e G. ANOVA [F (9,10) = 12,24; p < 0,01].

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

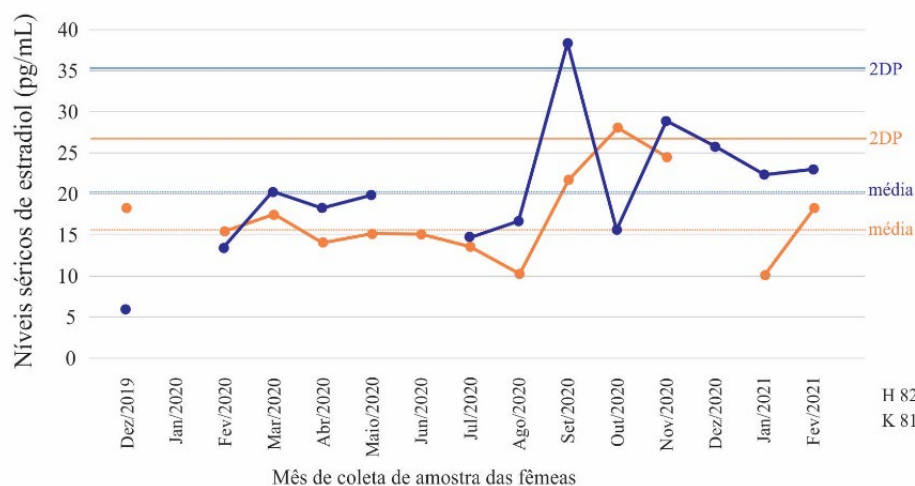


Figura 7-5 – Níveis séricos de estradiol nas fêmeas de *Megascops choliba*. Amostras da fêmea H82091 em azul e K81231 em laranja. Amostragem realizada durante 14 meses contínuos (dezembro/2019 - fevereiro/2021), comprovando-se o valor pico de E2, com os valores superiores a 2DP.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Após a massagem cloacal e eletroejaculação, quatro dos sete machos apresentaram espermatozoides sem mobilidade no mês de julho; sendo que, já na primeira coleta de agosto, foi observado a presença de gota espermática em cinco destes animais (Tabela 7-1). Na segunda coleta do mês de agosto, os espermatozoides apresentaram maior número e mobilidade, registrando-se espermatozoides imaturos no mês de setembro e ausência destes em outubro, com exceção de um dos machos (#81516). Nos meses anteriores a julho, e posteriores a outubro, não foram observados espermatozoides.

Tabela 7-1 – Registro da avaliação andrológica dos machos de *Megascops choliba*

Data	Tipo de colheita	♂ # 81516	♂ # 81176	♂ # 82383	♂ # 81636	♂ # 82244	♂ # 82270	♂ # 81999
15/07/20	Manual			Sim	Sim	Sim	Sim	
	Eletro							
08/08/20	Manual	Gota sptz		Gota sptz	Gota sptz	Gota sptz	Gota sptz	
	Eletro		Sim		Sim	↑ [] ↓ mot		Gota sptz
21/08/20	Manual	Sim	sptz sem motilidade	Sptz sem motilidade			sptz cabeça estranha	
	Eletro		sptz sem motilidade	Vigor 1	sptz sem motilidade	sptz sem motilidade		
10/09/20	Manual			sptz imaturos	sptz imaturos	sptz imaturos	↑ [] ↓ mot	
	Eletro		↓ [] ↑ mot	Não				Sim
08/10/20	Manual			Sim				
	Eletro		Sim	Sim				

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Conforme registrado na Figura 7-6 foi possível identificar o comportamento de intenção de cópula de um casal composto por macho e fêmea. No entanto, este comportamento também foi registrado entre machos.

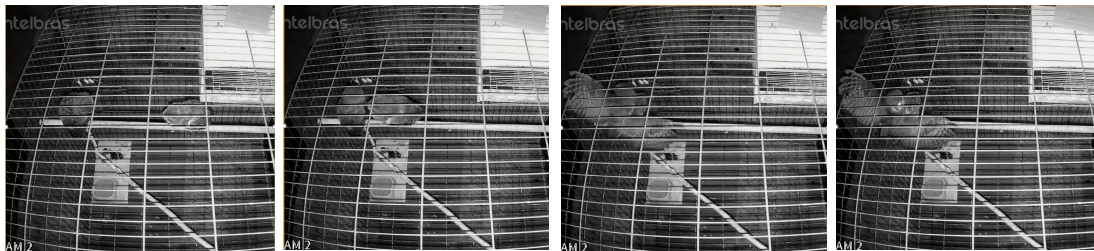


Figura 7-6 – Sequência de frames de vídeo de intenção de copula em corujas *Megascops choliba* mantidas em cativeiro.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

7.4 DISCUSSÃO

No sudeste do Brasil e em condições de cativeiro, a reprodução de *M. choliba* é sazonal, sendo que para os machos nos meses de agosto e setembro foi observado o maior nível sérico de andrógenos e estrógenos associados à espermatogênese e expressão de comportamentos reprodutivos. Além disso, fora da temporada reprodutiva foi observado uma diminuição dos níveis destes esteroides e ausência de espermatozoides. A similaridade imunogênica entre os antígenos do padrão de estradiol e testosterona e os antígenos presentes nas amostras de soro e extrato de fezes da Corujinha-do-mato foi comprovada pelo teste de paralelismo, demonstrando que os kits EIA são adequados para o diagnóstico e monitoramento do estado reprodutivo de machos e fêmeas. Adicionalmente, os outros parâmetros analíticos apresentaram valores adequados para a quantificação de hormônios sexuais por imunoenaios (ANDREASSON *et al.*, 2015; BROWN *et al.*, 2005).

Geralmente, as amostras de soro ou plasma não são pré-tratadas (extração, diluição ou concentração) no momento de realizar os imunoenaios. No entanto, a depender da marca do kit EIA utilizado, amostras sem pré-tratamento podem gerar resultados incorretos por conta de interferências analíticas na matriz da amostra (HADDAD; GIACHERIO; BARKAN, 2019; WOOD, 1991). A baixa concentração do hormônio na amostra acompanhada de uma baixa sensibilidade do EIA, pode resultar na ausência de detecção do analito de interesse (BIENBOIRE-FROSINI *et al.*, 2017; HADDAD; GIACHERIO; BARKAN, 2019). Ensaio preliminares usando soro de

coruja diretamente no EIA, mostraram necessidade de uma pré-concentração do analito. Dentre os métodos de extração/concentração dos hormônios sugeridos pelo fabricante do kit EIA⁴, encontra-se a extração líquido-líquido com uso de éter etílico ou acetato de etila. Porém, o uso do solvente éter é mais trabalhoso por conta da sua elevada volatilidade, portanto, neste trabalho, optou-se por utilizar o solvente acetato de etila.

O processamento das amostras de fezes, assim como o intervalo de coleta, já foi discutido no Capítulo 1. A partir dos dados obtidos com os métodos EIA do presente capítulo, foi possível observar diferenças significativa nos níveis diários de metabólitos de esteroides, sendo registrada a maior concentração de MA e ME às 21h00. A partir deste dado, sugere-se que a implementação de protocolos não-invasivos em corujas seja realizada no horário noturno. O tipo de produto metabólico dos hormônios esteroides pode ser diferente entre os gêneros de uma mesma espécie (TOUMA; PALME, 2005), sendo necessário algumas vezes o uso de diferentes EIA para a análise de andrógenos em machos e fêmeas (GOYMANN, 2005). Os EIA aqui avaliados mostraram-se úteis para a identificação e quantificação dos MA e ME em amostras de fezes para ambos os sexos. Sendo os metabólitos de hormônios resultados de um conjunto das concentrações dos esteroides plasmáticos (GOYMANN; MOSTL; GWINNER, 2002; TOUMA; PALME, 2005), a detecção do analito pelo EIA resulta ser mais fácil. Porém, recomenda-se realizar primeiro o ensaio de paralelismo para confirmar a similaridade antigênica do EIA com a amostra, e também identificar o melhor fator de diluição da amostra (ANDREASSON *et al.*, 2015; PALME *et al.*, 2013).

Entre os métodos de validação fisiológica dos EIA, pode-se citar a estimulação farmacológica dos animais, por exemplo, com o uso de ACTH sintético da glândula adrenal como foi descrito no Capítulo 1. Na validação de imunoenaios para dosagem de esteroides sexuais pode-se citar o uso de GnRH sintético (LOVAS; JOHNSTON; FILIPPICH, 2010; PEREIRA; GRANZINOLLI; DUARTE, 2010). Por outro lado, a comparação da dosagem hormonal de amostras coletadas de animais em diferentes estados reprodutivos também permite a validação biológica dos imunoenaios (BROWN *et al.*, 2005). Desta forma o EIA é validado fisiologicamente ao conseguir a dosagem diferenciada de metabólitos de progesterona em amostras de fêmeas coletadas

⁴ Disponível em <https://www.arborassays.com/resource-type/protocols/>

antes e após da postura dos ovos (PEREIRA *et al.*, 2018). Os EIA aqui utilizados foram validados ao se comparar a dosagem dos esteroides de acordo ao estado reprodutivo dos machos em relação da presença/ausência de espermatozoides.

A produção e maturação de espermatozoides depende principalmente dos efeitos regulatórios da testosterona (CHIMENTO *et al.*, 2014; GARAMSZEGI *et al.*, 2005; KIEZUN *et al.*, 2015). Em aves cuja reprodução é sazonal, o aumento do nível plasmático deste esteroide tem sido reportado na literatura como relacionado positivamente com a espermatogênese (LESKA *et al.*, 2012, 2015; PENFOLD *et al.*, 2000). Nas corujas aqui avaliadas, o aumento sérico de T aconteceu junto com o primeiro registro de espermatozoides na segunda amostragem de julho, registrando-se o maior número e motilidade dos espermatozoides na segunda amostragem de agosto quando os níveis de T eram máximos. Nos meses seguintes, os níveis de T e a presença de espermatozoides diminuíram, sendo totalmente ausentes no mês de novembro. Em outras espécies de rapinantes sazonalmente reprodutivas, a janela de três meses dos processos de espermatogênese e espermiogênese também foram descritas (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Técnicas histológicas e de radiomarcagem determinaram que a duração da espermatogênese é de aproximadamente 12,8 dias em codornas (AMIR; BRAUN-EILON; SCHINDLER, 1973; CLULOW; JONES, 1982; LIN; JONES, 1992), o que talvez explique o aumento na presença de gametas entre as duas coletas de agosto nas corujas. Similar aos achados nesta pesquisa, outras espécies de corujas mantidas em cativeiro na cidade de São Paulo (*Asio stygius* n= 2, *Bubo virginianus* n= 1 e *Tyto alba* n = 2) também registraram sazonalidade na produção de sêmen no inverno-primavera após a eletroestimulação (FREDIANI *et al.*, 2019).

Os perfis de andrógenos também podem refletir o acasalamento e o sistema social das aves (DUYSE; PINXTEN; EENS, 2003; HAU, 2007; PETERS; ASTHEIMER; COCKBURN, 2001), registrando-se por exemplo, a relação dos MA e comportamentos de copula em *Harpia harpyja* (BLANK *et al.*, 2020) e *Falco sparverius* (PEREIRA; GRANZINOLLI; DUARTE, 2010). Os machos de corujas (*Megascops kennicottii*), apresentam altos níveis de T nos períodos em que apresentam maior número de interações com machos coespecíficos, por exemplo, no período de estabelecimento do território e durante a época de reprodução (HERTING; BELTHOFF, 1997). Embora não fosse um dos objetivos desta pesquisa, os três machos mantidos na mesma gaiola apresentaram valores pico dos níveis de T coincidindo com a presença de espermatozoides, igual que os machos que foram mantidos em casais com as fêmeas.

Nestas corujas não foram registrados comportamentos agressivos, pelo contrário, os machos apresentavam comportamentos de *preening* recíproco (ROULIN *et al.*, 2016), mantendo-se juntos na posição estática durante o período diurno de descanso.

A variação plasmática do estradiol em aves masculinas nem sempre corresponde ao seu estado reprodutivo. Em gansos de reprodução sazonal (*Anser anser*) (LESKA *et al.*, 2015), registraram flutuações nas concentrações intra-testiculares de E₂ que coincidiam com o estado ativo da espermatogênese, porém as concentrações plasmáticas do E₂ permaneceram inalteradas com o transcorrer das estações. Nas corujas macho, aqui avaliadas, foi observado um pico nos níveis séricos de E₂ no mês de setembro e, no mesmo mês, foi observado o menor nível de T, sugerindo maior atividade da aromatase neste mês (SALDANHA; SCHLINGER, 1997; SMITH; ANDREWS; SINCLAIR, 1997). No entanto, esta hipótese levantada deve ser avaliada com moderação, uma vez que não foram realizadas dosagens de E₂ em nível individual.

Ao avaliar as amostras de soro das fêmeas de modo grupal, estas não apresentaram diferenças significativas entre os meses de amostragem, inclusive quando os dados foram agrupados no fator de 4 meses de acordo a estação climática. Isto devido a duas das quatro fêmeas não apresentarem valores picos de E₂ nos meses amostrados. Na tentativa de realizar o seguimento da morfologia ovariana das fêmeas, foram realizados testes de ultrassonografia transcutânea em carcaças da espécie em estudo (dados não apresentados), porém as características do equipamento (ex. transdutor linear com frequência de até 13 MHz) não foram suficientes para visualizar a gônada. Em outras espécies de aves, o acompanhamento do desenvolvimento gonadal por métodos de ultrassonografia transcutânea mostrou-se efetivo em espécies de aves como frangos de corte (MELNYCHUK *et al.*, 2002), *Coturnix coturnix japônica* (LANNA *et al.*, 2013) e *Apteryx mantelli* (JENSEN; DURRANT, 2006). A falta de detecção da variação sazonal nos níveis de E₂ nas duas fêmeas pode indicar que os indivíduos não entraram no ciclo reprodutivo. Não foram registrados eventos de postura apesar da obtenção de valores picos de E₂ para a estação de primavera mesmo que acompanhados de comportamentos de intenção de cópula. Entre os motivos pode-se citar as condições de cativeiro, como o tipo de alimentação, falta de condições apropriadas para nidificar (DIAS; LIMA, 2015), ou inclusive a presença constante do macho. No entanto, já foi relatado na espécie *Megascops asio* o registro de ninhadas com até 6 ovos, mesmo em condições de cativeiro e a presença de casais durante todo o ano (HAHN, 2011). O estado corporal de todos os indivíduos aqui avaliados não mostrou diferença

significativa durante o período de estudo, sendo próximo de 120 g para as fêmeas e de 115 g para os machos, sem evidência de sobrepeso.

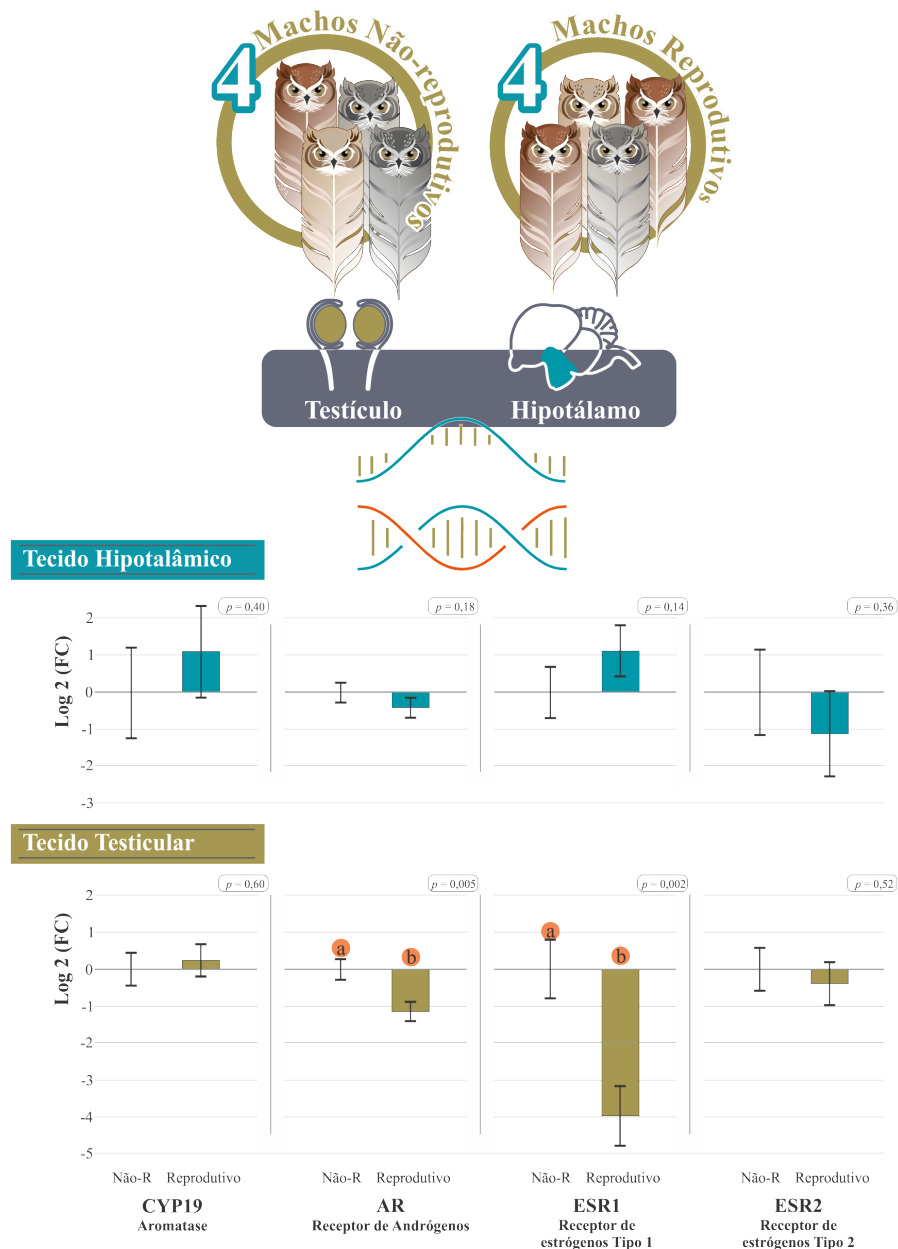
Na maioria das espécies de aves os processos fisiológicos reprodutivos são regulados e sincronizados por fatores externos como o fotoperíodo e as interações sociais (BALL, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2021; PEREIRA; GRANZINOLLI; DUARTE, 2010). Altos níveis de T, comportamentos de copula e presença de espermatozoides nos machos de corujas aqui avaliados aconteceram na estação do inverno, associados talvez a diminuição das horas de luz e precipitação, próprias da estação. No entanto, recomenda-se a avaliação das corujas em seu ambiente natural para uma melhor interpretação da regulação ambiental e a ativação do eixo hipotálamo- hipófise gonadal.

7.5 CONCLUSÃO

Os imunoenaios enzimáticos aqui avaliados e validados resultaram ser úteis para o diagnóstico e o monitoramento do estado reprodutivo de Corujinha-do-mato, bem seja a partir de amostras de soro ou por extratos de esteroides fecais. Adicionalmente, os machos de corujas avaliados em condições de cativeiro, apresentaram espermatogênese sazonal, que coincide com os maiores níveis séricos de testosterona. A ausência de variação mensal nos níveis séricos de E₂ nas duas fêmeas confirma que elas não entraram no ciclo reprodutivo, devido provavelmente às condições próprias do cativeiro. Apesar que as outras duas fêmeas apresentaram valores picos de E₂, e que foi confirmada a intenção da cópula nos vídeos, não foram observados eventos de postura.

8 CAPÍTULO 5: “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE AROMATASE, RECEPTORES ANDROGÊNICOS E ESTROGÊNICOS EM CORUJAS SAZONALMENTE REPRODUTIVAS”

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

Corujas apresentam transcritos de aromatase em tecidos gonadal e hipotalâmico.

Machos não-reprodutivos apresentam maior expressão de genes receptores andrógenos e estrógenos tipo 1 no tecido testicular em comparação aos machos reprodutivos.

Avaliação da expressão gênica de aromatase, receptores androgênicos e estrogênicos em corujas sazonalmente reprodutivas

RESUMO

Em aves, adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais reprodutivas são reguladas por mecanismos neuroendócrinos em resposta a fatores ambientais específicos, sendo o estado de recrudescência e regressão gonadal dependente da variação nos níveis plasmáticos dos hormônios sexuais. No testículo, a testosterona (T) e o estradiol (E₂) agem principalmente pelo reconhecimento de receptores. Alternativamente, a T pode ser aromatizada para produzir E₂. Embora a ação dos hormônios androgênicos e estrogênicos sejam essenciais em processos fisiológicos como a espermatogênese e manifestação de comportamentos sexuais nos machos, estudos sobre a expressão gênica destas proteínas em espécies silvestres de reprodução sazonal são escassos. A proposta desta pesquisa é fornecer conhecimentos inovadores relacionados à biologia reprodutiva de corujas (*Megascops choliba*), avaliando a capacidade de produção do E₂ (gene aromatase: CYP19A1) e a presença dos genes receptores de andrógenos (AR) e de estrógenos (ESR1 e ESR2) em tecidos gonadais e hipotalâmicos provenientes de machos em vida livre. A abordagem experimental a ser implementada inclui a identificação qualitativa e quantitativa de transcritos por técnicas de reação em cadeia da polimerase PCR. Os transcritos aqui avaliados não apresentaram diferença significativa no tecido hipotalâmico de machos reprodutivos *versus* não-reprodutivos. No entanto, em nível gonadal, os machos não reprodutivos apresentaram uma maior produção de transcritos para os genes AR e ESR1.

Palavras-chave: Strigiformes. qPCR. Sazonalidade reprodutiva. Hormônios esteroides.

Evaluating expression of the aromatase, receptors of androgens and estrogens genes in seasonally reproductive owls

ABSTRACT

In birds, behavioral, morphologic, physiologic reproductive adaptations are regulated by neuroendocrine mechanisms in response to specific environmental factors, depending on the state of recrudescence and gonadal regression of the variation of plasmatic levels of sexual hormones. In the testicle, testosterone (T) and estradiol (E2) act mainly upon recognition of receptors. Alternatively, T can aromatize to produce E2. Even though the action of androgenic and estrogenic hormones is fundamental in physiological processes such as spermatogenesis and the manifestation of sexual behavior in males, studies of the genic expression of these proteins in wild species of seasonal reproduction are sporadic. The purpose of this search is to provide innovative knowledge related to the reproductive biology of owls (*Megascops choliba*), by evaluating estradiol production capability (aromatase gene: CYP19A1) and the presence of genes of receptors of androgens (AR) and estrogens (ESR1 and ESR2) in gonadal and hypothalamic tissues of males in free life. The experimental focus to be implemented includes the qualitative and quantitative identification of transcripts by means of polymerase PCR chain reaction techniques. The transcripts evaluated showed no significant difference in the hypothalamic tissue of reproductive and non-reproductive males. However, at the testicular level, non-reproductive males showed higher transcripts for genes AR and ESR1.

Keywords: Strigiformes. qPCR. Reproductive seasonality. Steroid hormones.

8.1 INTRODUÇÃO

Em aves, a sazonalidade reprodutiva está associada a fatores ambientais como o clima, interações sociais e disponibilidade de alimento (BALL, 1993; DAWSON, 2008; DAWSON; SHARP, 2007; LESKA; DUSZA, 2007). Em passeriformes, por exemplo, a duração da luz do dia é reconhecida como o fator mais importante ao fornecer o sinal *go/no-go* que inicia o desenvolvimento gonadal (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2007; FOLLETT; MATTOCKS; FARNER, 1974; SHARP, 2005), sendo a resposta ao fotoperíodo específica para cada espécie (BLACHE *et al.*, 2001; FARNER; WILSON, 1957; FOLLETT; MAUNG, 1978; SAITO *et al.*, 1992). A plasticidade morfológica das gônadas, em resposta aos estímulos ambientais, é regulada por uma rede de fatores de transcrição, proteínas, hormônios, enzimas e receptores, expressos nos diversos níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG)(ANTHONY; BUSS, 1974; CHEMINEAU *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2010).

A produção e liberação dos hormônios esteroides sexuais são atribuídos majoritariamente ao tecido gonadal e adrenal. No entanto, a atividade de síntese destes esteroides também são descritas em regiões do encéfalo aviário, denominando-se por alguns autores como neuroesteroides (GOODSON *et al.*, 2005; MATSUNAGA; UKENA; TSUTSUI, 2002; TSUTSUI; MATSUNAGA; UKENA, 2003; TSUTSUI; YAMAZAKI, 1995; UKENA *et al.*, 1999). Os hormônios estrogênicos, como o estradiol (E₂) e a estrona (E₁), são produto da conversão dos andrógenos testosterona (T) e androstenediona (AE) pela enzima aromatase (CARREAU; BOURAIMA-LELONG; DELALANDE, 2012; CZAJKA; SIMPSON, 2010). Esta enzima pertence a superfamília do citocromo P450 e é produto da transcrição e tradução do gene CYP19A1 (CZAJKA; SIMPSON, 2010). Nos vertebrados, apresenta-se diferença na transcrição deste gene entre espécies, sexo e idade dos indivíduos (LANCE *et al.*, 2003; SALDANHA; SCHLINGER, 1997; SMITH; ANDREWS; SINCLAIR, 1997). Em aves, por exemplo, a aromatase foi identificada por métodos de imuno-histoquímica nos testículos de galos adultos (*Gallus gallus*) mas não em estado juvenil (SMITH; ANDREWS; SINCLAIR, 1997). Em passeriformes como o chopim (*Molothrus ater*) e no diamante mandarim (*Taeniopygia guttata*) tem sido demonstrada a presença da aromatase no núcleo estria terminal e na área pré-óptica (SALDANHA; SCHLINGER, 1997; SCHLINGER; ARNOLD, 1991). No entanto, a expressão do gene CYP19A1 não foi confirmada nos testículos do diamante mandarim (FREKING; NAZAIANS;

SCHLINGER, 2000; SCHLINGER; ARNOLD, 1991), sugerindo que, para esta espécie, os níveis plasmáticos do E₂ derivam de tecidos encefálicos, além de expor a possibilidade de variações importantes nos padrões de síntese de esteroides entre as espécies aviárias.

Entre os efeitos dos hormônios estrogênicos nos machos pode-se citar a modulação da espermatogênese influenciando a divisão de células-tronco espermatogoniais, bem como a proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose de células germinativas (CARREAU *et al.*, 2011; O'DONNELL *et al.*, 2001). Já para os hormônios androgênicos, como a testosterona, têm sido descritos efeitos no interstício e nos túbulos seminíferos, que resultam na produção e maturação de espermatozoides (CHIMENTO *et al.*, 2014). Adicionalmente, o incremento nos níveis plasmáticos de T tem sido também relacionado com o sucesso reprodutivo masculino ao promover, por exemplo, a manifestação de características sexuais secundárias e a expressão de comportamentos sexuais como o cortejo e a territorialidade (HAU, 2007).

A maioria das ações dos hormônios esteroides é mediada pelo reconhecimento e união a proteínas receptoras nucleares (VERDERAME; SCUDIERO, 2018). Neste mecanismo, o complexo hormônio/receptor atua como um fator de transcrição que se liga ao DNA a fim de regular a expressão gênica (MANGELSDORF *et al.*, 1995; VERDERAME; SCUDIERO, 2018). Para os hormônios estrogênicos são descritos dois tipos de receptores, os tipo alfa e tipo beta (ER α , ER β), codificados pelos genes ESR1 e ESR2, respectivamente (BÖTTNER; THELEN; JARRY, 2014; CAMACHO-ARROYO *et al.*, 2003; GRIFFIN *et al.*, 1999; VERDERAME; SCUDIERO, 2018). Em aves masculinas o ER α tem sido identificado nas células somáticas de Sertoli e Leydig, bem como nas células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides redondas); já a localização de ER β é restrita a células somáticas e ocasionalmente determinada em células mióides (LESKA *et al.*, 2015). Adicionalmente, a presença dos receptores estrogênicos em localizações específicas do encéfalo aviário, os identifica como membros de uma rede neural complexa na regulação da expressão de comportamentos como o canto, territorialidade e agressividade dos machos (CANOINE *et al.*, 2007; FUSANI *et al.*, 2000).

As ações dos hormônios testosterona e 5 α -dihidrotestosterona, são mediadas pelo receptor de andrógenos, codificados pelo gene AR (GRINO; GRIFFIN; WILSON, 1990). Em aves, estas proteínas AR têm sido identificadas nas células somáticas e germinais testiculares, como também em núcleos cerebrais implicados no controle da

reprodução, tais como o núcleo pré-óptico medial, o núcleo estria terminal e o núcleo taeniae (FOIDART *et al.*, 1999; GONZÁLEZ-MORÁN, 2019; GRIFFIN *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2019; LAKAYE *et al.*, 1998; NASTIUKT; CLAYTON, 1994; OPAŁKA *et al.*, 2008). Nos machos, a atividade de hormônios androgênicos mediada por AR regula os processos como a espermatogênese e a expressão de características sexuais secundárias (LESKA *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2018), demonstrando-se em camundongos sem expressão seletiva de AR o compromisso na expressão de comportamentos reprodutivos, como a motivação e o desempenho sexual (maior tempo na cópula) (RASKIN *et al.*, 2009). Em algumas espécies de aves os níveis plasmáticos de T apresentam relação positiva com a presença de proteínas AR (LESKA *et al.*, 2012), registrando-se em alguns táxons o aumento sinérgico de T e a presença de mRNA AR em temporada reprodutiva (KIEZUN *et al.*, 2015; NASTIUKT; CLAYTON, 1994).

Os sistemas de sinalização androgênica e estrogênica, assim como a esteroidogênese do estradiol nos diversos níveis do eixo HHG, são desconhecidos em aves Strigiformes Neotropicais. A Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) apresenta uma ampla distribuição no continente americano e atualmente é classificada em estado de conservação “*pouco ameaçado*” (BIRDLIFE, 2021). No sudeste do Brasil, a espécie apresenta maiores níveis séricos de E₂ e T na estação do inverno, coincidindo com a produção de espermatozoides (dados apresentados no Capítulo 4). Visando descrever a variação sazonal na expressão de proteínas reguladoras do eixo HHG em espécies de comportamento noturno, o presente capítulo avalia a expressão dos genes da aromatase (CYP19A1), receptores de estrógenos tipo alpha (ESR1) e tipo beta (ESR2) bem como de andrógenos (AR) em tecido testicular e encefálico de machos de *M. choliba*, coletados de vida livre durante a temporada reprodutiva e não-reprodutiva.

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Permissão ética

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fecundação In vitro, Clonagem e Transgenia Animal da Universidade de São Paulo – USP. As atividades e métodos aqui apresentados foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -USP processo

Nº 6896290419 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, autorização/licença processo Nº 70120-1. A captura dos indivíduos foi realizada pelo Prof. Dr. Luís Fábio Silveira da USP, que possui licença permanente para coleta de material zoológico (Nº 10013-1) com data da emissão 19/03/2007. O hipotálamo e ovário de uma fêmea foram providenciados pelo Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres - CeMaCAS, após da morte natural do indivíduo. Adicionalmente, esta pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado -SisGen NºAFF79E1.

8.2.2 Coleta de amostras

A temporada reprodutiva de *M. choliba* no Sudeste do Brasil tem sido registrada entre os meses de agosto e setembro, conforme já discutido no Capítulo 4 do presente documento. Considerando-se este período, foram capturados quatro machos durante a fase não-reprodutiva (maio/2021) e outros quatro machos durante a fase reprodutiva (setembro/2021). Os indivíduos foram coletados nos municípios de Cotia (23°37'28.0"S 46°57'57.9"W) e Tremembé (22°57'35.5"S 45°35'42.6"W), localizados no estado de São Paulo, Brasil. Imediatamente após o abate dos animais, amostras de até 100 mg de testículo e do encéfalo (descrito a continuação) foram armazenadas individualmente em tubos criogênicos de 2 mL, contendo 500 µL de solução RNA Later (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Do material encefálico, foi extraído um bloco contendo a região hipotalâmica, realizando um corte coronal no nível do trato septomesencefálico (borda rostral da área pré-óptica), e um segundo corte coronal nos nervos oculomotores (borda caudal do hipotálamo). Posteriormente, foram realizados outros dois cortes parasagittais a, aproximadamente, 2 mm lateral da linha média do encéfalo. Finalmente, um corte horizontal, a uma distância aproximada, de 2 mm foi realizado no nível superior ao assoalho do encéfalo. Como controle positivo nos ensaios qualitativos de PCR, foram utilizados tecidos do hipotálamo e ovário vitelogênico de uma fêmea que morreu em atividades anestésicas no CeMaCAS. Todas as amostras foram acondicionadas em gelo seco, transportadas e armazenadas no freezer a -80 °C.

8.2.3 Desenho de primers

Os genes a serem amplificados a partir de amostras de testículo e hipotálamo na espécie *M. choliba*, correspondem a: aromatase (CYP19A1), receptores de andrógenos

(AR) e receptores de estrógenos alpha e beta (ESR1 e ESR2). Os genes endógenos usados nos ensaios foram: fosfoglicerato quinase (PGK1) e tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase zeta (YWHAZ), escolhidos de acordo com os resultados publicados por Olias *et al.* (2014). Atualmente, o GenBank⁵ não contém a sequência dos genes de interesse, utilizando-se sequências com alta porcentagem de identidade reportados para as espécies de corujas *Athene cunicularia* e *Tyto alba*. Todos os pares de primers para os genes de interesse, exceto aqueles para o gene CYP19A1, foram projetados para abranger limites exon-exon identificados para as sequências de *A. cunicularia* no Ensembl⁶. Para a elaboração dos primers/oligos, o fragmento com maior porcentagem de identidade entre as sequências, foi exportado para o *software on-line* Primer-BLAST⁷, levando em consideração critérios como a temperatura de fusão (52-62°C), comprimento do primer (20-22 nucleotídeos), porcentagem relação entre guanina-citosina (45-60%) e comprimento do amplicon (< 200 pares de bases). Cada sequência de primer foi analisada no Nucleotide Blast, procurando-se uma alta similaridade com outras sequências registradas para aves (*megablast birds taxid: 8782*), descartando-se a possibilidade de amplificar genes diferentes aos alvos ou de apresentar *Cross Primer Dimers*. Finalmente, foram solicitados ao provedor Exxtend (São Paulo, Brasil) a elaboração dos oligos purificados por coluna de fase reversa (RP-OPC).

8.2.4 Isolamento ou extração de RNA

Até 100 mg de amostra de tecido hipotalâmico e testicular foram fragmentadas individualmente com pistilo num almofariz acondicionado em nitrogênio líquido, utilizando-se material esterilizado para cada amostra. O RNA foi extraído por meio da utilização do RNA mini kit Pure Link™ (Invitrogen, Carlsbad, EUA) associado ao tratamento com Trizol, conforme as especificações do fabricante. Sucintamente, o tecido macerado foi transferido para um tubo cônico contendo 1 mL de Trizol (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A mistura ficou incubando por 5 min à temperatura

⁵ Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁶ Disponível em <http://www.ensembl.org/index.html>

⁷ Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e agitado em vórtex por 15 s. A mistura foi incubada novamente por 3 min à temperatura ambiente e finalmente centrifugada a 12.000 g por 15 min à 4°C. A fase clara foi transferida a um novo tubo cônico, adicionando-se um volume equivalente de etanol 70% (v/v), obtendo uma solução final com etanol 35% (v/v). Na sequência, alíquotas de até 700 μ L da solução foram transferidas para um tubo cônico contendo um filtro (*Spin Cartridge*), centrifugando-se por 15 s (12.000g) em temperatura ambiente; seguido da lavagem do filtro com 350 μ L de *Wash Buffer I* e centrifugados novamente por mais 15 s (12.000g).

Os traços de DNA foram removidos por tratamento com DNase usando PureLink™ DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após as lavagens com solução *Buffer I* e solução *Buffer II*, o filtro foi transferido para um novo tubo cônico, onde foram adicionados 30 μ L de água RNase *free*. Este tubo foi incubado durante 1 min, e posteriormente centrifugado por 2 min (12.000 g). Uma alíquota de 1 μ L foi utilizada para determinar a concentração e a qualidade do RNA no espectrofotômetro NanoDrop ND-1 (Thermo Scientific). As leituras foram registradas com comprimento de onda de 260/280 nm, sendo considerados adequados valores entre 1,9 e 2,2. De acordo com a concentração do RNA de cada amostra, foram utilizados até 2000 ng de RNA para a síntese de cDNA. O material sobranete, foi imediatamente armazenado a -80°C.

8.2.5 Síntese de DNA complementar - cDNA

A reação de transcrição reversa foi sintetizada utilizando o kit Superscript VILO cDNA Synthesis seguindo as etapas de incubação de acordo as instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Posteriormente, o cDNA foi quantificado utilizando Qubit dsDNA BR e Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) e diluído para 2 μ g/mL.

8.2.6 Identificação, purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

A avaliação da expressão gênica qualitativa de CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2 foi realizada por PCR convencional. Para este fim, 50 ng de cDNA de amostras de hipotálamo, ovário e testículo reprodutivo e não-reprodutivo, foram tratadas com o kit Go Taq G2 DNA Polymerase (Promega, Madison USA) e submetidas aos ciclos de amplificação em termociclador (40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por

30 segundos e 72°C por 30 segundos). O controle negativo consistiu na reação em ausência de cDNA e maior volume de H₂O RNA *free*. Posteriormente, produtos de PCR junto a um marcador de peso molecular 1 Kb (SYBR, Safe DNA gel stain, Invitrogen, Thermo Fisher) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1% p/v em 0,5 X TAE), com avaliação em transluminador com luz UV (MultiDoc-It™ 125 Imaging System, Upland, CA, USA). Uma vez visualizadas as bandas, estas foram cortadas, pesadas e armazenadas em tubos cônicos. Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados com o kit PureLink Quick Gel extraction purification (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo as instruções do fabricante, confirmando-se finalmente a qualidade e concentração das amostras no espectrofotômetro.

Os produtos de PCR foram sequenciados nas duas direções pelo método Sanger, nas instalações do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, no Instituto de Biociências – USP. Para este fim, foram avaliadas 5 µL da amostra purificada na concentração de 10 ng/µL, enriquecida com 2,5 µL do respectivo primer (forward ou reverse) a 5 µM. As sequências foram editadas no CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Austrália) e comparadas com as sequências disponíveis para corujas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando o *software* BLAST-N e o algoritmo Megablast.

8.2.7 Quantificação relativa da expressão gênica

Para a expressão gênica quantitativa dos genes CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2 dos machos de *M. choliba* foram realizadas reações de qPCR (do inglês *quantitative real time PCR*) usando o kit SYBR qPCR GreenER Supermix Universal (Thermo Fisher Scientific), em triplicatas amostrais. As amostras foram levadas ao termociclador Mastercycler ep realplex Thermal Cycler (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), nas condições de: 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados de qPCR foram analisados pelo procedimento MIXED do programa SAS System for Windows 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA) como descrito por Steibel et al. (2009).

8.3 RESULTADOS

Este trabalho foi conduzido utilizando-se tecidos testicular e hipotalâmico de corujas da espécie *M. choliba*. Para este tipo de amostras, foram desenhados dois pares de primers com o objetivo de amplificar os genes CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2, descritos no Quadro 8-1. Adicionalmente, foram desenhados os primers dos genes endógenos PGK1 e YWHAZ.

Quadro 8-1 – Descrição dos primers desenhados e utilizados em tecidos gonadal e hipotalâmico da Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*)

Alvo	Primer	Sequência (5'→3')	Nº de Bases	Produto
Gene Aromatase (CYP19A1)	ARO-Forward	CCATTTGGATTTGGCCCTCG	20	98 pb
	ARO-Reverse	TGTA CTCTGCACCGTCTCAG	20	
Gene Receptor de andrógenos (AR)	AR-Forward	TTGCCAAGGATCTGCATCAGT	21	87 pb
	AR-Reverse	TCRCGGCCATCATTCAGGG	20	
Gene Receptor de estrógenos tipo 1 (ESR1)	E1-Forward	ATTGGCTTAGTCTGGCGCTC	20	150 pb
	E1- Reverse	CATCATGCGAAA YCGAGCAG	21	
Gene Receptor de estrógenos tipo 2 (ESR2)	E2-Forward	TGGGGTCTGGTCATGTGAAG	20	94 pb
	E2- Reverse	CGTGCATTGATTGGTAGCTGG	21	
Gene PGK1	PGK1-Forward	AGGCAGAGAAGAACGGTGTG	20	153 pb
	PGK1-Reverse	TCTTCACACTTTCAGGGCCG	20	
Gene YWHAZ	YWHAZ-F	GAGCCCGTAGGTCATCTTGG	20	180 pb
	YWHAZ-R	CTGCTTGCGAAGCATTAGGG	20	

Em vermelho, as bases degeneradas com bases G ou A naquela posição R; e bases C ou T na posição Y.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Os fragmentos genômicos amplificados no PCR convencional, produziram bandas esperadas inferiores aos 100 pb para os genes CYP19A1, AR e ESR2, e uma banda de aproximadamente 150 pb, para o gene ESR1 (Figura 8-1). No gel de agarose, os transcritos expostos a luz UV apresentam uma única banda, as quais foram cortadas e purificadas para o sequenciamento de nucleotídeos descritos no Quadro 8-2.

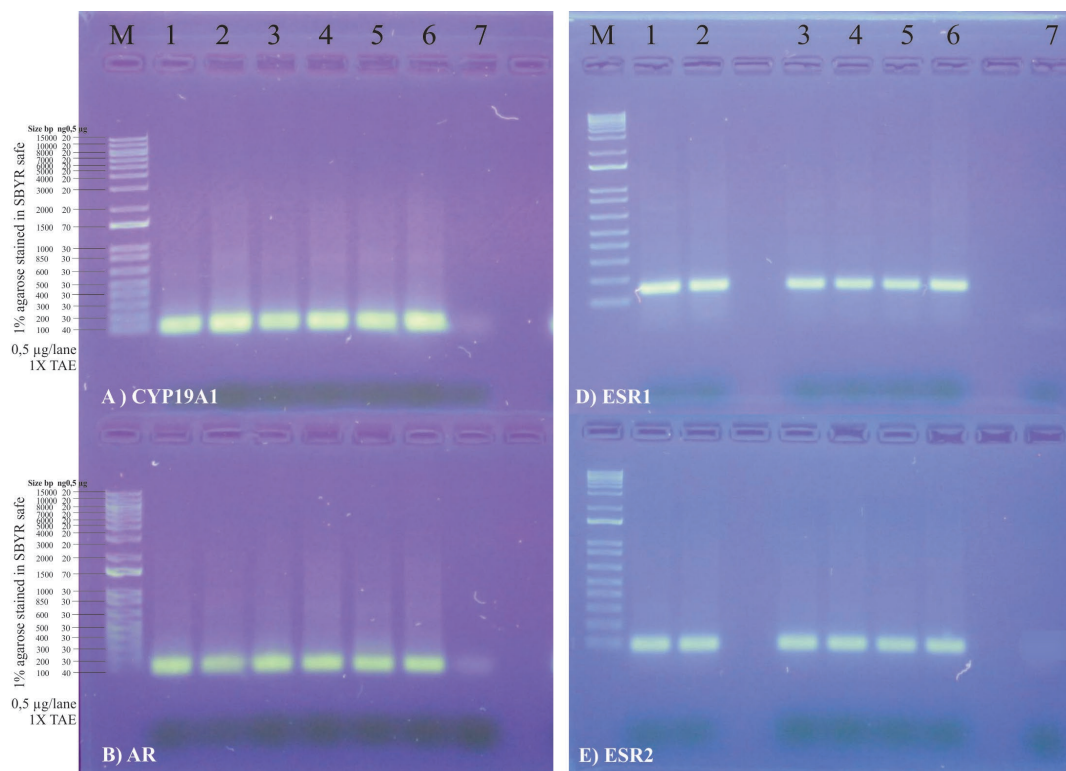


Figura 8-1 – Perfis eletroforéticos de cDNA dos genes CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2 de *Megascops choliba* em gel de agarose a 1% em TAE 1X. M corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb (SYBR, Safe DNA gel stain, Thermo Fisher). As amostras 1 e 2 correspondem aos cDNA sintetizados a partir das amostras de RNA obtidas do ovário e hipotálamo de uma fêmea. Amostras 3 e 4 correspondem ao testículo e hipotálamo de macho não reprodutivo; 5 e 6 testículo e hipotálamo de macho reprodutivo, 7 controle negativo: reação PCR realizada em ausência de cDNA.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Quadro 8-2 – Sequência dos produtos PCR purificados das amostras de tecido de corujas

ID Amostra	Sequência de Nucleotídeos	Nº bases
S-CYP19A1-F	ATTGCATGGTATGATGAAGCATTCTGGTGA CTCTT CTGAGACGGTGCAGAGTACAA	56
S-CYP19A1-R	TCATTACCATGGCATAACTTTCCTACACAGCCCCG AGGGCCAAATCCAAATGGA	54
S-AR-F	TATGGTGAGCGTGGACTACCCTGAATGATGGCCG AGATCATCTCTGTGCAGGTTCCCAAGATCCTGTCT GGAA	73
S-AR-R	TGATGCAGATCCTTGGCAAAGGATGACTTTTCCCG ACGGGATCTTGGGAACCTGCACA	58
S-ESR1-F	TATTACTGGACAGGAATCAAGGGAAATGTGTAGA GGGCATGGTGGAAATCTTTGACATGCTGCTGGCT ACTGCTGCTCGATTTTCGCATGATGAAGAGT	98
S-ESR1-R	ACATTTCCCTTGATTTCCTGTCCAGTAATAGGTTAG GTGCAAATAAAAGCTTTCCTGGGTGTTCCATGGA GCGCCAGACTAAGCCAATAAAGGGG	94
S-ESR2-F	AACGATTACATCTGCCAGCTACCAATCAATGCA CGATAGACAACAACAGGCGCAAAAGCTGCCAGG CATGCCGGCTACGGAAATGTTA	89
S-ESR2-R	CTTGCAGCCTTCACATGACCAGACCCCAATCAAT GCACGTGAAGCATAGTCACTGCAGACTGCA	65

S: Sequência; F: Primer Forward; R: Primer Reverse.

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

A porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos produto dos purificados de PCR de *M. choliba* e as sequências disponíveis para *Tyto alba* e *Athene cunicularia*, apresentam valores maiores ao 89,50%. Na Quadro 8-3 apresenta-se o alinhamento das sequências produtos dos purificados do PCR e *A. cunicularia*, mostrando-se a porcentagem de identidade e de *gaps* entre as sequências.

Quadro 8-3 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos obtidas dos produtos purificados do PCR de *Megascops choliba* e as sequências disponíveis no NCBI para *Athene cunicularia*

Sequência ID	Alinhamentos	Identidade	Valor E	Gaps	
S-CYP19A1-F (<i>M. choliba</i>) 1	ATTG-CATGGT-ATGATG-AAGC-ATTCTGGTGACTCTTCTGAGACGGTGCAGAGTACA	55	55/59 (93%)	4 e-16	4/59 (6%)
CYP19A1 (<i>A. cunicularia</i>) 1339	ATTGCCATGGTAATGATGAAAGCAATTCTGGTGACTCTTCTGAGACGGTGCAGAGTACA	1397			
S-CYP19A1-R (<i>M. choliba</i>) 1	TCATTACCATGGCA-T-AACTTTCCTACACAGCCCGAGGGCCAAATCCAAATGG	53	53/55 (96%)	9 e-18	2/55 (3%)
CYP19A1 (<i>A. cunicularia</i>) 1354	TCATTACCATGGCAATAAACTTTCCTACACAGCCCGAGGGCCAAATCCAAATGG	1300			
XM 026856235.1					
S-AR-F (<i>M. choliba</i>) 1	TATGGTGAGCGTGGACTACCCTG-AATGATGGCCGAGATCATCTGTGCAGGTTCCCAA	59	73/74 (99%)	8 e-30	1/74 (1%)
AR (<i>A. cunicularia</i>) 1779	TATGGTGAGCGTGGACTACCCTGAAATGATGGCCGAGATCATCTGTGCAGGTTCCCAA	1838			
S-AR-F (<i>M. choliba</i>) 60	GATCCTGTCTGGAA	73			
AR (<i>A. cunicularia</i>) 1839	GATCCTGTCTGGAA	1852			
S-AR-R (<i>M. choliba</i>) 24	TGACTTTTCCGACAGGATCTTGGGAACCTGCACA	58	33/35 (94%)	2 e-07	0/35 (1%)
AR (<i>A. cunicularia</i>) 1858	TGACTTTTCCGACAGGATCTTGGGAACCTGCACA	1824			
XM 026848834.1					
S-ESR1-F (<i>M. choliba</i>) 1	TATTACTGGACAGGAATCAAGGGAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAAATCTTTGACATGC	60	93/94 (99%)	3 e-41	0/94 (0%)
ESR1 (<i>A. cunicularia</i>) 1305	TATTACTGGACAGGAATCAAGGGAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAAATCTTTGACATGC	1364			
S-ESR1-F (<i>M. choliba</i>) 61	TGCTGGCTACTGCTGCTCGATTTCCGATGATGAA	94			
ESR1 (<i>A. cunicularia</i>) 1365	TGCTGGCTACTGCTGCTCGATTTCCGATGATGAA	1398			
S-ESR1-R (<i>M. choliba</i>) 1	ACATTTCCCTTGATTCCTGTCCAGTAATAGGTTAGGTGCAAATAAAAGCTTTCCTGGGTG	60	86/87 (99%)	2 e-37	0/87 (0%)
ESR1 (<i>A. cunicularia</i>) 1333	ACATTTCCCTTGATTCCTGTCCAGTAATAGGTTAGGTGCAAATAAAAGCTTTCCTGGGTG	1274			
S-ESR1-R (<i>M. choliba</i>) 61	TTCCATGGAGCGCCAGACTAAGCCAAT	87			
ESR1 (<i>A. cunicularia</i>) 1273	TTCCATGGAGCGCCAGACTAAGCCAAT	1247			
XM 026845948.1					
S-ESR2-F (<i>M. choliba</i>) 1	AACGATTACATCTGCCAGCTACCAATCAATGCACGATAGACAAACAAGCGCAAAAAGC	60	88/89 (99%)	1 e-38	0/89 (0%)
ESR2 (<i>A. cunicularia</i>) 651	AACGATTACATCTGCCAGCTACCAATCAATGCACGATAGACAAACAAGCGCAAAAAGC	710			
S-ESR2-F (<i>M. choliba</i>) 61	TGCCAGGCATGCCGGCTACGGAAATGTTA	89			
ESR2 (<i>A. cunicularia</i>) 711	TGCCAGGCATGCCGGCTACGGAAATGTTA	739			
S-ESR2-R (<i>M. choliba</i>) 1	CTTTGCAGCCTTACATGACCAGACCCCAATCAAT-GCA-CGTGAAGCATAGTCACTGCA	58	60/67 (90%)	2 e-15	4/67 (5%)
ESR2 (<i>A. cunicularia</i>) 621	CTTTGCAGCCTTACATGACCAGACCCCA-T- AGTGGTATCCTGAAGCATAGTCACTGCA	564			
S-ESR2-R (<i>M. choliba</i>) 59	GACTGCA	65			
ESR2 (<i>A. cunicularia</i>) 563	GACTGCA	557			
XM 026849548.1					

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

Finalmente, a Figura 8-2 contém os dados obtidos do qPCR para cada gene avaliado, registrando-se os valores de *p* obtidos na análise estatística comparando a expressão gênica entre os machos reprodutivos e não-reprodutivos. A eficiência de amplificação da qPCR dos genes avaliados, apresentaram valores entre 95 e 105% e coeficientes de correlação maiores a 0,99 (CYP19A1: 0,98, R²: 0,99; AR:1,09, R²: 0,99; ESR1: 0,95, R²: 0,99; ESR2: 0,95, R²: 0,99).

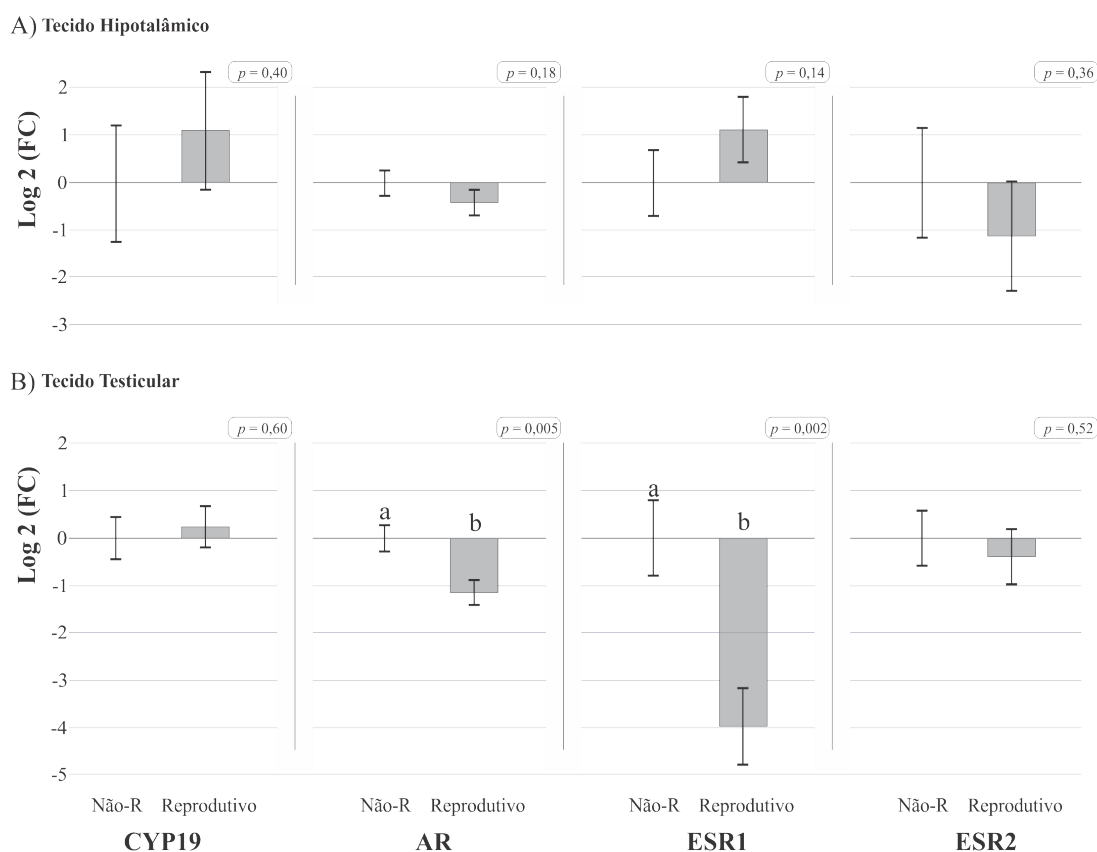


Figura 8-2 – Expressão gênica relativa de CYP19, AR, ER1 e ER2. A) amostras de tecido hipotalâmico e B) tecido testicular de machos de Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*). Os resultados são apresentados como média ± SEM. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, indicando-se com as letras a b. Valores expressos em \log_2 (FC). FC = *Fold Change*. Não-R = grupo não-reprodutivo (n = 4). Reprodutivo (n = 4).

Fonte: Barbosa-Moyano (2022)

8.4 DISCUSSÃO

São apresentados dados inovadores da expressão sazonal de genes que codificam a síntese da aromatase e receptores de esteroides sexuais no tecido hipotalâmico e testicular de corujas (*Megascops choliba*). Nas gônadas masculinas foi confirmado um maior número de transcritos para os genes de AR e ESR1 durante a temporada não-reprodutiva, enquanto os transcritos dos genes CYP1A1 e ESR2 não apresentaram diferença entre os estados reprodutivos. Os transcritos avaliados no tecido hipotalâmico não apresentaram diferença no número de cópias entre os tratamentos.

Ao se trabalhar com animais silvestres e realizar a coleta dos tecidos em seu ambiente natural, o risco de contaminação e/ou degradação do material gênico aumenta, sendo obrigatório um protocolo de manipulação, preservação e transporte das amostras

que preveja a conservação das ligações entre os nucleotídeos (BUSTIN *et al.*, 2009). Os métodos aqui apresentados demonstraram ser efetivos para a manipulação e obtenção de RNA de ótima qualidade, sendo possível a sínteses de cDNA de origem gonadal e encefálico das corujas, necessário nas reações de PCR aqui implementadas.

O desenho dos primers a partir de fragmentos de sequências com alta porcentagem de identidade publicadas para outras espécies de corujas permitiram a obtenção de transcritos de CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2 em *M. choliba*. Entre os motivos do êxito desta metodologia, deve-se considerar a conservação evolutiva de suas sequências, por exemplo, a conservação nos domínios de ligação ao DNA (DBD) e domínio de ligação ao ligante (LBD) nas sequências de receptores de esteroides (O'DONNELL *et al.*, 2001; SCHUPPE; MILES; FUXJAGER, 2020; YU *et al.*, 2018). Os métodos de PCR convencional permitiram a visualização dos transcritos tanto no tecido gonadal (ovário e testículo) como no encefálico das corujas em estudo. A presença destes transcritos em diferentes tecidos do eixo HHG tem sido previamente reportada em outras espécies de aves como passeriformes (FUXJAGER; SCHUPPE, 2018), anseriformes (LESKA *et al.*, 2012, 2015) e galiformes (CORNIL *et al.*, 2006; KIEZUN *et al.*, 2015).

A alta porcentagem de identidade entre as sequências obtidas dos purificados do PCR com as sequências disponíveis para outras espécies de corujas, confirma a especificidade dos métodos moleculares aqui implementados. Como mencionado anteriormente, os genes estudados apresentam uma alta taxa de conservação, pelo que altos índices de identidade eram esperados. Adicionalmente e devido à relação filogenética destas espécies de corujas (WINK *et al.*, 2009; WINK; SAUER-GURTH, 2021), se sugere a homologia entre os transcritos.

A eficiência de amplificação da qPCR para os genes aqui avaliados e seus respectivos coeficientes de correlação, encontra-se entre os valores aceitos na literatura (ZHANG *et al.*, 2021). Com a finalidade de diminuir o viés na normalização dos dados obtidos do qPCR (BUSTIN *et al.*, 2009), a presente pesquisa considerou o uso dos genes PGK1 e YWHAZ de acordo aos resultados publicados por Olias *et al.* (2014), onde a expressão destes genes mostrou-se estável em hipotálamo, pituitária e gônadas de 420 gansos avaliados. Na avaliação de tecidos do eixo reprodutivo das aves, também é sugerido o uso de genes de referência como ACTB e HPTR1 (OLIAS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2021). No entanto, na espécie em estudo, o desenho do primer para ACTB apresentava alta porcentagem de identidade com sequencias de outros genes

registrados para aves. Os primers para amplificar HPTR1 foram desenhados e usados num PCR a modo de teste, porém, o transcrito não apresentou uma banda uniforme no tecido testicular (dados não apresentados).

Os níveis plasmáticos de E_2 funcionam sinergicamente com os de T para promover as atividades reprodutivas dos machos, reconhecendo-se o sistema aromatase como um interruptor “liga/desliga” da espermatogênese em algumas espécies de aves cuja reprodução é sazonal (ROSATI *et al.*, 2019, 2021). Em algumas espécies de aves, têm sido registrados níveis maiores de E_2 no tecido testicular se comparados com o meio plasmático (CARREAU *et al.*, 2003; LESKA *et al.*, 2015), identificando-se a presença da aromatase nas células de Leydig, células germinativas e inclusive espermatozoides (CARREAU *et al.*, 2011; ROSATI *et al.*, 2019). Em *Coturnix coturnix*, a atividade sinérgica entre aromatase, E_2 e T regulam tanto eventos mitóticos quanto meióticos da espermatogênese na temporada reprodutiva (ROSATI *et al.*, 2019). No Capítulo 4 do presente documento foi apresentado a diferença sazonal na produção de E_2 sérico, encontrando-se maiores níveis durante a estação reprodutiva dos machos de *M. choliba*. Era esperado, portanto, que os testículos reprodutivos apresentassem maior número de transcritos de CYP19A1, porém a diferenciação sazonal para este gene não foi confirmada. Em outras espécies de aves passeriformes, têm sido descritas fontes extra gonadais de aromatase (FORLANO; SCHLINGER; BASS, 2006). Para uma avaliação mais detalhada em coruja, recomenda-se a avaliação gênica de outros tecidos (ex. glândula adrenal) em conjunto com análises de imunohistoquímica no nível gonadal.

A expressão dos transcritos de AR foi maior no testículo de corujas não-reprodutivas, similar aos resultados obtidos em gansos de reprodução sazonal (LESKA *et al.*, 2012). Este resultado difere dos achados em outras espécies, incluindo mamíferos, onde foi registrado um maior número de transcritos mRNA AR em temporada reprodutiva (KIEZUN *et al.*, 2015; NASTIUKT; CLAYTON, 1994). Possivelmente, o alto número de transcritos de AR presentes na estação não-reprodutiva das corujas seja inativado por modificações pós-transcricionais (ex. fosforilação e acetilação)(COFFEY; ROBSON, 2012). Adicionalmente, deve considerar-se a expressão sazonal de cofatores de sinalização androgênica. Entre os cofatores repressores na estação não reprodutiva das corujas, deve-se considerar o NCOR1 o qual recruta fatores de remodelação da cromatina como as histonas desacetilases [HDACs], tornando o DNA inacessível para transcrição (FUXJAGER; SCHUPPE, 2018). Ou

talvez, considerar a presença de cofatores ativadores na estação reprodutiva das corujas, por exemplo o SRC-1 que podem aumentar a capacidade de sinalização recrutando fatores que aumentam a transcrição (FUXJAGER; SCHUPPE, 2018). Outra possibilidade é a regulação negativa dos níveis de T e a expressão de RNAm AR (GONZÁLEZ-MORÁN *et al.*, 2008; LESKA *et al.*, 2015). Apesar de não se ter quantificado os níveis de T nas corujas do estudo (janela curta do tempo para a coleta dos indivíduos em vida livre), *M. choliba* apresentou altos níveis de T na temporada reprodutiva (dados apresentados no Capítulo 4). Em condições experimentais realizadas com camundongos foi evidenciado que a administração de T regula negativamente a expressão do gene AR no epidídimo e cérebro, aumentando os níveis deste transcrito quando os níveis de andrógenos diminuem após da castração dos machos (QUARMBY *et al.*, 1990). Em aves, a administração de flutamida (antiandrogênio acetanilídico não-esteróide) reprime os níveis de mRNA AR no rim, mas gera indução no fígado, indicando que o andrógeno regula seu receptor de maneira específica para o tecido (NASTIUKT; CLAYTON, 1994). Finalmente, os sistemas de sinalização androgênica apresentam uma grande variedade entre os tecidos e espécies, inclusive no nível intraespecífico (ex. *Manacus vitellinus*), indicando uma evolução no nível molecular que pode ser explicada pela Hipótese do Potencial Evolutivo (FUXJAGER; SCHUPPE, 2018).

Nos processos de espermatogênese, a presença de proteínas receptoras ER α e ER β e, por sua vez, os genes que os transcrevem (ESR1 e ESR2), são fundamentais para mediar a atividade dos hormônios estrogênicos. Nas células germinativas testiculares, a sinalização dos receptores ER α pelos esteróides promove as atividades mitóticas e inibe a apoptose celular (CHIMENTO *et al.*, 2014; O'DONNELL *et al.*, 2001) Já a sinalização dos receptores ER β nas células mióides peritubulares, tem sido associada, por exemplo, à produção de fatores parácrinos que regulam a função das células de Sertoli (PEARL; MASON; ROSER, 2011). Em gansos, a expressão das proteínas e genes que codificam para ESR1 e ESR2 no tecido testicular é maior no estado não reprodutivo (LESKA *et al.*, 2015), em parte similar aos achados em *M. choliba*. Estes resultados indicam a regulação negativa entre a expressão de genes/proteínas dos receptores de estrógenos no tecido gonadal e os níveis de estradiol (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em condições experimentais, com a administração de doses excessivas de estrógenos em roedores registra-se alterações fisiológicas como os distúrbios na diferenciação das células germinativas, aumento na incidência de anormalidades

espermáticas, capacitação prematura dos espermatozoides, aumento no número de células apoptóticas (DED *et al.*, 2013; STRAUSS *et al.*, 2009). Estas anormalidades no tecido testicular sugerem que a expressão de receptores de estrógenos desempenham um importante papel regulador na diminuição da sensibilidade do tecido testicular aos estrogênios durante a época reprodutiva, quando a concentração de E₂ é maior (LESKA *et al.*, 2015).

Na procura de um melhor entendimento da manifestação dos comportamentos dos indivíduos, são propostas várias hipóteses de mecanismos genéticos e não-genéticos da regulação dos esteroides no tecido nervoso (CHIMENTO *et al.*, 2014). Em *Melospiza melodia morphna*, (WACKER *et al.*, 2010) descreve que os comportamentos agressivos são dependentes das sínteses de E₂ ao detectar uma variação nas sínteses de CYP19A1 nos núcleos hipotalâmicos (ex. área pré-óptica) de acordo ao estado fisiológico dos machos (muda, reprodutivo e não-reprodutivo); no entanto, não foi comprovada uma diferença sazonal na expressão de ESR1 e ESR2. Numa espécie de ave neotropical (*Hylophylax naevioides*), com expressão de comportamento agressivo durante todo o ano, a expressão de mRNA de ESR1 na área pré-óptica e de mRNA AR no núcleo taenia foram maiores durante a estação não-reprodutiva, em presença de níveis baixos de T (CANOINE *et al.*, 2007). Em canários machos, Fusani *et al.* (2000) informam que a espécie não apresenta uma variação sazonal dos transcritos de AR no HVc, mesmo confirmando a temporada reprodutiva dos indivíduos com o aumento dos níveis plasmático de T. Nos tecidos hipotalâmicos aqui avaliados, não foi confirmada uma diferença sazonal nos transcritos de CYP19A1, AR, ESR1 e ESR2, devido talvez a características comportamentais da espécie que, em ambiente natural, é denominada por alguns autores como uma espécie territorial durante todo o ano (MOTTA-JUNIOR; BRAGA, ROCHA; GRANZINOLLI, 2017). No entanto, para confirmar esta teoria, aconselha-se a implementação de métodos de maior precisão para a extração do material gênico de amostras (ex. micropunch), onde se avalie a expressão dos transcritos por núcleos hipotalâmicos, acompanhados do estudo comportamental dos indivíduos no seu ambiente natural, como os estudos comportamentais realizados na coruja *Megascops kennicottii* (HERTING; BELTHOFF, 1997). Adicionalmente, futuras pesquisas em aves de comportamento noturno, devem considerar os efeitos não-genômicos regulados pelos hormônios esteroides (CHIMENTO *et al.*, 2014), por exemplo, as vias de sinalização mediados por receptores extranucleares (ex. ERs) ou por receptores não-clássicos ligados à membrana (ex. GPR30/GPER). Atualmente, a descrição histológica dos

núcleos hipotalâmicos para a espécie *M. choliba*, está sendo realizada pelo autor do presente documento, com o objetivo de enriquecer os conhecimentos fisiológicos ainda pouco explorados em corujas.

8.5 CONCLUSÃO

A ação regulatória dos hormônios andrógenos e estrogênicos mediados pela sinalização de seus receptores mostra especificidade no nível de tecidual, com variação na quantidade de transcritos de acordo com o estado reprodutivo das corujas. O presente documento oferece uma primeira visão sobre os achados gênicos do eixo HHG em corujas, no entanto, no nível hipotalâmico, sugere-se a implementação de imunohistoquímica e micropunch, para uma comparação da presença dos receptores de esteroides detalhada entre os núcleos. No nível testicular, as corujas apresentam uma diferença sazonal nos transcritos ESR1 e AR, regulados negativamente, provavelmente, pelos níveis de testosterona.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados nesta tese confirmam a aplicabilidade da avaliação hormonal não invasiva ao validar diferentes imunoenaios para a quantificação de metabólitos de glicocorticoides (MGC), de estrógenos (ME) e de andrógenos (MA) presentes em amostras de fezes, tanto de machos como em fêmeas da espécie *M. choliba*. Também foram validados os EIA para detectar níveis serológicos de corticosterona, estrógeno e testosterona da espécie em estudo.

O uso de técnicas de imunoenensaio é comum nas pesquisas devido à facilidade na realização e pela pouca exigência de equipamentos. No entanto, o êxito destas técnicas depende de parâmetros como a sensibilidade do EIA e o tipo de matriz a ser avaliado (ex. soro, plasma, fezes ou saliva), sendo o teste de paralelismo fundamental ao avaliar não só a similaridade imunogênica, como também, para instaurar o protocolo de tratamento das amostras (ex. concentração do analito e/ou extração).

Diante das condições experimentais descritas e com base nos resultados obtidos, os valores de MGC mostraram diferenças significativas para cada coruja, sendo confirmada estatisticamente a dependência respeito a hora de coleta das fezes (fotoperíodo) e a atividade comportamental, mas não quanto ao sexo.

Verificou-se que há diferentes traços do temperamento entre as corujas, confirmando-se a correlação positiva entre a concentração de MGC e o *score* de tímido para cada indivíduo.

A ausência de conhecimento e/ou informações referentes ao comportamento de uma espécie limita a possibilidade de atender às suas necessidades em cativeiro o que pode resultar em prejuízos do bem-estar dos animais. A fim de preencher estas lacunas, a presente pesquisa também propõe um etograma para a Corujinha-do-mato mantida em condições de cativeiro, esperando seja útil no estabelecimento de futuros estudos endócrino comportamentais de rapinantes noturnos.

Em condições de cativeiro, os animais silvestres são expostos a estímulos com potencial para sobrecarregar os sistemas alostáticos, confirmando-se na presente tese que a exposição acústica que simula o ambiente hospitalar de um centro de triagem gera alterações endócrinas e imunológicas individuais nas corujas. Estes resultados sugerem que algumas corujas possam ser mais suscetíveis às respostas externas que ocorrem rotineiramente no cativeiro.

Como foi mencionado no corpo deste documento, o estresse gera uma resposta multisistêmica nos indivíduos, sendo necessário uma abordagem integrativa que inclua o estudo comportamental, endócrino e imunológico dos animais.

Os machos de corujas avaliados em condições de cativeiro, apresentaram espermatogênese sazonal, coincidindo com o pico sérico de testosterona. Pode-se concluir que machos de *M. choliba* no Sudeste do Brasil apresentam sazonalidade reprodutiva, sendo ativa nas condições de inverno do São Paulo.

Os níveis serológicos de estradiol para as quatro fêmeas aqui avaliadas apresentaram uma variabilidade individual sem registro de eventos de postura.

Ao se investigar a sazonalidade reprodutiva dos animais deve-se considerar que os eventos reprodutivos são apresentados numa janela de tempo determinada, a qual nem sempre é compatível com a duração de um doutorado; motivo pelo qual a programação do projeto é fundamental para realizar ensaios testes prévios à coleta definitiva, além do cumprimento dos quesitos protocolares (ex. SISBIO) requeridos em estudos que envolvem espécies silvestres.

O presente estudo trouxe um marco que aponta para a necessidade de novas pesquisas moleculares do eixo HHG em corujas, pois fica demonstrado que os dados referentes a reprodução sazonal de rapinantes de comportamento noturno são escassos.

A ação regulatória dos hormônios andrógenos e estrogênicos mediados pela sinalização de seus receptores (AR e ESR1) mostra especificidade no nível testicular, com variação na quantidade de transcritos de acordo com o estado reprodutivo das corujas.

De modo geral, os dados aqui apresentados contribuíram para o conhecimento dos processos alostáticos e reprodutivos até hoje pouco estudados em corujas neotropicais.

REFERÊNCIAS

- AIRE, T. A.; GEORGE, S.; INDIES, W. **Spermatogenesis and spermiogenesis , birds**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 6313–320 p.
- AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 91–93, 2018.
- ALBRECHT, U. Circadian clocks in mood-related behaviors. **Circadian clocks**, p. 227–239, 2013.
- ALTMANN, J. Observational Study of Behavior : Sampling Methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3, p. 227–267, 1974.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- AMIR, D.; BRAUN-EILON, B.; SCHINDLER, H. Passage and disappearance of labelled spermatozoa in the genital tract of the male Japanese quail in segregation or cohabitation. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 13, n. 3, p. 321–328, 1973.
- ANDREASSON, U.; PERRET-LIAUDET, A.; VAN WAALWIJK VAN DOORN, L. J. C.; BLENNOW, K.; CHIASSERINI, D.; ENGELBORGHES, S.; FLADBY, T.; GENC, S.; KRUSE, N.; KUIPERIJ, H. B.; KULIC, L.; LEWCZUK, P.; MOLLENHAUER, B.; MROCZKO, B.; PARNETTI, L.; VANMECHELEN, E.; VERBEEK, M. M.; WINBLAD, B.; ZETTERBERG, H.; KOEL-SIMMELINK, M.; TEUNISSEN, C. E. A practical guide to immunoassay method validation. **Frontiers in Neurology**, v. 6, n. Aug, p. 1–8, 2015.
- ANDREWS, J. E.; SMITH, C. A.; SINCLAIR, A. H. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, n. 2, p. 182–190, 1997.
- ANTHONY, R. G.; BUSS, I. O. Relationship of gonadal recrudescence and testicular melanogenesis in California Quail. **The condor**, v. 76, n. 4, p. 452–457, 1974.
- ARLETTAZ, R.; NUSSLÉ, S.; BALTIC, M.; VOGEL, P.; PALME, R.; JENNI-EIERMANN, S.; PATTHEY, P.; GENOUD, M. Disturbance of wildlife by outdoor winter recreation: Allostatic stress response and altered activity-energy budgets. **Ecological Applications**, v. 25, n. 5, p. 1197–1212, 2015.
- AWAD, A.; KHALIL, S. R.; ABD-ELHAKIM, Y. M. Molecular phylogeny of some avian species using Cytochrome b gene sequence analysis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 2, p. 218–222, 2015.
- BALL, G. F. The neural integration of environmental information by seasonally breeding birds. **American Zoologist**, v. 33, n. 2, p. 185–199, 1993.
- BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. **Physiology & behavior**, v. 83, n. 2, p. 329–346, 2004.
- BALL, G. F.; KETTERSON, E. D. Sex differences in the response to environmental cues regulating seasonal reproduction in birds. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1490, p. 231–246, 2008.

- BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; BALL, G. F. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 79, n. 1–5, p. 261–277, 2001.
- BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; CHARLIER, T. D. Calcium-dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1591–1606, 2003.
- BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; CORNIL, C. A.; BALL, G. F. Preoptic aromatase modulates male sexual behavior : slow and fast mechanisms of action. **Physiology & behavior**, v. 83, n. 2, p. 247–270, 2004.
- BARBOSA-MOYANO, H.; NOGUEIRA-FILHO, GAMA, L, S.; NOGUEIRA, M, R.; NOGUEIRA, S. S. C. Non-invasive stress monitoring and temperament of chestnut-bellied seed- finch (Passeriformes , Thraupidae). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 220, p. 104859, 2019.
- BARBOSA-MOYANO, H.; SILVA, R. R. L.; PINILLA, RAMÍREZ PATRICIA, M. Validation of an enzyme immunoassay for the quantification of testosterone in green iguana males (*Iguana iguana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 287, n. 1, p. 113343, 2020.
- BARROS, F. M.; MOTTA-JUNIOR, J. C. Home range and habitat selection by the Tropical Screech-Owl in a Brazilian savanna. **Journal of Raptor Research**, v. 48, n. 2, p. 142–150, 2014.
- BATEMAN, G. C.; BALDA, R. P. Growth, development, and food habits of young pinon jays. **The Auk**, p. 39–61, 1973.
- BELTHOFF, J. R.; DUFTY, A. M. Corticosterone , body condition and locomotor activity : a model for dispersal in screech-owls. **Animal Behaviour**, v. 55, n. 2, p. 405–415, 1998.
- BÉZIER, P.; KORNER-NIEVERGELT, F.; JENNI, L.; ROULIN, A.; ALMASI, B. Glucocorticoid levels are linked to lifetime reproductive success and survival of adult barn owls. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 33, n. 12, p. 1689–1703, 2020.
- BIELOHUBY, M.; POPP, S.; BIDLINGMAIER, M. A guide for measurement of circulating metabolic hormones in rodents: Pitfalls during the pre-analytical phase. **Molecular Metabolism**, v. 1, n. 1–2, p. 47–60, 2012.
- BIENBOIRE-FROSINI, C.; CHABAUD, C.; COZZI, A.; CODECASA, E.; PAGEAT, P. Validation of a commercially available enzyme immunoassay for the determination of oxytocin in plasma samples from seven domestic animal species. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. SEP, 2017.
- BIRDLIFE, I. Rusty-barred Owl, *Strix hylophila*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2016a.
- BIRDLIFE, I. Screech-owl Tropical, *Megascops choliba*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, v. 8235, 2016b.
- BIRDLIFE, I. Black-capped Screech-owl, *Megascops atricapilla*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2016c.

BIRDLIFE, I. Long-tufted Screech-owl, *Megascops sanctaecatarinae*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2016d.

BIRDLIFE, I. Long-tufted Screech-owl, *Megascops sanctaecatarinae*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2016d.

BIRDLIFE, I. Colombian Screech-owl, *Megascops colombianus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2016f.

BIRDLIFE, I. Tawny-bellied Screech-owl, *Megascops watsonii*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, v. 8235, 2018.

BIRDLIFE, I. Screech-owl, Santa Marta *Megascops gilesi*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, v. 8235, 2019.

BLACHE, D.; CLEEFF, J. K. Van; BLACKBERRY, M.; SHARP, P. J. Seasonality in emus (*Dromaius novaehollandiae*). In: **Avian Endocrinology**. India: Narosa Publishing House New Delhi, 2001.

BLANK, M. H.; OLIVEIRA, M. J. De; CUBAS, Z. S.; PEREIRA, R. J. G.; MORAES, W. De; MOREIRA, N. Fecal sex steroids and reproductive behaviors in harpy eagles (*Harpia harpyja*). **Zoo Biology**, v. 39, n. 5, p. 315–324, 2020.

BOISSIN, J.; ASSENMACHER, I. Circadian rhythms in adrenal cortical activity in the quail. **Biological Rhythm Research**, v. 1, n. 3, p. 37–41, 1970.

BOISSY, A. Fear and fearfulness in animals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 2, p. 165–191, 1995.

BÖTTNER, M.; THELEN, P.; JARRY, H. Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 245–251, 2014.

BOXALL, P. C.; LEINN, M. R. Time budgets and activity of wintering Snowy Owls (Presupuestos del Patrón de Actividades de *Nyctea scandiaca*). **Journal of Field Ornithology**, v. 60, n. 1, p. 20–29, 1989.

BRADSHAW, W. E.; HOLZAPFEL, C. M. Evolution of animal photoperiodism. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, p. 1–25, 2007.

BREMNER-HARRISON, S.; PRODOHL, P. A.; ELWOOD, R. W. Behavioural trait assessment as a release criterion : boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox (*Vulpes velox*). **Animal Conservation Forum**, v. 7, n. 3, p. 313–320, 2004.

BREUNER, C. W.; DELEHANTY, B.; BOONSTRA, R. Evaluating stress in natural populations of vertebrates : total CORT is not good enough. **Functional Ecology**, v. 27, n. 1, p. 24–36, 2013.

BREUNER, C. W.; WINGFIELD, J. C.; ROMERO, M. L. Diel rhythms of basal and stress-induced corticosterone in a wild, seasonal vertebrate, Gambel's white-crowned sparrow. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, n. 3, p. 334–342, 1999.

BROOM, D. M. A history of animal welfare science. **Acta Biotheoretica**, v. 59, n. 2, p. 121–137, 2011.

- BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem estar animal: conceito e questões relacionadas - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2004.
- BROWN, J.; PH, D.; WALKER, S.; STEINMAN, K.; ROYAL, F. Endocrine manual for reproductive non-domestic species. **Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park**, p. 12–85, 2005.
- BUSCH, D. S.; HAYWARD, L. S. Stress in a conservation context : A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. **Biological Conservation**, v. 142, n. 12, p. 2844–2853, 2009.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CABEZAS, S.; CARRETE, M.; TELLA, J. L.; MARCHANT, T. A.; BORTOLOTTI, G. R. Differences in acute stress responses between wild-caught and captive-bred birds : a physiological mechanism contributing to current avian invasions ? **Biological Invasions**, v. 15, n. 3, p. 521–527, 2013.
- CAMACHO-ARROYO, I.; GONZALEZ-ARENAS, A.; GONZALEZ-AGUERO, G.; GUERRA-ARAIZA, C.; GONZALEZ-MORAN, G. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. **Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 136, n. 2, p. 447–452, 2003.
- CANOINE, V.; FUSANI, L.; SCHLINGER, B.; HAU, M. Low sex steroids , high steroid receptors : Increasing the sensitivity of the nonreproductive brain. **Developmental Neurobiology**, v. 67, n. 1, p. 57–67, 2007.
- CANNON WB (1932) *The Wisdom of the Body*. WW **Norton & Company**, Inc, New York.
- CARERE, C.; GROOTHUIS, T. G. G.; MO, E.; DAAN, S.; KOOLHAAS, J. M. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities : daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 540–548, 2003.
- CARREAU, S.; BOIS, C.; ZANATTA, L.; SILVA, F. R. M. B.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen signaling in testicular cells. **Life Sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 584–587, 2011.
- CARREAU, S.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. **Advances in Medical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 31–36, 2012.
- CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANDE, C.; DENIS-, I.; BILINSKA, B.; BOURGUIBA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2003.
- CASSONE, V. M. Avian circadian organization: a chorus of clocks. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 76–88, 2014.

- CAVALLI, M.; BALADRÓN, A. V.; ISACCH, J. P.; D'AMICO, V.; BÓ, M. S. Leukocyte profiles and body condition of free-living burrowing owls (*Athene cunicularia*) from rural and urban areas in the argentinean pampas. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 26, n. 1, p. 45–51, 2018.
- CHAO, A.; SCHLINGER, B.; REMAGE-HEALEY, L. Combined liquid and solid-phase extraction improves quantification of brain estrogen content. **Frontiers in Neuroanatomy**, n. September 2011, 2016.
- CHAPARRO-HERRERA, S.; CÓRDOBA-CÓRDOBA, S.; LÓPEZ-ORDOÑEZ, J. P.; RESTREPO-CARDONA, J. S.; CORTES-HERRERA, O. The Owls of Colombia. In Neotropical Owls. **Springer, Cham**. p. 317-371. 2017.
- CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; BRILLARD, J. P.; FOSTIER, A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. **Animal**, v. 1, n. 3, p. 419–432, 2007.
- CHIMENTO, A.; SIRIANNI, R.; CASABURI, I.; PEZZI, V. Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus – pituitary – testis axis and spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, p. 1–8, 2014.
- CLAPP, J. B. **Avian urate spheres : A non-invasive method to biomonitor environmental pollution and stress in birds**. 2011. Newcastle University, 2011.
- CLULOW, J.; JONES, R. C. Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. **Journal of Reproductive Fertility**, v. 64, n. 2, p. 259–266, 1982.
- COCKREM, J. F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. SUPPL. 2, p. 169–178, 2007.
- COCKREM, J. F. Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, p. 45–58, 2013.
- COCKREM, J. F.; POTTER, M. A.; CANDY, E. J. Corticosterone in relation to body mass in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) affected by unusual sea ice conditions at Ross Island, Antarctica. **General and Comparative Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 244–252, 2006.
- COCKREM, J. F.; SILVERIN, B. Sight of a predator can stimulate a corticosterone response in the great tit (*Parus major*). **General and comparative endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 248–255, 2002.
- COFFEY, K.; ROBSON, C. N. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. **The Journal of Endocrinology**, v. 215, n. 2, p. 221–237, 2012.
- COLEMAN, K.; WILSON, D. S. Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish : individual differences are context-specific. **Animal Behaviour**, v. 56, n. 4, p. 927–936, 1998.
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. Listas das aves do Brasil. n. 11, p. 1–38, 2014. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>.

CORADELLO, M. A.; MORAIS, R. N.; ROPER, J.; SPERCOSKI, K. M.; MASSUDA, T.; NOGUEIRA, S. S. C.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 2, p. 275–82, 2012.

CORNIL, C. A.; BAILLIEN, M.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Rapid effects of aromatase inhibition on male reproductive behaviors in Japanese quail. **Hormones and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 45–67, 2006.

CREWS, D.; MOORE, M. C. Historical contributions of research on birds to behavioral neuroendocrinology. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 4, p. 395–402, 2005.

CRUVINEL, W. D. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, P. A. J.; CATELAN, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, p. 434–447, 2010.

CYR, N. E.; ROMERO, L. M. Fecal glucocorticoid metabolites of experimentally stressed captive and free-living starlings: Implications for conservation research. **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, n. 1, p. 20–28, 2008.

CZAJKA, I.; SIMPSON, E. Aromatase research and its clinical significance Znaczenie kliniczne badań nad aromatazą. **Polish Journal of Endocrinology**, v. 61, n. 1, p. 126–134, 2010.

DALLMAN, M. F. Stress by any other name...? **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 18–20, 2003.

DANTAS, S. M.; WECKSTEIN, J. D.; BATES, J. M.; KRABBE, N. K.; CADENA, C. D.; ROBBINS, M. B.; VALDERRAMA, E.; ALEIXO, A. Molecular systematics of the new world screech-owls (Megascops: Aves, Strigidae): Biogeographic and taxonomic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 626–634, 2016.

DANTAS, S. M.; WECKSTEIN, J. D.; BATES, J.; OLIVEIRA, J. N. Multi-character taxonomic review, systematics, and biogeography of the Black-capped/Tawny-bellied Screech Owl (*Megascops atricapilla*- *M. watsonii*) complex (Aves: Strigidae). **Zootaxa**, v. 4949, n. 3, p. 401–444, 2021.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L. The use of glucocorticoid hormones or leucocyte profiles to measure stress in vertebrates : What's the difference ? **Methods in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1556–1568, 2018.

DAWSON, A. Control of the annual cycle in birds: Endocrine constraints and plasticity in response to ecological variability. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1497, p. 1621–1633, 2008.

DAWSON, A.; SHARP, P. J. Photorefractoriness in birds — photoperiodic and non-photoperiodic control. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, p. 378–384, 2007.

DE ALMEIDA, Ana Claudia; PALME, Rupert; MOREIRA, Nei. How environmental enrichment affects behavioral and glucocorticoid responses in captive blue-and-yellow macaws (*Ara ararauna*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 201, p. 125-135, 2018.

- DE ANDRÉA SEGALL, M.; GONZAGA, L. P.; PAIVA, P. C. Reverse size dimorphism estimated by an improved method in eight species of Neotropical Owls. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 129, n. 4, p. 883–890, 2017.
- DE ASSIS, R. V.; TITON, M. C. S.; BARSOTTI, G. M. A.; SPIRA, B.; GOMES, F. R. Antimicrobial capacity of plasma from anurans of the Atlantic Forest. **South American Journal of Herpetology**, v. 8, n. 3, p. 155–160, 2013.
- DED, L.; SEBKOVA, N.; CERNA, M.; ELZEINOVA, F.; DOSTALOVA, P.; PEKNICOVA, J.; DVORAKOVA-HORTOVA, K. In vivo exposure to 17 β -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 255–263, 2013.
- DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; JEWGENOW, K.; KRAUSE, M.; GROSSMANN, R. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 345–352, 2003.
- DELEHANTY, B.; BOSSART, G. D.; CHAMPAGNE, C.; CROCKER, D. E.; ELLIOTT, K. H.; NEWMAN, A. E. M.; BOONSTRA, R. Measurement of free glucocorticoids : quantifying corticosteroid binding capacity and its variation within and among mammal and bird species. **Conservation Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 2020.
- DELGADO, M. del M.; PENTERIANI, V. Gender determination of Eurasian Eagle-Owls (*Bubo bubo*) by morphology. **The Raptor Research Foundation**, v. 38, n. 4, p. 375–377, 2004.
- DELIUS, Juan. Preening and associated comfort behavior in birds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, n. 1 Neural Mechan, p. 40-55, 1988.
- DEVICHE, P.; BREUNER, C.; ORCHINIK, M. Testosterone, corticosterone, and photoperiod interact to regulate plasma levels of binding globulin and free steroid hormone in dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 77, n. 1, p. 67–77, 2001.
- DEVICHE, P.; SMALL, T.; SHARP, P.; TSUTSUI, K. Control of luteinizing hormone and testosterone secretion in a flexibly breeding male passerine, the Rufous-winged Sparrow, *Aimophila carpalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 226–235, 2006.
- DHABHAR, F. S. Stress-Induced Enhancement of Cell-Mediated Immunity a. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n. 1, p. 359–372, 1998.
- DHABHAR, F. S. Effects of stress on immune function : the good , the bad , and the beautiful. **Immunologic research**, v. 58, n. 2, p. 193–210, 2014.
- DIAS, R. I.; LIMA, M. R. Breeding biology and nest survival in Tropical Screech-Owls (*Megascops choliba*) in the Brazilian Cerrado. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 217, n. 3, p. 432–440, 2015.
- DICKENS, M. J.; BOURNONVILLE, C. De; BALTHAZART, J.; CORNIL, C. A. Relationships between rapid changes in local aromatase activity and estradiol concentrations in male and female quail brain. **Hormones and Behavior**, v. 65, n. 2, p. 154–164, 2014.

- DINGEMANSE, N. J.; BOTH, C.; DRENT, P. J.; TINBERGEN, J. M. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1541, p. 847–852, 2004.
- DINGEMANSE, N. J.; BOTH, C.; VAN NOORDWIJK, A. J.; RUTTEN, A. L.; DRENT, P. J. Natal Dispersal and Personalities in Great Tits. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1516, p. 741–7, 2003.
- DINGEMANSE, N. J.; GOEDE, P. De. The relation between dominance and exploratory behavior is context-dependent in wild great tits. **Behavioral Ecology**, v. 15, n. 6, p. 1023–1030, 2004.
- DUFTY JR, A. M.; BELTHOFF, J. R. Corticosterone and the stress response in young western screech-owls: effects of captivity, gender, and activity period. **Physiological Zoology**, v. 70, n. 2, p. 143–149, 1997.
- DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks Review. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271–290, 1999.
- DUYSE, E. Van; PINXTEN, R.; EENS, M. Seasonal fluctuations in plasma testosterone levels and diurnal song activity in free-living male great tits. **General and Comparative Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 1–9, 2003.
- ELLIS, B. J.; JACKSON, J. J.; BOYCE, W. T. The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. **Developmental Review**, v. 26, n. 2, p. 175–212, 2006.
- ENRÍQUEZ, P. L.; EISERMANN, K.; MIKKOLA, H.; MOTTA-JUNIOR, J. C. A Review of the Systematics of Neotropical Owls (Strigiformes). **Neotropical owls**, p. 7–19, 2017.
- FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 2, p. 513–556, 2001.
- FARNER, D. S.; WILSON, A. C. A quantitative examination of testicular growth in the white-crowned sparrow. **Biological Bulletin**, v. 113, n. 2, p. 254–267, 1957.
- FEAVER, J.; MENDEL, M.; BATESON, P. A method for rating the individual distinctiveness of domestic cats. **Animal Behaviour**, v. 101, p. 1016–1025, 1986.
- FERREIRA, J. C. P.; FUJIHARA, C. J.; FRUHVALD, E.; TREVISOL, E.; DESTRO, F. C.; TEIXEIRA, C. R.; PANTOJA, J. C. F.; SCHMIDT, E. M. S.; PALME, R. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in Blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.
- FLEMING, P. A.; PAISLEY, C. L.; BARNES, A. L.; WEMELSFELDER, F. Application of qualitative behavioural assessment to horses during an endurance ride. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 144, p. 80–88, 2013.
- FOIDART, A.; LAKAYE, B.; GRISAR, T.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Estrogen receptor- β in quail: Cloning, tissue expression and neuroanatomical distribution. **Journal of neurobiology**, v. 40, n. 3, p. 327–342, 1999.

FOLLETT, B. K.; MATTOCKS, P. W.; FARNER, D. S. Circadian function in the photoperiodic induction of gonadotropin secretion in the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 5, p. 1666–1669, 1974.

FOLLETT, B. K.; MAUNG, S. L. Rate of testicular maturation, in relation to gonadotrophin and testosterone levels, in quail exposed to various artificial photoperiods and to natural daylengths. **Journal of Endocrinology**, v. 78, n. 2, p. 267–280, 1978.

FORLANO, P. M.; SCHLINGER, B. A.; BASS, A. H. Brain aromatase : New lessons from non-mammalian model systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, p. 247–274, 2006.

FOSTER, R. G.; FOLLETT, B. K.; LYTHGOE, N. Rhodopsin-like sensitivity of extra-retinal photoreceptors mediating the photoperiodic response in quail. **Nature**, v. 313, n. 5997, p. 50–52, 1985.

FRANKL-VILCHES, C.; GAHR, M. Androgen and estrogen sensitivity of bird song: a comparative view on gene regulatory levels. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 204, n. 1, p. 113–126, 2018.

FREDIANI, M. H.; GUIDA, F. J. V.; SALGADO, P. A. B.; GONÇALVES, D. R.; BLANK, M. H.; NOVAES, G. A.; PEREIRA, R. J. G. **Semen collection by electrostimulation in a variety of bird orders**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 125140–151 p.

FREKING, F.; NAZAIRIANS, T.; SCHLINGER, B. A. The expression of the sex steroid-synthesizing enzymes CYP11A1, 3 β -HSD, CYP17, and CYP19 in gonads and adrenals of adult and developing zebra finches. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 2, p. 140–151, 2000.

FUSANI, L.; HOF, T. Van; HUTCHISON, J. B.; GAHR, M. Seasonal expression of androgen receptors , estrogen receptors , and aromatase in the canary rain in relation to circulating androgens and estrogens. **Journal of Neurobiology**, v. 43, n. 3, p. 254–268, 2000.

FUXJAGER, M. J.; SCHUPPE, E. R. Androgenic signaling systems and their role in behavioral evolution. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 184, p. 47–56, 2018.

GARAMSZEGI, L. Z.; EENS, M.; HURTREZ-BOUSSÈS, S.; MOLLER, A. P. Testosterone , testes size , and mating success in birds : a comparative study. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 4, p. 389–409, 2005.

GIOVANINI, D. 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. **Brasilia: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais RENCITAS**, p. 1–108, 2002.

GONZÁLEZ-MORÁN, M. G. Changes in the immunohistochemical localization of estrogen receptor alpha and in the stereological parameters of the testes of mature and aged chickens (*Gallus domesticus*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, n. 2, p. 309–314, 2019.

- GONZÁLEZ-MORÁN, M. G.; GUERRA-ARAIZA, C.; CAMPOS, M. G.; CAMACHO-ARROYO, I. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature, and aged chickens. **Domestic animal endocrinology**, v. 35, n. 4, p. 371–379, 2008.
- GOODSON, J. L.; SALDANHA, C. J.; HAHN, T. P.; SOMA, K. K. Recent advances in behavioral neuroendocrinology : Insights from studies on birds. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 4, p. 461–473, 2005.
- GOSLING, S. D. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 1, p. 45–86, 2001.
- GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 35–53, 2005.
- GOYMANN, W. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled , natural environments : the problem with sex , diet , metabolic rate and the individual. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 757–765, 2012.
- GOYMANN, W.; MOSTL, E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **The Auk**, v. 119, n. October, p. 1167–1173, 2002.
- GOYMANN, W.; MOSTL, E.; GWINNER, E. Non-invasive methods to measure androgen metabolites in excrements of European stonechats , *Saxicola torquata rubicola*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 80–87, 2002.
- GREGGOR, A. L.; VICINO, G. A.; SWAISGOOD, R. R.; FIDGETT, A.; BRENNER, D.; KINNEY, M. E.; FARABAUGH, S.; MASUDA, B.; LAMBERSKI, N. Animal welfare in conservation breeding: applications and challenges. **Frontiers in veterinary science**, v. 323, 2018.
- GRIFFIN, C.; FLOURIOT, G.; SONNTAG-BUCK, V.; GANNON, F. Two functionally different protein isoforms are produced from the chicken estrogen receptor- α gene. **Molecular endocrinology**, v. 13, n. 9, p. 1571–1587, 1999.
- GRIFFITH, O. W.; BRANDLEY, M. C.; WHITTINGTON, C. M.; BELOV, K.; THOMPSON, M. B. Comparative genomics of hormonal signaling in the chorioallantoic membrane of oviparous and viviparous amniotes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 244, p. 19–29, 2017.
- GRINO, P. B.; GRIFFIN, J. E.; WILSON, J. D. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1165–1172, 1990.
- GROOTHUIS, T. G. G.; CARERE, C. Avian personalities: Characterization and epigenesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 137–150, 2005.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian diseases**, v. 27, n. 4, p. 972–979, 1983.
- GRZEGORZEWSKA, A. K.; SECHMAN, A.; PACZOSKA-, H. E.; RZAŚA, J. The expression of pituitary FSH β and LH β mRNA and gonadal FSH and LH receptor mRNA in the chicken embryo. **Reproductive Biology**, v. 9, n. 3, p. 253–269, 2009.

- GUILHERME, E.; SOUZA, I. R. de. Nestling development of the tropical screech-owl (*Megascops choliba*): a successful case report from the southwestern Amazon. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 3, p. 269–272, 2017.
- GUNKEL, C.; LAFORTUNE, M. Current techniques in avian anesthesia. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 14, n. 4, p. 263–276, 2005.
- GWINNER, E. Circannual rhythms in birds. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, n. 6, p. 770–778, 2003.
- HAASE, E.; SHARP, P. J.; PAULKE, E. Seasonal changes in the concentrations of plasma gonadotropins and prolactin in wild Mallard drakes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 234, n. 2, p. 301–305, 1985.
- HADDAD, R. A.; GIACHERIO, D.; BARKAN, A. L. Interpretation of common endocrine laboratory tests: technical pitfalls, their mechanisms and practical considerations. **Clinical Diabetes and Endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2019.
- HÄGGSTRÖM, M.; RICHFIELD, D. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. **WikiJournal of Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2014.
- HAHN, D. C. Patterns of maternal yolk hormones in eastern screech owl eggs (*Megascops asio*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, n. 3, p. 423–429, 2011.
- HARTIG, F. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level/Mixed) Regression Models. 2019. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=DHARMA>>.
- HAU, M. Regulation of male traits by testosterone: Implications for the evolution of vertebrate life histories. **BioEssays**, v. 29, n. 2, p. 133–144, 2007.
- HAYWARD, L. S.; BOOTH, R. K.; WASSER, S. K. Eliminating the artificial effect of sample mass on avian fecal hormone metabolite concentration. **General and Comparative Endocrinology**, v. 169, n. 2, p. 117–122, 2010.
- HERTING, B. L.; BELTHOFF, J. R. Testosterone, aggression, and territoriality in male Western Screech-owls (*Otus kennicottii*): Results from preliminary experiments. In: Proceedings of the Second International Symposium on the Biology and Conservation of Owls of the Northern Hemisphere. St Paul, Minnesota: U.S., 1997, [...]. 1997. p. 213–217.
- HESS, R. A.; BUNICK, D.; LEE, K. H.; BAHR, J.; TAYLOR, J. A.; KORACH, K. S.; LUBAHN, D. B. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 509–512, 1997.
- HESS, R. A.; CARNES, K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. **Animal Reproduction (AR)**, v. 1, n. 1, p. 5–30, 2004.
- HOLEKAMP, K. E.; SHERMAN, P. W. Why male ground squirrels disperse: a multilevel analysis explains why only males leave home. **American Scientist**, v. 77, n. 3, p. 232–239, 1989.

- HORNERS, H. C.; MUNCKLL, A.; LIENHARD, G. E. Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from human fibroblasts *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 36, p. 17696–17702, 1987.
- HUNT, K. E.; TRITES, A. W.; WASSER, S. K. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 5, p. 595–601, 2004.
- ICMBIO/MMA, instituto chico mendes; BIODIVERSIDADE, de conservação da. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. [s.l: s.n.]v. III172 p.
- ILMONEN, P.; HASSELQUIST, D.; LANGEFORS, A.; WIEHN, J. Stress , immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. **Oecologia**, v. 136, n. 1, p. 148–154, 2003.
- ISHTIAQ, F.; RAHMANI, A. R. The Forest Owlet *Heteroglaux blewitti*: vocalization , breeding biology and conservation. **Ibis**, v. 147, n. 1, p. 197–205, 2005.
- ISLAM, M. N.; ZHU, X. B.; AOYAMA, M.; SUGITA, S. Histological and morphometric analyses of seasonal testicular variations in the Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*). **Anatomical science international**, v. 85, n. 3, p. 121–129, 2010.
- 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, 2006.
- JOËLS, M. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 18, n. 1, p. 2–48, 1997.
- JONES, R. C.; LIN, M. Spermatogenesis in birds. **Oxford reviews of reproductive biology**, v. 15, p. 233–264, 1993.
- JONES, S. M. Variations upon a theme: Australian lizards provide insights into the endocrine control of vertebrate reproductive cycles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 244, p. 60–69, 2015.
- KATOH, H.; OGINO, Y.; YAMADA, G. Cloning and expression analysis of androgen receptor gene in chicken embryogenesis. **FEBS letters**, v. 580, n. 6, p. 1607–1615, 2006.
- KELLER, S. E.; WEISS, J. M.; SCHLEIFER, S. J.; MILLER, N. E.; STEIN, M. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1301–1304, 1983.
- KIEZUN, J.; LESKA, A.; KAMINSKA, B.; JANKOWSKI, J.; DUSZA, L. Expression of the androgen receptor in the testes and the concentrations of gonadotropins and sex steroid hormones in male turkeys (*Meleagris gallopavo*) during growth and development. **General and Comparative Endocrinology**, v. 214, p. 149–156, 2015.
- KOENE, P. Behavioral ecology of captive species: Using behavioral adaptations to assess and enhance welfare of nonhuman zoo animals. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 16, n. 4, p. 360–380, 2013.
- KÖNIG, C.; WEICK, F.; BECKING, JH. *Owls of the World*, 2nd edition. Christopher Helm, London, p. 528, 2008.
- KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN

REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A. W.; BLOKHUIS, H. J. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–935, 1999.

KRALJ-FIŠER, Simona et al. Glucocorticoids enhance and suppress heart rate and behaviour in time dependent manner in greylag geese (*Anser anser*). **Physiology & behavior**, v. 100, n. 4, p. 394-400, 2010.

KUENZEL, W. J. The search for deep encephalic photoreceptors within the avian brain, using gonadal development as a primary indicator. **Poultry science**, v. 72, n. 5, p. 959–967, 1993.

KUENZEL, W. J.; GOLDEN, C. D. Distribution and change in number of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons following activation of the photoneuroendocrine system in the chick, *Gallus gallus*. **Cell and tissue research**, v. 325, n. 3, p. 501–512, 2006.

KUMAR, N.; LOHRENTZ, A.; GAHR, M.; GROOTHUIS, T. G. G. Steroid receptors and their regulation in avian extraembryonic membranes provide a novel substrate for hormone mediated maternal effects. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2019.

KUSHIMA, K.; FUJITA, M.; SHIGETA, A.; HORIUCHI, H.; MATSUDA, H. Flow cytometric analysis of chicken NK activity and its use on the effect of restraint stress. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 9, p. 995–1000, 2003.

KWON, S.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; KIRBY, J. D.; BAHR, J. M. Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. **Journal of andrology**, v. 18, n. 4, p. 378–384, 1997.

KWON, S.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANULIS, L.; OSAWA, Y.; BAHR, J. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1259–1264, 1995.

LAKAYE, B.; FOIDART, A.; GRISAR, T.; BALTHAZART, J. Partial cloning and distribution of estrogen receptor beta in the avian brain. **Neuroreport**, v. 9, n. 12, p. 2743–2748, 1998.

LANCE, V. A.; CONLEY, A. J.; MAPES, S.; STEVEN, C.; PLACE, A. Does alligator testis produce estradiol? A comparison of ovarian and testicular aromatase. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1201–1207, 2003.

LANDYS, M. M.; RAMENOFSKY, M.; WINGFIELD, J. C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 132–149, 2006.

LANNA, L. L.; SOARES, F. A.; SANTOS, T. M.; OLIVEIRA, J. N.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Índice gonadossomático e correlações entre dimensões e peso testiculares na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) aos 60 dias de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 955–960, 2013.

LARSON, A. A.; NUNEZ, M. G.; KOVÁCS, K. J. Intrathecal urocortin I in the spinal cord as a murine model of stress hormone-induced musculoskeletal and tactile hyperalgesia. **European Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 10, p. 2772–2782, 2015.

- LÈCHE, A.; BUSSO, J. M.; HANSEN, C.; NAVARRO, J. L.; MARÍN, R. H.; MARTELLA, M. B. Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, n. 2, p. 188–191, 2009.
- LESKA, A.; DUSZA, L. Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary- gonadal axis in birds. **Reproductive biology**, v. 7, n. 2, p. 99–126, 2007.
- LESKA, A.; KIEZUN, J.; KAMINSKA, B.; DUSZA, L. Seasonal changes in the expression of the androgen receptor in the testes of the domestic goose (*Anser anser f. domestica*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 1, p. 63–70, 2012.
- LESKA, A.; KIEZUN, J.; KAMINSKA, B.; DUSZA, L. Estradiol concentration and the expression of estrogen receptors in the testes of the domestic goose (*Anser anser f. domestica*) during the annual reproductive cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 51, p. 96–104, 2015.
- LEWIS, P. D.; PERRY, G. C.; MORRIS, T. R. Effect of timing and size of photoperiod change on plasma FSH concentration and the correlation between FSH and age at first egg in pullets. **British poultry science**, v. 40, n. 3, p. 380–384, 1999.
- LIGON, J. D. The Biology of the Elf Owl, *Micrathene whitneyi*. **Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan**, v. 136, 1968.
- LIMA, K. K. B.; BISPO, L. A.; MORAES, N. de M.; AFONSO, L. G. Birds of prey : quantitative analysis of the species received by CETAS and Zoovet in the period from 2015 to 2017. **Acta Biologica Brasiliensia**, v. 4, n. 1, p. 81–95, 2021.
- LIMA, P. C.; LIMA NETO, T. N. de C. O comportamento reprodutivo da corujinha-domato *Otus choliba choliba* (Strigiformes: Strigidae) no litoral norte da Bahia: um ensaio fotográfico. **Atualidades Ornitológicas**, v. 152, p. 41–65, 2009.
- LIN, H.; SONG, G.; LEI, F.; LI, D.; QU, Y. Avian corticosteroid-binding globulin : biological function and regulatory mechanisms in physiological stress responses. **Frontiers in Zoology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2021.
- LIN, M.; JONES, R. C. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. **Cell and tissue research**, v. 267, n. 3, p. 591–601, 1992.
- LIN, M.; JONES, R. C. Spermiogenesis and spermiation in the Japanese quail. **Journal of anatomy**, v. 183, n. 3, p. 525–535, 1993.
- LITTIN, K. E.; COCKREM, J. F. Individual variation in corticosterone secretion in laying hens. **British poultry science**, v. 42, n. 4, p. 536–546, 2001.
- LOVAS, E. M.; JOHNSTON, S. D.; FILIPPICH, L. J. Using a GnRH agonist to obtain an index of testosterone secretory capacity in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 1, p. 52–56, 2010.
- LOVE, O. P.; MADLIGER, C. L.; BOURGEON, S.; SEMENIUK, C. A. D.; WILLIAMS, T. D. Evidence for baseline glucocorticoids as mediators of reproductive investment in a wild bird. **General and Comparative Endocrinology**, v. 199, p. 65–69, 2014.

LYNN, S. E. Endocrine and neuroendocrine regulation of fathering behavior in birds. **Hormones and Behavior**, v. 77, p. 237–248, 2016.

MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A.; BONIER, F.; ROMERO, M. L.; MOORE, I. T. **Glucocorticoids and “Stress” are not synonymous Integrative Organismal Biology**. [s.l: s.n.].

MADLIGER, C. L.; LOVE, O. P. The need for a predictive, context-dependent approach to the application of stress hormones in conservation. **Conservation Biology**, v. 28, n. 1, p. 283–287, 2013.

MAGRINI, L.; FACURE, K. Barn owl (*Tyto alba*) predation on small mammals and its role in the control of hantavirus natural reservoirs in a periurban area in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 733–740, 2008.

MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B.; O’MALLEY, P. J.; MEYER, G. T.; TALBOT, R. T.; SHARP, P. J. Endocrine and testicular changes in a short-day seasonally breeding bird, the emu (*Dromaius novaehollandiae*), in southwestern Australia. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1–4, p. 143–155, 1998.

MALISCH, J. L.; SATTERLEE, D. G.; COCKREM, J. F.; WADA, H.; BREUNER, C. W. How acute is the acute stress response? Baseline corticosterone and corticosteroid-binding globulin levels change 24 h after an acute stressor in Japanese quail. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 2, p. 345–350, 2010.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHIITQ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVAN, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835–839, 1995.

MARSHALL, J. T.; KING, B. Hawks and Owls of the World: A Distributional and Taxonomic List. In: GENUS OTUS. IN: AMADON, D., BULL, J. **Proceedings of the Western Foundation of Vertebrate Zoology**. [s.l: s.n.]p. 296–357.

MARTIN, J. M.; BRANCH, L. C.; RAID, R. N.; BEYELER, S. C. Temporal instability of agricultural habitat reduces reproductive success of Barn Owls (*Tyto alba*). **The Auk**, v. 127, n. 4, p. 909–916, 2010.

MASON, G. J. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 12, p. 713–721, 2010.

MASTORAKOS, G.; PAVLATOU, M.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; CHROUSOS, G. P. Exercise and the stress system. **Hormones (Athens)**, v. 42, n. 2, p. 73–89, 2005.

MATSON, K. D.; TIELEMAN, B. I.; KLASING, K. C. Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 3, p. 556–564, 2006.

MATSUNAGA, M.; UKENA, K.; TSUTSUI, K. Androgen biosynthesis in the quail brain. **Brain research**, v. 948, n. 1–2, p. 180–185, 2002.

MCDUGALL, P. T.; RÉALE, D.; SOL, D.; READER, S. M. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. **Animal Conservation**, v. 9, n. 1, p. 39–48, fev. 2006.

- MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior** **43**, v. 43, n. 1, p. 2–15, 2003.
- MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. **Hormones and Behavior**, v. 57, n. 2, p. 105, 2010.
- MCFARLANE, M. J.; CURTIS, E. S. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil: lymphocyte ratio. **Poultry Science**, v. 68, n. 4, p. 522–527, 1988.
- MEDZHITOV, R.; JR JANEWAY, C. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338–344, 2000.
- MELNYCHUK, V. L.; COOPER, M. W.; KIRBY, J. D.; RORIE, R. W.; ANTHONY, N. B. Use of ultrasonography to characterize ovarian status in chicken. **Poultry Science**, v. 81, n. 6, p. 892–895, 2002.
- MENAKER, M.; ROBERTS, R.; ELLIOTT, J.; UNDERWOOD, H. Extraretinal light perception in the sparrow, III: the eyes do not participate in photoperiodic photoreception. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 67, n. 1, p. 205–213, 1970.
- MENQ, W.; ANJOS, L. Habitat selection by owls in a seasonal semi-deciduous forest in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 143–149, 2015.
- MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research : considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 189–199, 2004.
- MOHAMMED, A.; MAHMOUD, M.; MURUGESAN, R.; CHENG, H. Effect of a synbiotic supplement on fear response and heat stress. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 427, 2021.
- MORAES, V. D. S.; PEDROSO-JR, N. N.; BANDEIRA, D. L. C. Aspectos ecológicos da Coruja-Buraqueira (*Speotyto cunicularia*) agregados a uma análise sócio-econômica visando a conservação de dunas costeiras em Pontal do Sul, PR. **Biokos, Campinas**, v. 18, n. January 1995, p. 11–19, 2004.
- MORAIS, M. R. P. T.; VELHO, A. L. M. C. D. S.; DANTAS, S. E. S.; FONTENELENETO, J. D. Morfofisiologia da reprodução das aves: Controle endócrino do ciclo sexual das aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 285–293, 2012.
- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3–4, p. 262–302, 2007.
- MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings : an analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 34, p. 17–34, 2005.
- MOTTA-JUNIOR, J. C. Diet of breeding Tropical Screech-Owls (*Otus choliba*) in southeastern Brazil. **The Raptor Research Foundation**, v. 36, n. 4, p. 332–334, 2002.
- MOTTA-JUNIOR, J. C.; BRAGA, ROCHA, A. C.; GRANZINOLLI, M. M. A. **The owls of Brazil**. [s.l.] Springer, 2017. 97–158 p.

- MOTTA, J. C. Relações tróficas entre cinco Strigiformes simpátricas na região central do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 4, p. 359–377, 2006.
- MÜLLER, C.; JENNI-EIERMANN, S.; JENNI, L. Heterophils / Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. **Functional Ecology**, v. 25, n. 3, p. 566–576, 2011.
- MUNTEANU, A. M.; STOCKER, M.; STÖWE, M.; MASSEN, J. J.; BUGNYAR, T. Behavioural and Hormonal Stress Responses to Social Separation in Ravens, *Corvus corax*. **Ethology**, v. 123, n. 2, p. 123–135, 2017.
- NASTIUKT, L. K.; CLAYTON, F. D. Seasonal and tissue-specific regulation of canary androgen receptor messenger ribonucleic acid. **Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 640–649, 1994.
- NERLEKAR, A.; GOWANDE, G.; JOSHI, P. Behavioural ethogram of Spotted Owlet *Athene Brama* (Temminck , 1821). **Journal of the Bombay Natural History Society**, v. 111, n. 3, p. 172–179, 2014.
- NICOLAIDES, N. C.; KYRATZI, E.; LAMPROKOSTOPOULOU, A.; CHROUSOS, G. P.; CHARMANDARI, E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 1–2, p. 6–19, 2015.
- NOGUEIRA, S. S. C.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; DUARTE, J. M. B.; MENDEL, M. Temperament, plasticity, and emotions in defensive behaviour of Paca (Mammalia, Hystricognatha). **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–24, 2021.
- NORMAN, A. W.; MIZWICKI, M. T.; NORMAN, D. P. G. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 27–41, 2004.
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R.; HENRY, P. Estrogen and Spermatogenesis*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 3, p. 289–318, 2001.
- OLIAS, P.; ADAM, I.; MEYER, A.; SCHARFF, C.; GRUBER, A. D. Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 26–28, 2014.
- OLIVEIRA, A. G.; DORNAS, R. A. P.; MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. Occurrence and cellular distribution of estrogen receptors ER a and ER b in the testis and epididymal region of roosters. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, p. 597–603, 2011.
- OLIVEIRA, A.; MART, F.; GIL, L.; LUÑO, V. Morphological characteristics of the sperm of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) during the reproductive season. **veterinary sciences**, v. 8, n. 9, p. 169, 2021.
- OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, G. A. B.; CARNES, K.; PRINS, G. S.; PHILIPPA, T. K.; FRANÇA, L. R.; HESS, R. A. Differential hormonal regulation of estrogen receptors ER α and ER β and androgen receptor expression in rat efferent ductules. **Reproduction**, v. 128, n. 1, p. 73–86, 2004.
- OPALKA, M.; LESKA, A.; KAMIŃSKA, B.; L., D. Oestrogen receptor α and β mRNA expression in testis of ganders fed diets containing different levels of phytoestrogens. **Journal of Animal and Feed Sciences**, p. 600–607, 2008.

- OUYANG, J. Q.; SHARP, P.; QUETTING, M.; HAU, M. Endocrine phenotype , reproductive success and survival in the great tit , *Parus major*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, n. 9, p. 1988–1998, 2013.
- OWL, T. S.; TROPICAL, T.; OWL, S.; RICA, C.; PUBL, L.; BIRDS, T. Tropical Screech Owl nest defense behavior and nestling growth rate. **The Wilson Bulletin**, v. 89, n. 4, p. 609–612, 1975.
- PALME, R. Measuring Fecal Steroids : Guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75–80, 2005.
- PALME, R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. **Physiology & Behavior**, v. 199, p. 229–243, 2019.
- PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MÖSTL, E. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, p. 162–171, 2005.
- PALME, R.; TOUMA, C.; ARIAS, N.; DOMINCHIN, M. F.; LEPSCHY, M. Steroid extraction : Get the best out of faecal samples. **Wien Tierarztl Monatsschr**, v. 100, n. 9–10, p. 238–246, 2013.
- PAULINO, R.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; SIQUEIRA, S. The role of individual behavioral distinctiveness in exploratory and anti-predatory behaviors of red-browed Amazon parrot (*Amazona rhodocorytha*) during pre-release training. **Applied Animal Behaviour Science**, 2018.
- PEARL, C. A.; MASON, H.; ROSER, J. F. Immunolocalization of estrogen receptor alpha , estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1–4, p. 103–111, 2011.
- PEDROSA, I.; SUÁREZ ÁLVAREZ, J.; GARCÍA CUETO, E. Content validity evidences: Theoretical advances and estimation methods. **Acción psicológica**, v. 10, n. 2, p. 3–18, 2013.
- PENFOLD, L. M.; WILDT, D. E.; HERZOG, T. L.; LYNCH, W.; WARE, L.; DERRICKSON, S. E.; MONFORT, S. L. Seasonal patterns of LH, testosterone and semen quality in the Northern pintail duck (*Anas acuta*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 4, p. 229–235, 2000.
- PEREIRA, G. A.; DANTAS, S. de M.; SILVEIRA, L. F.; RODA, S. A.; ALBANO, C.; SONNTAG, F. A.; LEAL, S.; PERIQUITO, M. C.; MALACCO, G. B.; LEES, A. C. Status of the globally threatened forest birds of northeast Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 54, n. 14, p. 177–194, 2014.
- PEREIRA, R. J. G.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; BLANK, M. H.; MAURICIO, J.; DUARTE, B. Urofecal steroid profiles of captive Blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*) with different reproductive outcomes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 260, p. 1–8, 2018.
- PEREIRA, R. J. G.; GRANZINOLLI, M. A. M.; DUARTE, J. M. B. Annual profile of fecal androgen and glucocorticoid levels in free-living male American kestrels from southern mid-latitude areas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, n. 1, p. 94–103, 2010.

- PERFITO, N.; ZANN, R.; UBUKA, T.; BENTLEY, G.; HAU, M. Potential roles for GnIH and GnRH-II in reproductive axis regulation of an opportunistically breeding songbird. **General and Comparative Endocrinology**, v. 173, n. 1, p. 20–26, 2011.
- PEROGAMVROS, I.; KAYAHARA, M.; TRAINER, P. J.; RAY, D. W. Serum regulates cortisol bioactivity by corticosteroid-binding globulin-dependent and independent mechanisms, as revealed by combined bioassay and physicochemical assay approaches. **Clinical Endocrinology**, v. 75, n. 1, p. 31–38, 2011.
- PETERS, A.; ASTHEIMER, L.; COCKBURN, A. The annual testosterone profile in cooperatively breeding superb fairy-wrens, *Malurus cyaneus*, reflects their extreme infidelity. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 50, n. 6, p. 519–527, 2001.
- PETERSON, R. S.; YARRAM, L.; SCHLINGER, B. A.; SALDANHA, C. J. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1576, p. 2089–2096, 2005.
- PHUC LE, P.; FRIEDMAN, J. R.; SCHUG, J.; BRESTELLI, J. E.; PARKER, J. B.; BOCHKIS, I. M.; KAESTNER, K. H. Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. **PLoS genetics**, v. 1, n. 2, p. 16, 2005.
- PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annual review of biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 465–495, 1981.
- POORBAGHI, S. L.; JAVDANI-GANDOMANI, M.; NAZIFI, S. Surgical treatment of bumblefoot in a captive golden eagle (*Aquila chrysaetos*). **Veterinary Research Forum**, v. 3, n. 1, p. 71–73, 2012.
- POPP, L. G.; SERAFINI, P. P.; REGHELIN, A. L. S.; SPERCOSKI, K. M.; ROPER, J. J.; MORAIS, R. N. Annual pattern of fecal corticoid excretion in captive Red-tailed parrots (*Amazona brasiliensis*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 178, n. 4, p. 487–493, 2008.
- PORSTMANN, T.; KIESSIG, S. T. Enzyme immunoassay techniques an overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 150, n. 1–2, p. 5–21, 1992.
- PRAVOSUDOV, V. V.; KITAYSKY, A. S.; SALDANHA, C. J.; WINGFIELD, J. C.; CLAYTON, N. S. The effect of photoperiod on adrenocortical stress response in mountain chickadees (*Poecile gambeli*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 242–248, 2002.
- PROUDFOOT, G.; GENHLBACH, FREDERICK, R.; HONEYCUTT, RODNEY, L. Mitochondrial DNA variation and phylogeography of the eastern and western screech-owls. **The condor**, v. 109, n. 3, p. 617–627, 2007.
- QIAN, X.; DROSTE, S. K.; GUTIÉRREZ-MECINAS, M.; COLLINS, A.; KERSANTÉ, F.; REUL, J. M. H. M.; LINTHORST, A. C. E. A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3738–3748, 2011.
- QUARMBY, V. E.; YARBROUGH, W. G.; LUBAHN, D. B.; FRENCH, F. S.; WILSON, E. M.; HILL, C.; CAROLINA, N. Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 22–28, 1990.

RAMANUJAM, M. E. Some observations on the spread-winged agonistic displays of the Indian Eagle Owl *Bubo bengalensis* (Franklin , 1831). **Journal of Threatened Taxa**, v. 2, p. 1147–1152, 2010.

RAMANUJAM, M. E. The time budget and behavioural traits of young and adult Indian Eagle Owl *Bubo bengalensis* (Franklin , 1831) (Aves : Strigiformes : Strigidae) in and around a nesting site : a preliminary report. **Journal of Threatened Taxa**, v. 7,n. November, p. 8139–8147, 2015.

RAMIREZ, V. D.; ZHENG, J.; SIDDIQUE, K. M. Membrane receptors for estrogen, progesterone, and testosterone in the rat brain: fantasy or reality. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 16, n. 2, p. 175–198, 1996.

RAMOS-GÜIVAS, B.; JAWOR, J. M.; WRIGHT, T. F. Seasonal variation in fecal glucocorticoid levels and their relationship to reproductive success in captive populations of an endangered parrot. **Diversity**, v. 13, n. 12, p. 1–17, 2021.

RAMOS, G. A. P.; AZEVEDO, C. S.; SANT'ANNA, A. C. Comparison of three analytical approaches to assess temperament dimensions in nonhuman animals. **Scientia Plena**, v. 18, n. 2, p. 1–10, 2022.

RAMOS, G. D. A. P.; DE AZEVEDO, C. S.; JARDIM, T. H. A.; SANT'ANNA, A. C. Temperament in captivity , environmental enrichment , flight ability , and response to humans in an endangered parrot species. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 24, n. 4, p. 379–391, 2020.

RANGEL-NEGRÍN, A.; DUARTE DIAS, P. A.; CANALES-ESPINOSA, D. Respuestas hormonales de los primates mexicanos a factores socio ambientales. **La conservación de Primates en México**, p. 149–171, 2011.

RASKIN, K.; GENDT, K. De; DUITTOZ, A.; LIERE, P.; VERHOEVEN, G.; MHAOUTY-KODJA, S. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system : Effects on male behavioral and neuroendocrine responses. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 14, p. 4461–4470, 2009.

RAULO, A.; DANTZER, B. Associations between glucocorticoids and sociality across a continuum of vertebrate social behavior. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 15, p. 7697–7716, 2018.

RÉALE, D.; READER, S. M.; SOL, D.; MCDUGALL, P. T.; DINGEMANSE, N. J. Integrating animal temperament within ecology and evolution. **Biological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 291–318, 2007.

REMAGE-HEALEY, L.; ROMERO, L. M. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus Vulgaris*): glucose. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 1, p. 60–68, 2000.

REMSEN JR, J. V.; CADENA, C. D.; JARAMILLO, A.; NORES, M.; PACHECO, J. F.; PÉREZ-EMÁN, J.; ZIMMER. **A Classification of the Bird Species of South America. South American Classification Committee. American Ornithologists' Union.**

RENSEL, M. A.; DING, J. A.; PRADHAN, D. S.; SCHLINGER, B. A. 11 β -HSD types 1 and 2 in the songbird brain. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. 86, p. 1–11, 2018.

RITCHIE, M. Neuroanatomy and physiology of the avian hypothalamic/pituitary axis: clinical aspects. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 17, n. 1, p. 13–22, 2014.

ROBART, A. R.; MORADO, M. I.; WATTS, H. E. Declining food availability, corticosterone, and migratory response in a nomadic, irruptive migrant. **Hormones and Behavior**, v. 110, p. 56–67, 2019.

ROBINSON, J. E.; FOLLETT, B. K. Photoperiodism in Japanese Quail : The Termination of Seasonal Breeding by Photorefractoriness. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 215, n. 1198, p. 95–116, 1982.

ROMERO, L. M.; BEATTIE, U. K. Common myths of glucocorticoid function in ecology and conservation. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 337, n. 1, p. 1–8, 2022.

ROMERO, L. M.; RAMENOFSKY, M.; WINGFIELD, J. C. Season and Migration Alters the Corticosterone Response to Capture and Handling in an Arctic Migrant , the White-Crowned Sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 116, n. 2, p. 171–177, 1997.

ROSATI, L.; DI FIORE, MADDALENA, M.; PRISCO, M.; RUSSO, G. F.; VENDITTI, M.; SANTILLO, A. Seasonal expression and cellular distribution of star and steroidogenic enzymes in quail testis. **Jornal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 332, n. 6, p. 198–209, 2019.

ROSATI, L.; FALVO, S.; BACCARI, G. C.; SANTILLO, A.; MADDALENA, M.; DI FIORE, M. M. The Aromatase–Estrogen system in the testes of non-mammalian vertebrates. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2021.

ROULIN, A.; MONSTIERS, B. D. E. S.; IFRID, E.; SILVA, A. D. A.; GENZONI, E.; DREISS, A. N. Reciprocal preening and food sharing in colour-polymorphic nestling barn owls. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 29, n. 2, p. 380–394, 2016.

SAFIAN, D.; BOGERD, J.; SCHULZ, R. W. Regulation of spermatogonial development by Fsh : The complementary roles of locally produced Igf and Wnt signaling molecules in adult zebra fi sh testis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 284, p. 113244, 2019.

SAITO, N.; SHIMADA, K.; NOMURA, N.; OGURI, K.; SATO, K.; WADA, M. Seasonal changes in the reproductive functions of Java Sparrows (*Padda oryzivora*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 101, n. 3, p. 459–463, 1992.

SALDANHA, C. J.; SCHLINGER, B. A. Neural and non-neural estrogen synthesis in the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 105, n. 3, p. 390–401, 1997.

SALDANHA, C. J.; TUERK, M. J.; KIM, Y.; FERNANDES, A. O.; ARNOLD, A. P.; SCHLINGER, B. A. Distribution and regulation of telencephalic aromatase expression in the zebra finch revealed with a specific antibody. **Journal of Comparative Neurology**, v. 423, n. 4, p. 619–630, 2000.

- SALDANHA, P. H. O concenito de Etologia, com especial referência ao comportamento dos primatas: (Comentário). **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, n. 30, p. 797–808, 1973.
- SANDBERG, A. A. Endocrine control and physiology of the prostate. **The prostate**, v. 1, n. 2, p. 169–184, 1980.
- SANT'ANNA, A. C.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Validity and feasibility of qualitative behavior assessment for the evaluation of Nellore cattle temperament. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 254–262, 2013.
- SASVÁRI, L.; PÉCZELY, P.; HEGYI, Z. Plasma testosterone profile of male tawny owls *Strix aluco* in relation to breeding density, breeding experience, and offspring provision. **Acta Ornithologica**, v. 44, n. 1, p. 59–68, 2009.
- SCHEIBER, I. B. R.; JONG, M. E. De; KOMDEUR, J.; PSCHERNIG, E.; LOONEN, M. J. J. E.; MILLESI, E.; WEISS, B. M. Diel pattern of corticosterone metabolites in Arctic barnacle goslings (*Branta leucopsis*) under continuous natural light. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. 1–17, 2017.
- SCHEUN, J.; GULSON, J.; GANSWINDT, A. Monitoring glucocorticoid metabolite concentrations as a proxy of environmental stress across important life-history stages in captive African penguins. **General and Comparative Endocrinology**, v. 296, p. 113539, 2020.
- SCHLINGER, B. A.; ARNOLD, A. P. Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 10, p. 4191–4194, 1991.
- SCHUPPE, E. R.; MILES, M. C.; FUXJAGER, M. J. Evolution of the androgen receptor : Perspectives from human health to dancing birds. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 499, p. 110577, 2020.
- SCHWABL, P.; BONACCORSO, E.; GOYMANN, W. Diurnal variation in corticosterone release among wild tropical forest birds. **Frontiers in Zoology**, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12983-016-0151-3>>.
- SEO, Y. Enzyme Immunoassays. p. 344, 2000.
- SHACKLETON, C. H. L. Profiling steroids hormones and urinary steroids. **Journal of Chromatography B**, v. 379, p. 91–156, 1986.
- SHANBHAG, B. A.; SHARP, P. J. Immunocytochemical localization of androgen receptor in the comb, uropygial gland, testis, and epididymis in the domestic chicken. **General and Comparative Endocrinology**, v. 82, n. 1, p. 76–82, 1996.
- SHARP, P. J. Strategies in avian breeding cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 505–513, 1996.
- SHARP, P. J. Photoperiodic regulation of seasonal breeding in bird. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, n. 1, p. 189–199, 2005.
- SHARP, P. J.; DAWSON, A.; LEA, R. W. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 119, n. 3, p. 275–282, 1998.

SHARP, P. J.; TALBOT, R. T.; MAIN, G. M.; DUNN, I. C.; FRASER, H. M.; HUSKISSON, N. S. Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. **Journal of Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 291–299, 1990.

SHARPE, R. M. The Roles of Oestrogen in the Male. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 9, p. 371–377, 1998.

SHIMADA, K.; YOSHIDA, K.; SAITO, N. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P45017 α and P450arom messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. **General and Comparative Endocrinology**, v. 102, n. 2, p. 241–246, 1996.

SHINOMIYA, A.; SHIMMURA, T.; NISHIWAKI-OHKAWA, T.; YOSHIMURA, T. Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, p. 1–7, 2014.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira** Rio de Janeiro. Nova Fronteira, 1997.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. 2001. ed. Rio de Janeiro, Brazil: Editora Nova Fronteira, 2001. 912p p.

SIH, A.; BELL, A.; JOHNSON, J. C. Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 7, p. 372–378, 2004.

SILVERIN, B.; KIKUCHI, M.; ISHII, S. Effect of season and photoperiod on FSH in male great tits. **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 457–463, 1999.

SINHORINI, J. A.; PIZZUTTO, C. S.; PALME, R. ACTH stimulation induced self-mutilation behavior in the Golden Conure (*Guaruba guarouba*). **Animals**, v. 10, n. 3, p. 1–7, 2020.

SMITH, C. A.; ANDREWS, J. E.; SINCLAIR, A. H. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: Expression of estrogen receptor and aromatase genes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 60, n. 5–6, p. 295–302, 1997.

ŠOTNÁR, K.; PAČENOVSKÝ, S.; OBUCH, J. On the food of the Eurasian pygmy owl (*Glaucidium passerinum*) in Slovakia. **Slovak Raptor Journal**, v. 9, n. 1, p. 115–126, 2015.

SOUSA, M. B. C. de; SILVA, H. P. A.; GALVÃO-COELHO, N. L. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. **Estudos de Psicologia**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2015.

SOUZA, A. P.; WEMELSFELDER, F.; TACONELI, C.; MOLENTO, C. F. Development of a list of terms in Brazilian Portuguese for the Qualitative Behaviour Assessment of broiler chickens. **Animal Welf**, v. 30, p. 49–59, 2021.

STANCZYK, F. Z.; LEE, J. S.; SANTEN, R. J. Standardization of steroid hormone assays: Why, how, and when? **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 16, n. 9, p. 1713–1719, 2007.

- STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.
- STOCKER, M.; MUNTEANU, A.; STÖWE, M.; SCHWAB, C.; PALME, R.; BUGNYAR, T. Loner or socializer ? Raven's adrenocortical response to individual separation depends on social integration. **Hormones and Behavior**, v. 78, p. 194–199, 2016.
- STRAUSS, L.; KALLIO, J.; DESAI, N.; PAKARINEN, P.; MIETTINEN, T.; GYLLING, H.; ALBRECHT, M.; MAKELA, S.; MAYERHOFER, A.; POUTANEN, M. Increased exposure to estrogens disturbs maturation, steroidogenesis, and cholesterol homeostasis via estrogen receptor alpha in adult mouse Leydig cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2865–2872, 2009.
- SUDHAKUMARI, A.; CHERY, C.; CHANDANA, H. Effects of Photoperiod Alterations on Adrenocortical , Pineal and Gonadal Activity in Nocturnal bird , *Athene brama* and Diurnal bird , *Perdicula asiatica*. **Zoological Science**, v. 18, n. 1, p. 71–79, 2001.
- TATA, J. R. One hundred years of hormones. **EMBO reports**, v. 6, n. 6, p. 490–496, 2005.
- THERRIEN, F.; DRAPEAU, V.; LUPIEN, S. J.; BEAULIEU, S.; DORÉ, J.; TREMBLAY, A.; RICHARD, D. Awakening cortisol response in relation to psychosocial profiles and eating behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 1–2, p. 282–288, 2008.
- TIELEMAN, B. I.; WILLIAMS, J. B.; RICKLEFS, R. E.; KLASING, K. C. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1573, p. 1715–1720, 2005.
- TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 0, p. 54–74, 2005.
- TSUTSUI, K.; MATSUNAGA, M.; UKENA, K. Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in the avian brain. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 63–78, 2003.
- TSUTSUI, K.; SAIGOH, E.; UKENA, K.; TERANISHI, H.; FUJISAWA, Y.; KIKUCHI, M.; ISHII, S.; SHARP, P. J. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 2, p. 661–667, 2000.
- TSUTSUI, K.; YAMAZAKI, T. Avian neurosteroids . I . Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. **Brain research**, v. 678, p. 1–9, 1995.
- UBUKA, T.; BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K. Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, p. 1–17, 2013.

- UKENA, K.; HONDA, Y.; INAI, Y.; KOHCHI, C.; LEA, R. W. Expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in different regions of the avian brain. **Brain research**, v. 8, n. 12, p. 536–542, 1999.
- VAILLANT, S.; DORIZZI, M.; PIEAU, C.; RICHARD-MERCIER, N. Sex reversal and aromatase in chicken. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, n. 7, p. 727–740, 2001.
- VERDERAME, M.; SCUDIERO, R. A comparative review on estrogen receptors in the reproductive male tract of non mammalian vertebrates. **Steroids**, v. 134, p. 1–8, 2018.
- VISWANATHAN, K.; DAUGHERTY, C.; DHABHAR, F. S. Stress as an endogenous adjuvant : augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. **International immunology**, v. 17, n. 8, p. 1059–1069, 2005.
- WACKER, D. W.; WINGFIELD, J. C.; DAVIS, J. E.; MEDDLE, S. L. Seasonal changes in aromatase and androgen receptor, but not estrogen receptor mRNA expression in the brain of the free-living male song sparrow, *Melospiza melodia* morphna. **Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 18, p. 3819–3835, 2010.
- WADA, Y.; OKANO, T.; ADACHI, A.; EBIHARA, S.; FUKADA, Y. Identification of rhodopsin in the pigeon deep brain. **FEBS Letters**, v. 424, n. 1–2, p. 53–56, 1998.
- WALKER, J. K.; DALE, A. R.; D'EATH, R. B. D.; WEMELSFELDER, F. Qualitative Behaviour Assessment of dogs in the shelter and home environment and relationship with quantitative behaviour assessment and physiological responses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 184, p. 97–108, 2016.
- WASSER, S. K.; BEVIS, K.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. **Conservation Biology**, v. 11, n. 4, p. 1019, 1997.
- WASSER, S. K.; HUNT, K. E. Noninvasive Measures of Reproductive Function and Disturbance in the Barred Owl , Great Horned Owl , and Northern Spotted Owl. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 109–137, 2005.
- WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U.; MILLSPAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and comparative endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 260–275, 2000.
- WASSER, S. K.; SHEDLOCK, A. M.; COMSTOCK, K.; OSTRANDER, E. A.; MUTAYOBA, B.; STEPHEN, M. Assigning African elephant DNA to geographic region of origin: Applications to the ivory trade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14847–14852, 2004.
- WATSON, R.; MUNRO, C.; EDWARDS, K. L.; NORTON, V.; BROWN, J. L.; WALKER, S. L. Development of a versatile enzyme immunoassay for non-invasive assessment of glucocorticoid metabolites in a diversity of taxonomic species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 186, p. 16–24, 2013.
- WEMELSFELDER, F. How animals communicate quality of life : The qualitative assessment of behavior. **Animal Welfare**, v. 16, p. 25–31, 2007.

- WEMELSFELDER, F.; HUNTER, E. A.; MENDEL, M. T.; LAWRENCE, A. B. The spontaneous qualitative assessment of behavioural expressions in pigs: First explorations of a novel methodology for integrative animal welfare measurement. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 67, n. 3, p. 193–215, 2000.
- WEMELSFELDER, F.; HUNTER, T. E. A.; MENDEL, M. T.; LAWRENCE, A. B. Assessing the ‘whole animal’: a free choice profiling approach. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 2, p. 209–220, 2001.
- WHITHAM, J. C.; BRYANT, J. L.; MILLER, L. J. Beyond glucocorticoids : Integrating dehydroepiandrosterone (DHEA) into animal welfare research. **Animals**, v. 10, n. 1381, p. 1–25, 2020.
- WIELEBNOWSKI, N. C.; FLETCHALL, N.; CARLSTEAD, K.; BUSO, J. M.; BROWN, J. L. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. **Zoo Biology**, v. 21, n. 1, p. 77–98, 2002.
- WILSTERMAN, K.; ALONGE, M. M.; ERNST, D. K.; LIMBER, C.; TREIDEL, L. A.; BENTLEY, G. E. Flexibility in an emergency life-history stage : acute food deprivation prevents sickness behaviour but not the immune response. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1929, p. 1–9, 2020.
- WINGFIELD, J. C.; MANEY, D. L.; BREUNER, C. W.; JACOBS, J. D.; LYNN, S.; RAMENOFSKY, M.; RICHARDSON, R. D. Ecological bases of hormone-behavior interactions : the " emergency life history stage ". **American Zoologist**, v. 38, n. 1, p. 191–206, 1998.
- WINGFIELD, J. C.; WACKER, D. W.; BENTLEY, G. E.; TSUTSUI, K. Brain-derived steroids , behavior and endocrine conflicts across life history stages in birds : a perspective. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, n. 270, p. 1–8, 2018.
- WINK, M.; EL-SAYED, A.-A.; SAUER-GÜRTH, H.; GONZALEZ, J. Molecular phylogeny of Owls (Strigiformes) inferred from DNA sequences of the mitochondrial cytochrome b and the nuclear RAG-1 gene. **Ardea**, v. 97, n. 4, p. 581–591, 2009.
- WINK, M.; SAUER-GÜRTH, H. Molecular taxonomy and systematics of owls (Strigiformes) - An update. **Airo**, v. 29, p. 487–500, 2021.
- WOOD, W. G. “Matrix Effects” in Immunoassays. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 51, n. S205, p. 105–112, 1991.
- YALOW, R. S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 200, n. 4347, p. 1236–1245, 1978.
- YU, G.; ZHANG, D.; LIU, W.; WANG, J.; LIU, X.; ZHOU, C.; GUI, J.; XIAO, W. Zebrafish androgen receptor is required for spermatogenesis and maintenance of ovarian function. **Oncotarget**, v. 9, n. 36, p. 24320–24334, 2018.
- ZAIN, S. Corrupting trade : An overview of corruption issues in illicit wildlife trade Key takeaways. **Targeting Natural Resource Corruption**, 2020.
- ZHANG, B. B.; SHEN, X.; LI, X. J.; TIAN, Y. B.; OUYANG, H. J.; HUANG, Y. M. Reference gene selection for expression studies in the reproductive axis tissues of Magang geese at different reproductive stages under light treatment. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.