

HENEILE NASCIMENTO CARVALHO

**MENSURAÇÃO E MONITORAMENTO DO ESTRESSE EM
QUEIXADAS (*Tayassu pecari*)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho

**ILHÉUS – BAHIA
2010**

C331

Carvalho, Heneile Nascimento.

Mensuração e monitoramento do estresse em queixadas (Tayassu pecari) / Heneile Nascimento Carvalho. – Ilhéus, BA: UESC, 2010.

xi, 54 f. : il.

Orientador: Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.
Inclui referências.

1. Animais – Comportamento. 2. Animal - Proteção. 3. Estresse (Fisiologia). 4. Estresse. 5. ACTH. 6. Tayassu pecari. 7. Queixada (Porco do mato). I. Título.

CDD 591.51

HENEILE NASCIMENTO CARVALHO

**MENSURAÇÃO E MONITORAMENTO DO ESTRESSE EM
QUEIXADAS (*Tayassu pecari*)**

Aprovada em 20 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho
UESC - Orientador

Profª. Drª. Maria Teresa da Silva Mota
UFRN - Examinadora

Profª. Dra. Selene Siqueira da Cunha Nogueira
UESC - Examinadora


Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho
Orientador

Dedico a Ti, Deus Supremo,
minha fonte de vida, luz, força e amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hélio e Luezir, que nunca me permitiram desanimar perante as dificuldades, Fauze e Maria José Haum, pela dedicação.

Aos meus avós Mário e Alvina (*in memoriam*), Valmir e Albertina, meus antepassados, agradeço pelos genes e todo o carinho.

Aos meus irmãos, Helder, Hanná e Nino, pelo apoio e paciência.

À minha sobrinha querida, Suri, pelo sorriso lindo.

Às minhas cunhadas Bruna e Cal e a todos os meus familiares, que me ajudaram ou mesmo não me atrapalharam, muito obrigada.

Ao meus amigos e respectivas famílias, que me trazem sempre amor, orações, alegrias, sorrisos, okiome, apoio, são sempre compreensivos com minha ausência e me deixam tantas saudades: Essiane, Fábio, Karine, Osanara, Gardenia, Poli Santos, Poliana, Pollyanna, Afonso, Jaquelinne Matos, Lela, Henrique, Ana Claudia, Flor, Tasky, Zana e outros tantos com quem já conversei e que também estimo.

Ao meu companheiro, amigo e namorado Getro Santa Rosa, por toda química, física, amor e compreensão.

Aos meus sogros, Getro e Netinha, pela feliz convivência.

Aos meus filhos do coração: o rato wistar BeeBill (*in memoriam*), o periquito Nino, cachorro Borat, capivara Isis e anta Alegria, pela oportunidade de exercitar o meu instinto materno.

Em especial, agradeço ao meu orientador, Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho, pela confiança em mim depositada, pela colaboração prestada durante todo o período em que decorreu este trabalho e principalmente pela exigência, flexibilidade, paciência, e companheirismo durante toda esta árdua jornada.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela organização e profissionalismo com os quais conduz o Curso de Mestrado em Ciência Animal.

Aos profissionais dos laboratórios; de Biotecnologia e genética da UESC e de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal – RN.

À UESB, pelo apoio e de maneira especial ao professor Sérgio Fernandes pelas dicas.

Ao querido colega Marco Antonio Galvão de Carvalho, pela colaboração durante os procedimentos experimentais e pelo sentimento de irmão.

Ao seu Messias, o tratador, pela ajuda na lida com os animais, com sua experiência e alegria, todos os dias.

Aos meus queridos sujeitos experimentais: 1, 2, 3, 4, 5 e 6, sem os quais não seria possível a realização do experimento.

Aos profissionais e alunos da FTC EaD de Ilhéus, curso de Biologia, pela oportunidade profissional e amizade.

Agradeço a Prefeitura Municipal de Itapetinga, nas pessoas de: José Carlos Moura, Valdeir, Paulo Geovane e Carlos Leoncio, à COMUTRAN e à Secretaria Municipal de Meio Ambiente - Parque Zoomatinha, pela oportunidade de emprego, pela permissão de minha indisponibilidade em alguns momentos e principalmente pela experiência de vida.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que tudo ocorresse da melhor maneira possível agradeço humildemente, muito obrigada!!

“ Perguntaram ao Dalai Lama:

- *O que mais te surpreende na Humanidade?*

E ele respondeu:

- *Os homens... Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem dinheiro para recuperar a saúde.*

E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido”.

MENSURAÇÃO E MONITORAMENTO DA RESPOSTA DO ESTRESSE EM QUEIXADAS (*Tayassu pecari*)

RESUMO

O estresse pode afetar a reprodução de queixadas (*Tayassu pecari*) em cativeiro. Observações comportamentais em conjunto com a mensuração de metabólitos de glicocorticóides (MGlc) fecais, podem fornecer medidas efetivas para monitorar a resposta de estresse. Esta possibilidade foi testada através do desafio do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Foram testados três tratamentos: 0,25 e 0,50mg/100kg de peso vivo de ACTH, e solução salina como controle em seis queixadas machos adultos através de delineamento de quadrado latino. Os tratamentos foram aplicados com injeção intramuscular após a imobilização dos animais às 09h:00 nos dias de desafio. As fezes foram coletadas desde 72 horas antes da aplicação dos tratamentos até 120 horas após esta aplicação. No mesmo período, em sessões diárias individuais com 15 minutos de duração, foi feito o registro contínuo do comportamento do animal focal, e determinada a duração dos padrões comportamentais indicadores de estresse. Para dosagem hormonal, amostras das fezes foram liofilizadas, e posteriormente, passaram por extração dos metabólitos, através de hidrólise e análise pelo método imunoenzimático (ELISA). Os dados da variação da concentração hormonal durante o período experimental e da ocorrência e tempo de duração dos comportamentos indicadores de estresse foram comparados através de ANOVA de medidas repetidas, seguidas do teste *post hoc* Duncan. Os queixadas permaneceram mais tempo nos estados comportamentais indicadores de estresse no dia de aplicação dos tratamentos. No período que antecedeu aos desafios a concentração dos MGlc fecais foi de 160,5 (DP = 61,2) ng g⁻¹. Os animais atingiram o pico de excreção de MGlc fecais 24 horas após a aplicação da maior dose de ACTH seguido por um declínio. Este mesmo pico de excreção de MGlc foi observado nas fezes dos queixadas coletadas até 24 horas após aplicação da menor dose de ACTH, mas a concentração destes metabólitos não diferiu da encontrada nas fezes dos animais quando receberam solução salina cuja concentração permaneceu aproximadamente constante durante todo o estudo. Portanto, a concentração de MGlc fecais reflete a atividade adrenal em queixadas e juntamente com observações comportamentais pode ser usada para monitorar o estresse nessa espécie.

Palavras-chave: bem-estar animal, comportamento animal, estresse, fisiologia do estresse, Tayassuidae, teste de desafio ACTH.

STRESS ASSESMENT IN WHITE-LIPPED PECCARY (*Tayassu peccary*)

ABSTRACT

Under captivity the *Tayassu pecari* face challenges that may adversely affect their reproduction. Behavioral patterns together with fecal glucocorticoid metabolite concentrations may reflect animals' stress. We tested this possibility by using an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) challenge in a fecal glucocorticoid assay. We tested the effects of three treatments: 0.25 or 0.50 mg 100kg⁻¹ ACTH, and saline solution as a control in six captive adult male white-lipped peccaries in a Latin Square design. We immobilized the animals and injected (I.M.) the treatments at 9:00AM of the challenge days. The feces were collected beginning 72 h before to and ending 120 h after injections. During the same period, we also observed each individual daily for 15-min with the continuous-recording on focal animal sampling sessions to evaluate some behavioral patterns to assess animal welfare. Feces were freeze-dried, extracted by an ethanol vortex method, and assayed for glucocorticoids using enzyme immunoassay (ELISA). We compared the fecal glucocorticoids among the treatments and the behavioral measures by repeated measures ANOVA followed by Duncan tests. The peccaries remained more time on behavioral patterns indicators of stress at the challenge day ($F_{8, 120}=9.5$, $P=0.00001$). During the pre-challenge periods the glucocorticoid concentration was 160.5 (SD = 61.2) ng g⁻¹. The 0.50 mg 100kg⁻¹ ACTH group reached an excretion peak of fecal glucocorticoids metabolites 24-h post treatment, after which declined, while the saline group remained relatively constant. Therefore, the fecal glucocorticoid metabolites assay reflects endogenous adrenal activity in the white-lipped peccary, such adrenocortical metabolites, together with behavioral observations, will provide an objective way to measure and monitor stress in this species.

Keywords: ACTH challenge test, animal welfare, animal behavior, Tayassuidae, wellbeing.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1. Características da espécie.....	12
1.2. Importância econômica do queixada.....	15
1.3. Bem-estar animal e fisiologia do estresse: síntese de glicocorticóides.....	16
1.4. Metabolismo e excreção de glicocorticóides.....	21
1.5. Métodos e técnicas de dosagem hormonal.....	22
1.6. Critérios para escolha das técnicas de monitoramento.....	24
1.7. Testes de validação fisiológica através do desafio de ACTH.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
Artigo: Acessando o estresse em queixadas (Mammalia, Tayassuidae)*.....	39
Resumo.....	39
1.Introdução.....	40
2.Métodos.....	42
2.1.Local do estudo e sujeitos experimentais.....	42
2.2.Procedimentos e coleta de amostras fecais.....	42
2.3.Conservação e processamento das amostras.....	43
2.4.Extração e dosagem.....	43
2.5.Coleta de dados comportamentais.....	44
2.6.Análises estatísticas.....	45
3.Resultados.....	46
4.Discussão.....	47
Referências.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição de padrões comportamentais de queixadas durante o teste de desafio de ACTH.

47

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. *Tayassu pecari* 13

Figura 2. Regulação da secreção de glicocorticóide mediante estímulo estressor. 19

Artigo

Fig. 1. Diferenças ($\pm$ EP) na concentração de metabólitos de glicocorticóides nas fezes secas de queixadas no período após a aplicação dos tratamentos. 56

Fig. 2. Duração média ($\pm$ EP) em segundos de permanência dos queixadas em estados indicadores de estresse ao longo do tempo em relação à contenção e aplicação dos tratamentos (desafio). 57

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Características da espécie

O *Tayassu pecari*, popularmente conhecido como queixada, é encontrado em diversas regiões do país, é um mamífero da ordem Artiodactyla, faz parte da família Tayassuidae, especificamente americana. Pertencentes a esta família também são o caititu ou cateto (*Pecari tajacu*) e o taguá (*Catagonus wagneri*) (MAYER; WETZEL, 1987). Os queixadas possuem uma distribuição que se estende do sul do México ao nordeste da Argentina (DEUTSCH; PUGLIA, 1990; FRAGOSO, 1994; MARCH, 1996; FRAGOSO, 1998; SOWLS, 1997).

Os pecaris possuem cabeça triangular longa, desproporcionalmente grande em relação ao corpo, e pescoço curto (FOWLER, 1993; SOWLS, 1997). O sentido da visão nestes animais é pouco aguçado, no entanto, o bom olfato compensa esta deficiência (FOWLER, 1993). O disco nasal é semelhante ao do porco doméstico (*Sus scrofa*), achatado, móvel, suportado por um osso rostral, conectado aos ossos nasais por uma cartilagem e movido por uma musculatura bem desenvolvida (FOWLER, 1993; SOWLS, 1997).

As pernas do queixada são consideradas finas e seus pés, relativamente pequenos, quando comparados às suas proporções corporais (SOWLS, 1997). Apresenta coloração de pelagem que varia do marrom avermelhado ao escuro, para filhotes e animais jovens, chegando até o preto forte, quando adultos (MAYER; WETZEL, 1987). A pelagem do dorso é constituída de cerdas resistentes que provavelmente proporcionam ao animal uma proteção externa eficaz contra lesões na pele, quando o animal abre espaço na vegetação (SOWLS, 1997). O queixada adulto tem uma mancha de pelos brancos sob a mandíbula (Fig. 1).



Figura 1. *Tayassu pecari*

Na região dorsal central, a 12cm da base da cauda, apresenta uma glândula de cheiro, que libera uma substância de coloração leitosa, usada para marcação social (NOWAK, 1991; BODMER; SOWLS, 1993; SOWLS 1997). Da cabeça à cauda, os queixadas adultos medem entre 0,95 a 1,40m de comprimento, e podem alcançar até 0,6m de altura (MAYER; BRANDT, 1982; Mayer; WETZEL, 1987).

O período gestacional varia de 156 a 162 dias, podendo nascer de um a quatro filhotes por parto, com média de 1,6 filhotes, com ocorrência de partos durante o ano todo (ROOTS, 1966; Mayer; WETZEL, 1987). Machos e fêmeas iniciam sua vida reprodutiva em torno dos 14 meses de idade e podem viver até 13 anos em cativeiro. O estro lactacional pode ocorrer a partir do sexto dia após o parto (NOGUEIRA FILHO; LAVORENTI, 1997; SOWLS, 1997). Nos membros da família Tayassuidae não há dimorfismo sexual aparente, com exceção da presença do escroto, visível quando observados a curta distância (SOWLS, 1997; NOGUEIRA-FILHO; LAVORENTI, 1997, MARGARIDO, 2001; JACOMO, 2004).

A fórmula dentária dos Tayassuidae consiste em dentes incisivos 2-2/3-3; caninos 1-1/1-1; molares 3-3/3-3; e pré-molares 3-3/3-3, totalizando 38 dentes (HERRING, 1972; KILTIE, 1989; SOWLS, 1997). Os caninos são bastante desenvolvidos, extremamente afiados e visíveis, utilizados como arma de defesa em combates interespecíficos e como instrumento acústico, para gerar estalos altos, às vezes ameaçadores (HERRING, 1972; SOWLS, 1997). A oclusão dos dentes caninos evita que a mandíbula se desloque quando os animais mastigam sementes e castanhas muito duras (HERRING, 1972; KILTIE, 1981b; KILTIE; TERBORGH, 1983).

Os queixadas são considerados onívoros, por eventualmente se alimentarem de pequenos vertebrados e alguns invertebrados, mas a maior parte de sua alimentação é constituída por frutos, raízes e sementes (OLMOS, 1993; BARRETO *et al.*, 1997; Mayer; WETZEL, 1987; KILTIE 1981a; BODMER, 1990; KEUROGHLIAN *et al*, 2004). Possuem pré-estômago (SOWLS, 1997), semelhante ao de animais ruminantes, com microorganismos celulolíticos que realizam a fermentação da celulose e demais constituintes da parede celular das células vegetais, o que possibilita o aproveitamento de alimentos volumosos (MORAES, 1992).

Estes pecaris requerem grandes áreas florestadas pouco alteradas para sobreviver. Sua área de uso varia de 60 a 200km² de extensão percorrida periodicamente pelos membros do grupo (KILTIE; TERBORGH, 1983; NOWAK, 1991; MARCH, 1996; SOWLS, 1997; KEUROGHLIAN, 2003; JÁCOMO, 2004). Esta espécie desloca-

se muito para se alimentar dos frutos de buriti (*Mauritia flexuosa*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e de outras palmeiras sendo, por este motivo, considerada migratória para alguns autores (KILTIE, 1981b; KILTIE; TERBORGH, 1983; BODMER, 1990; FRAGOSO, 1992; SOWLS, 1997). Na realidade a espécie não migra, mas visita constantemente toda a sua extensa área de vida em busca de recursos alimentares para os integrantes de seus grupos (FRAGOSO, 1992; 1994; SOWLS, 1997; FRAGOSO, 1998, 1999; KEUROGHLIAN; EATON, 2008).

Gregários, os queixadas chegam a formar bandos grandes que podem apresentar de 50 a 200 indivíduos, compostos de animais de ambos os sexos, de diversas idades (KILTIE; TERBORGH, 1983; MARCH, 1996; SOWLS, 1997; FRAGOSO, 1998; JACOMO, 2004). A vida em grupos grandes permite uma opção de defesa contra predadores (KILTIE, 1981; KILTIE; TERBORGH, 1983; SOWLS, 1997). São animais diurnos e em cativeiro adaptam as suas atividades aos horários de manejo ou a influências externas (NOGUEIRA-FILHO; LAVORENTI, 1997).

O *Tayassu pecari* possui ampla variedade de comportamentos sociais, sendo notadas entre os indivíduos comunicação por meio de vocalizações, posturas corporais e estímulos olfativos (DUBOST, 1997; NOGUEIRA-FILHO, 1999; DUBOST, 2001). Frequentemente interagem socialmente, através de comportamentos agonísticos e amigáveis. Estes últimos, utilizados geralmente para manutenção da coesão entre os membros do grupo. Apresentam uma hierarquia de dominância social linear, e o grupo, geralmente é liderado por um macho *alfa* (NOGUEIRA-FILHO *et al*, 1999; DUBOST, 2001). Nesta hierarquia os animais mais pesados são os mais dominantes e os indivíduos mais submissos têm menor acesso aos recursos alimentares e, muitas vezes permanecem na periferia dos grupos (NOGUEIRA-FILHO *et al*, 1999). Os postos são estabelecidos e mantidos através de conflitos ritualizados e por uma gama complexa de sinais de comunicação entre os membros do grupo (NOGUEIRA-FILHO *et al*, 1999; DUBOST, 2001).

O estabelecimento de uma hierarquia, apesar de permitir aos indivíduos dominantes a prioridade ao acesso de recursos limitados, reduz os níveis de agressão no grupo. Esta organização pode beneficiar os integrantes do grupo porque evitam interações potencialmente custosas (FOURNIER; FESTA-BIANCHET, 1995).

1.2. Importância do queixada

Os queixadas desempenham um importante papel na organização das florestas tropicais, pois atua na distribuição, densidade e composição das comunidades de plantas ao preda algumas espécies e dispersar outras (TERBORGH, 1986; BODMER, 1991; FRAGOSO, 1994; 1998). Além disso, nos países Neotropicais, a fauna silvestre é uma fonte importante de proteína animal para a subsistência de populações que dependem dos recursos florestais para sua sobrevivência (ROBINSON; REDFORD, 1991).

Além da carne, a pele de pecaris tem importância econômica para muitos habitantes do Neotrópico (BODMER, 1999; ALTRICHTER; ALMEIDA, 2002). De 1946–1966, mais de 800 000 peles de queixadas foram exportadas de Iquitos, Peru, para países europeus (FANG *et al.*, 2008). Alemanha, França, Itália, Áustria e Suíça, são os maiores importadores da pele destes animais para a confecção de artigos de couro como luvas (FANG *et al.*, 2004). Na última década o tráfico de couro de pecaris declinou na América Latina. Atualmente, o Peru é o único país que exporta legalmente em torno 35 000 couros de pecaris, caititus e queixadas, por ano (FANG *et al.*, 2008).

Para diminuir os efeitos da caça de queixadas estão sendo propostas reservas de grande porte e a sua criação em cativeiro, e posterior soltura, para repor as perdas pela caça (PRIMAC; RODRIGUES, 2001). A caça desses animais e de outras espécies cinegéticas dos Neotrópicos, contudo, não garante a segurança alimentar dessas populações devido a sua baixa produtividade em ambiente natural (ROBINSON; BENETT, 2000). No Brasil, o aproveitamento de espécies silvestres, como os queixadas, tem sido feito através da caça ilegal que, associada à destruição de habitats, tem causado a perda desses recursos naturais (ROBINSON; REDFORD, 1991). Por estes motivos, a criação destes pecaris em cativeiro é apontada como alternativa para a produção de proteína animal e até mesmo como alternativa econômica (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 2004).

Os queixadas apresentam potencial zootécnico devido à sua facilidade de adaptação ao cativeiro, seu rápido crescimento, podendo atingir 45 kg em cativeiro, chegando à idade para o abate a partir dos 10 meses com 22 a 25 kg de peso vivo (NOGUEIRA-FILHO, 1999), e hábitos alimentares que permitem sua criação com recursos alimentares disponíveis localmente (MORAES, 1992; ALTRICHTER, 1999). Adicionalmente, devido ao fato de serem gregários e formarem grandes grupos mistos, podem ser feitas grandes criações aproveitando-se áreas marginais das propriedades

agrícolas (NOGUEIRA-FILHO; LAVORENTI, 1997). Produzem carne com baixos teores de gordura, que a torna uma alternativa mais saudável à carne de suínos, e sua pele, fina e resistente para confecção de luxuosas peças finas de couro (NOGUEIRA-FILHO; LAVORENTI, 1997).

1.3. *Bem-estar animal e fisiologia do estresse: síntese de glicocorticóides*

A densidade populacional e a extensão de áreas de criação de queixadas podem afetar seu bem-estar e produção em cativeiro, visto que se reproduzem facilmente densidades de um indivíduo para 200 a 250m² (NOGUEIRA-FILHO; LAVORENTI, 1997; MANGINI, 1999). Enquanto em zoológicos e outros locais que os mantêm em pequenas áreas, abaixo de 6m² por indivíduo, estes animais apresentam dificuldade de reproduzir, além de haver registro de mortes de adultos e infanticídios (SOWLS, 1997; NOGUEIRA *et al.*, 1999). Conseqüentemente, instalações e práticas de manejo inadequadas podem ser consideradas agentes estressores e afetar a produtividade da espécie.

Uma preocupação atual é a diminuição destas situações adversas do cativeiro nas criações de espécies silvestres de potencial zootécnico. Neste contexto, o bem-estar animal tem importância crucial para produção de animais silvestres e a busca de mecanismos para monitorar e reduzir o estresse é um de seus pré-requisitos. O bem-estar animal é o “estado de harmonia entre o animal e seu ambiente, caracterizado por condições físicas e fisiológicas ótimas e alta qualidade de vida do animal” (BROOM; JOHNSON, 1983; BROOM; MOLENTO, 2004). O animal em boas condições de bem-estar possui suas necessidades fisiológicas, comportamentais, físicas e psicológicas atendidas e caso o organismo falhe ou tenha dificuldade em se adaptar ao ambiente, isto é uma indicação de bem-estar empobrecido que pode gerar estresse (MORBERG, 2000).

Apesar de ultimamente ser bastante discutido e utilizado, geralmente associado a eventos negativos, o conceito de estresse ainda permanece incerto (MORBERG, 2000). Tal conceito foi estabelecido pela primeira vez na medicina e na biologia por Hans Selye em 1936, baseado na observação de que diferentes condições físicas e psicológicas desestabilizam a homeostase do organismo e geram um conjunto de alterações corporais que caracterizam a “Síndrome Geral de Adaptação” (NEYLAN, 1998; GRAEF, 2003). Nesta síndrome, os agentes estressores, como hipoglicemia, frio,

exercício muscular, fome, sede dentre outros, provocam a atividade neuroendócrina do sistema nervoso autônomo simpatoadrenal, que resulta na secreção de catecolaminas a partir da medula adrenal. As catecolaminas, epinefrina e norepinefrina, são as responsáveis pelas respostas emocionais relacionadas ao estresse e provocam a reação física imediata do organismo através da ampliação das taxas de sístole cardíaca e respiratória, da vasoconstrição das veias sanguíneas e da contração muscular (LINGLE; PELLIS, 2002). Estas reações físicas são desencadeadas pela elevação imediata na concentração do cálcio no citosol que acompanha a secreção destes hormônios (LAY JR, 2002; GRAEF, 2003).

Quando as fibras ganglionares colinérgicas no grande nervo esplâncnico são ativadas por um estímulo estressor, o neurotransmissor acetilcolina é liberado pelas terminações nervosas (ETTINGER; FELDMAN, 1997). Esta liberação desencadeia a despolarização das membranas das células cromafins da medula supra-renal, aumentando sua permeabilidade ao sódio. Por sua vez, esta despolarização induz ao influxo de íons cálcio, que estimula a abertura dos grânulos secretórios e consequente liberação de catecolaminas na circulação sanguínea (LANSBERG; YOUNG, 1992). A secreção das catecolaminas pela medula supra-renal representa parte integrada da reação de 'luta ou fuga', evocada pela estimulação do sistema nervoso simpático (LINGLE; PELLIS, 2002). Um animal nesse estado decide se fica e luta ou se foge, quase que instantaneamente. Nos dois casos, a reação de alarme simpática faz com que as atividades subsequentes desse animal sejam bem mais intensas (GUYTON; HALL, 2006).

Quando um estímulo atua sobre os sentidos do animal, o sistema nervoso periférico aferente o recebe e o transporta às áreas sensitivas do sistema nervoso central. Diante deste estímulo, o sistema nervoso simpático e o eixo CRH hipotalâmico-ACTH hipofisário-cortisol supra-renal operam conjuntamente, em busca de diminuir seu impacto (GUYTON; HALL, 2006).

Em resposta a um estímulo estressor (Fig. 2), o sistema nervoso simpático incentiva o hipotálamo a liberar o hormônio corticotrófico (CRH). Este hormônio atua na hipófise, induzindo à secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Por sua vez, o ACTH ativa o córtex adrenal para produção dos hormônios glicocorticóides – cortisol ou corticosterona, e a elevação dos seus níveis plasmáticos incrementa os níveis plasmáticos das catecolaminas (ETTINGER; FELDMAN, 1997; GONZALEZ; SILVA, 2003; LANE, 2006).



Figura 2. Regulação da secreção de glicocorticóides mediante estímulo estressor.
Fonte: Adaptado de SAPOLSKI *et al.* (2000)

Tanto as catecolaminas quanto os glicocorticóides são hormônios produzidos e liberados no organismo em situação de estresse. Todavia, as catecolaminas são hormônios com uma porção amina e de grande afinidade com água, o que a torna uma substância instável e dificulta sua extração para sua determinação. Outro motivo que também dificulta sua extração é a rapidez com que as catecolaminas são degradadas nos diversos tecidos, onde têm pequena duração de ação. Já os glicocorticóides, hormônios esteróides, são lipossolúveis, podendo ser extraídos com maior facilidade e possuem vida útil mais durável devido à maior estabilidade da sua composição química (GONZÁLEZ; SILVA, 2003). Adicionalmente, a secreção dos glicocorticóides aumenta em resposta a qualquer tipo de estresse sofrido pelo animal (TOUMA; PALME, 2004). Por este motivo, estes hormônios podem ser utilizados como parâmetros para monitoramento da atividade adrenal e de distúrbios de resposta da glândula adrenal (MORTON *et al.*, 1995; MOSTL; PALME, 2002).

Os efeitos dos glicocorticóides são diversos e amplos, tais como: alterações no metabolismo de carboidratos (estímulo da gliconeogênese – produção de glicose a partir de proteínas e outras substâncias, diminuição da utilização da glicose pelas células, elevação da glicemia e do diabetes supra-renal), de lipídios (mobilização dos ácidos graxos e utilização para fornecimento de energia, desenvolvimento de cetose e obesidade com deposição de gordura excessiva no tórax e na cabeça) e de proteínas (redução de reservas protéicas celulares, aumento da proteína hepática e das proteínas plasmáticas, aumento dos níveis sanguíneos de aminoácidos, redução do transporte de aminoácidos para as células extra-hepáticas e maior transporte para as células hepáticas) e manutenção da homeostase nos sistemas: cardiovascular, imunológico, endócrino, do

rim, da musculatura esquelética, do sistema endócrino e do sistema nervoso (GUYTON; HALL, 2006). Além disso, aceleram o catabolismo permitindo a utilização da energia disponível para o reparo de danos sofridos pelo organismo (GRAEFF, 2007), influenciam no metabolismo da glicose incrementando seu nível no sangue, aceleram a degradação de proteínas e possuem diversos efeitos antiinflamatórios e conseqüentemente, reduzem as respostas corporais às lesões teciduais pelo bloqueio da maioria dos fatores que promovem a inflamação (MORMEDE *et al.*, 2007).

Em um estado prolongado de estresse estas mudanças tornam-se patológicas com a posterior atrofia do timo, que é importante órgão do sistema imunológico (BOHUS, 1986; SAPOLSKY *et al.*, 2000; LAY JR, 2002) e outra possível alteração é a hipertrofia da camada cortical da glândula adrenal, que secreta na circulação sanguínea os hormônios corticóides - mineralocorticóides e glicocorticóides (GRAEFF, 2003). Contudo, os glicocorticóides são liberados pelo organismo não somente em resposta ao estresse, mas também em situações de ajustes fisiológicos às diferentes exigências biológicas que ocorrem durante o ciclo de vida, como por exemplo, crescimento, gestação e lactação, alterações denominadas estados de alostasia (KORTE *et al.*, 2007; LANDYS *et al.*, 2006).

De maneira geral, a resposta de estresse pode ser dividida em três fases: alarme, resistência e esgotamento. Na fase de alarme ou excitação, ocorre o reconhecimento do estímulo estressor pelo organismo, e é caracterizada pelo aumento da capacidade orgânica de resposta, com ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), que desencadeiam a secreção de catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) e de glicocorticóides (LUNDBERG, 2000; McEWEN, 2000a). Caso o estímulo seja mantido, ocorre um aumento do catabolismo e produção de energia (MORMEDE *et al.*, 2007), a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos durante a fase seguinte, denominada fase de resistência.

Quando a adaptação não ocorre, o animal entra na fase de esgotamento ou exaustão, os níveis elevados de glicocorticóides passam a ter efeitos deletérios ao organismo, como: redução das taxas de crescimento e de reprodução, que leva à infertilidade e supressão da resposta imunológica, tornando o indivíduo suscetível a distúrbios renais, cardiovasculares, gastrintestinais e/ou imunológicos. Tais efeitos levam ao aumento no número de animais doentes e eventuais mortes (LUNDBERG, 2000; MCEWEN, 2000a; LAY Jr, 2002).

Sob estresse os indivíduos também podem apresentar alguns comportamentos excessivos e exagerados – estereotípias. Estes são comportamentos repetitivos sem função ou objetivo aparente, que atuam como indicadores de estresse (MASON, 1991; DAWKINS, 2003), e podem ser causados por efeitos fisiológicos, desencadeados pela exposição aos agentes estressores, tais como: dor, fome, sede, condições extremas de temperatura (calor/frio), entre outros agentes prejudiciais à saúde, tais como endoparasitas (NEYLAN, 1998; LAY Jr, 2002).

1.4. Metabolismo e excreção de glicocorticóides

Depois de seu catabolismo no fígado, os esteróides são eliminados na urina ou biliar como conjugados. No intestino estes metabólitos podem ser reabsorvidos pela circulação entero-hepática ou são desconjugados por bactérias e eliminados metabólitos de glicocorticóides livres em pequenas proporções através das fezes ou urina (SHILLE, 1990; BROWNIE, 1992; NORRIS, 1997; KEAY, 2006). O período entre a circulação dos esteróides no plasma e sua detecção nas amostras de urina é curto, menos do que 5 horas. Por outro lado, os metabólitos dos glicocorticóides fecais têm um tempo que se aproxima do período necessário para a passagem intestinal da bile pelo reto, sendo este período de 12 a 24 horas em ruminantes e de 24 a 48 horas em animais de ceco funcional (PALME *et al.*, 1996; SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996).

O metabolismo de glicocorticóides já foi descrito para algumas espécies tais como coelho (*Oryctolagus cuniculus*), rato (*Rattus norvegicus*), camundongo (*Mus musculus*), preá (*Cavia porcellus*) e carneiro (*Ovis aries*) (HAN *et al.*, 1983; PALMER, 1997; SENCIAL, 1992; QUINKLER 1998; BREUER *et al.*, 2004). Na maioria dos mamíferos, como por exemplo, cães domésticos (*Canis familiaris*), sagüis (*Callithrix jacchus*) e bovinos (*Bos taurus*), o cortisol é o principal glicocorticóide circulante (SCHATZ; PALME, 2001; BREUER *et al.*, 2004; SOUZA; ZIEGLER, 1998; SALTZMAN *et al.*, 2004). A corticosterona, por sua vez, é encontrada com maior frequência em aves, como a coruja pintada da América do Norte (*Strix occidentalis caurina*) e em roedores e lagomorfos (PIHL; HAU, 2003; KEAY *et al.*, 2006; WASSER *et al.*, 2000).

Os níveis plasmáticos de glicocorticóides apresentam ritmo circadiano e as concentrações basais variam não só em diferentes horas do dia, mas também entre espécies e indivíduos da mesma espécie (MC EWEN *et al.*, 1996; RUIS *et al.*, 1997;

HUBER, 2003b). Goyman e Wingfield (2004) declaram que o cortisol tem sido o hormônio de eleição para o estudo do estresse e bem-estar animal, considerando que alta concentração plasmática de cortisol implica em quebra da homeostase ou ausência do bem-estar, sendo esta relação observada em trabalhos com suínos (*Sus scrofa*), vicunhas (*Vicugna vicugna*) e onças (*Panthera onca*) (RUIS *et al.*, 1997; BONACIC *et al.*, 2003; MORATO *et al.*, 2004).

O metabolismo e excreção dos hormônios esteróides diferem entre as espécies, e por essa razão todo monitoramento endócrino deve ser antecipadamente validado para cada espécie antes de sua aplicação (SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996; TOUMA; PALME, 2005). É necessário identificar a rota de excreção, mais importante para as espécies de interesse, se via fezes ou via urina, bem como, o tipo de glicocorticóide (cortisol ou corticosterona) e proporção de metabólitos presentes nas amostras para marcação enzimática ou radioativa dos glicocorticóides, para posterior realização de técnicas de cromatografia e imunoanálises (WASSER *et al.*, 2000; KHAN, 2002).

1.5. Métodos e técnicas de dosagem hormonal

A crescente preocupação com o bem-estar animal nas últimas décadas levou a um aumento da consciência das necessidades de monitorar e reduzir o estresse nos animais (BROOM *et al.*, 1991), estendendo-se tanto aos domésticos de companhia quanto aos de produção, além de animais silvestres mantidos em cativeiro ou manejados em vida livre. E para tanto tem sido utilizados métodos para estudos comportamentais e fisiológicos principalmente através de medidas hormonais. As principais técnicas utilizadas para dosagem hormonal são: rádioimunoensaio - RIE e Ensaio de imunoabsorção enzimático - ELISA (JERICÓ *et al.*, 2002; DEHNHARD *et al.*, 2003). Estes métodos possuem a capacidade de mensurar pequenas porções de hormônios em diversos fluídos biológicos, sendo acuradas e precisas para avaliar os níveis hormonais das variadas espécies, devendo levar em conta os equipamentos disponíveis, técnicas e exigências de cada método (JERICÓ *et al.*, 2002; MOSTL *et al.*, 2005).

Os métodos atuais utilizam ensaios imunológicos de competição, nos quais o hormônio a ser quantificado (antígeno presente na amostra) deve competir com um antígeno marcado, por uma quantidade limitada de anticorpo específico para o hormônio analisado. Por sua vez, o rádioimunoensaio é uma técnica imunológica que utiliza moléculas marcadas com radioisótopos para detectar antígenos ou anticorpos em

uma determinada amostra (urina, extrato fecal, soro etc.). O RIE é baseado na observação de que a reação entre anticorpos e antígenos solúveis, em condições ótimas, forma um precipitado de antígenoanticorpo ou um agregado insolúvel (JERICÓ *et al.*, 2002). O método de RIE incorpora uma reação de ligação competitiva, na qual uma quantidade fixa de antígeno rádio-marcado e antígeno da amostra competem por um número limitado de sítios de ligação de anticorpos específicos. Ambos os antígenos, marcados e não marcados, ligam-se ao anticorpo e formam complexos precipitáveis.

Os antígenos marcados livres e os ligados ao anticorpo, então, são separados por centrifugação, decantação etc., antes de se mensurar a radioatividade dos radioisótopos ligados. A concentração de antígeno nas amostras testadas é inversamente proporcional à quantidade de radioatividade na fração ligada (JERICÓ *et al.*, 2002). As vantagens do RIE são: a alta sensibilidade para detectar antígenos em concentrações inferiores e a praticidade quando muitas amostras são testadas em conjunto. Na maioria dos kits de RIE, os tubos já possuem forração com o anticorpo específico, diminuindo assim a quantidade de pipetagens a serem realizadas e facilitando o processo de separação (JERICÓ *et al.*, 2002). As desvantagens deste método são: a utilização do radioisótopo ¹²⁵I que exige licença e instalações adequadas para sua manipulação e descarte, ocasionando ainda, problemas de armazenamento e, principalmente, o perigo de exposição à sua radiação.

O método ELISA é semelhante ao RIE, no entanto, ao invés de um radioisótopo, usa um marcador enzimático, no qual o antígeno (ou anticorpo) está ligado a uma fase sólida, isto é uma placa de microtitulação (JERICÓ *et al.*, 2002). A vantagem das técnicas de ensaio imunoenzimáticas, que utilizam enzimas para a marcação do anticorpo, é o não emprego de materiais e equipamentos radioativos, de custos elevados, que podem causar contaminação pessoal e ambiental e necessitam de licenças especiais para serem utilizadas (JERICÓ *et al.*, 2002). Ambas as técnicas possuem suas necessidades, no entanto, as exigências apresentadas no uso de ELISA são menores que as encontradas na utilização do RIE. Técnicas imunoenzimáticas têm sido usadas de maneira eficaz para mensurar o nível de metabólitos glicocorticóides em diversas espécies, sendo considerado um método prático por permitir uma análise conjunta de uma grande quantidade de amostras (PEREIRA, 2007). Todavia, ambos os métodos apresentam desempenhos semelhantes na avaliação da função adrenal (JERICÓ *et al.*, 2002).

Tanto as diferenças no metabolismo de esteróides nas espécies quanto à ação da microflora intestinal ocasionam a apresentação de múltiplos metabólitos nas fezes e na urina, com pouquíssima quantidade de cortisol puro. Em decorrência disto, testes que utilizam anticorpos de glicocorticóides muito específicos podem dar resultados relativamente baixos (WASSER *et al.*, 2000).

1.6. Critérios para escolha das técnicas de monitoramento

A contenção física de animais silvestres para coleta de sangue eleva rapidamente, em 5 a 10 minutos, os níveis basais dos corticóides plasmáticos e alcança níveis elevados em 30 a 60 minutos (SAPOLSKY, 1982; MILLSPAUGH *et al.*, 2001). Esta elevação dificulta a mensuração destes hormônios interferindo nos resultados obtidos, por não refletir o perfil do animal (FERRE *et al.*, 1998; YOUNG, 2004).

Amostragens seriadas, como estudos sobre a atividade endócrina que requer coleta repetida de amostras, e podem apresentar um efeito acumulativo do estresse causado pelo manejo, além de aumentar o risco de flebite (vaso periférico de difícil punção) (CHELINI, 2006). Por este motivo, a mensuração por amostras de sangue se realiza mais frequentemente em animais domésticos. Para espécies silvestres é recomendado uso de métodos não invasivos através, por exemplo, da mensuração retrospectiva dos metabólitos nas fezes e urina (WASSER *et al.*, 2000; OSTNER *et al.*, 2002; TOUMA; PALME, 2004) ou que permita mensurar secreção imediata dos corticóides, como na saliva (BERG; WYNNE-EDWARDS, 2002; MASO *et al.*, 2004), ou ainda métodos pouco invasivos tais como bulbo de pelos e penas (SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996; WASSER, 2000; COOK, 2002). Estes dados podem ser usados para estudar a relação entre os níveis hormonais e o comportamento dos animais em todos os táxons (WASSER *et al.*, 2000). Tais técnicas não invasivas têm sido utilizadas, por exemplo, para analisar estresse social (GOYMANN *et al.*, 2001), efeitos do estresse ambiental (CREEL *et al.*, 1996), ciclos reprodutivos (CURTIS; ZALD *et al.*, 2000) e dominância social (SANDS; CREEL, 2004; LANGMORE *et al.*, 2002).

A diminuição no sofrimento provocado aos animais certamente é o principal motivo para o uso destas técnicas não invasivas para avaliar o bem-estar e outras condições fisiológicas (YOUNG *et al.*, 2004). A medida retrospectiva permitida pela mensuração dos metabólitos de corticóides fecais pode representar a média na produção

hormonal durante um prazo considerável, como não há manipulação do animal, não há alteração dos níveis obtidos no dia da coleta, o que é vantajoso para hormônios pulsáteis como os corticóides (SCHATZ; PALME, 2001; PALME, 2005). Como as amostras de urina são obtidas com o uso de gaiolas metabólicas, esta técnica de mensuração não é utilizada para animais silvestres. Os corticóides presentes na saliva, por sua vez, estão diretamente relacionados com os corticóides livres no sangue, representando 10% do que se encontra no plasma usado como referência (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI *et al.*, 2005). Há uma demora de aproximadamente um minuto para que os glicocorticóides secretados no sangue apareçam na saliva. Para usar esta mensuração para avaliar o bem-estar, portanto, é necessário que a espécie estudada seja acessível ou que haja um período de habituação antes da coleta de material (HERNÁNDEZ-JÁUREGUI *et al.*, 2005).

Os dados de análises de metabólitos fecais podem representar a atividade secretora da glândula de maneira geral, não apenas episódios isolados ao longo do ritmo circadiano, dependendo do tempo de trânsito intestinal e constância da coleta de amostras (GRAHAM; BROWN, 1996b). Além desta característica, estas análises destacam-se por serem de baixo custo em relação às dosagens plasmáticas e, principalmente e por não necessitarem de nenhum tipo de manipulação animal para a coleta das amostras (VON DER OHE; SERVHEEN, 2002).

Foram desenvolvidos e testados com sucesso métodos para medir os grupos de metabólitos de glicocorticóides (cortisol e corticosterona) nas fezes e na urina de várias espécies de animais domésticos de produção como ovelhas (*Ovis aries*), bovinos (*Bos taurus*), suínos (*Sus scrofa*) e galinhas (*Gallus domesticus*) (PALME *et al.*, 1996; MÖSTL; PALME, 2002; DEHNHARD *et al.*, 2003). Também foram feitos estudos com animais silvestres como sagüi (*Callithrix jachus*), hiena (*Crocuta crocuta*), chita (*Acinonyx jubatus*), veado galheiro (*Odocoileus virginianus*), elefante africano (*Loxodonta africana*), corça (*Capreolus capreolus*) e caititus (*Pecari tajacu*) (SOUSA; ZIEGLER, 1998; GOYMAN *et al.*, 1999; WASSER *et al.*, 2000; DEHNHARD *et al.*, 2001; FOLEY *et al.*, 2001; MILLSPAUGH *et al.*, 2001; CORADELLO, 2009).

1.7. Testes de validação fisiológica através do desafio de ACTH

Para cada nova espécie em que se pretende usar glicocorticóides fecais para monitorar a resposta de estresse é fundamental que seja feito o teste de validação. Esta

validação é feita para avaliar se a mensuração hormonal reflete efetivamente os eventos fisiológicos de interesse, no caso a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (BROWN *et al.*, 2004). Este teste envolve a comparação entre dois tipos de métodos de indução da secreção de glicocorticóides, seja por estímulo natural (validação biológica), como, por exemplo, manejo de rotina em animais de cativeiro; ou por estímulo da produção hormonal a partir da administração de drogas (validação farmacológica), como por exemplo, hormônio adrenocorticotrófico sintético (ACTH) demonstrando a causa-efeito relacionado entre a administração exógena e subsequente excreção do hormônio (PALME *et al.*, 2005).

O desafio do ACTH é um método de validação amplamente utilizado para a indução de respostas neuroendócrinas ao estresse com o objetivo de estimar o grau de alteração existente na atividade do córtex da adrenal, entre uma atividade anterior e a provocada pela aplicação do hormônio sintético, (HERNANDEZ-JÁUREGUI *et al.*, 2005). O hormônio sintético ACTH injetado mimetiza uma resposta natural da adrenal ao estresse causando um rápido aumento na corrente sanguínea de glicocorticóides que, posteriormente, se refletirá no nível dos metabólitos destes hormônios nas fezes, retornando aos níveis basais após certo tempo, este período pode variar entre as espécies (NORRIS, 1997). Experimentos com ungulados mostraram o aumento dos metabólitos dos glicocorticóides fecais após o desafio do ACTH (BONACIC *et al.*, 2003).

As dosagens de hormônios utilizadas nestes trabalhos são muito variadas. Existem evidências, porém, de que 0,25 mg de ACTH exógeno estimulará a atividade adrenocortical e tem o mesmo efeito que 25 UI do ACTH endógeno em humanos e outros mamíferos (CHELINI, 2006). A dosagem variável entre 10-50 UI de ACTH é freqüentemente descrita na literatura como sendo a mais apropriada em experimentos similares que envolvem espécies de ungulados de pequeno e médio porte (BONACIC *et al.*, 2003; FERRE *et al.*, 1998; DEHNHARD *et al.*, 2001). Em bovinos foi observada uma relação entre as doses de ACTH aplicadas com o incremento dos metabólitos fecais de glicocorticóides (MÖSTL; PALME, 2002).

É importante ressaltar que as limitações da técnica para mensuração hormonal em substratos orgânicos sejam definidas. Particularmente em extratos fecais, os protocolos para coleta, armazenamento e processamento das amostras devem ser rigorosamente controlados. Esteróides em fezes e urina são altamente susceptíveis à degradação, provavelmente devido ao elevado nível de bactérias presentes (WASSER *et al.*, 2000, BROWN *et al.*, 1996, KHAN *et al.*, 2002). A degradação da amostra muda a

concentração de metabólitos, o que pode ocasionar uma impressão enganosa de acréscimo nos níveis hormonais com o tempo desde a amostragem (KHAN *et al.*, 2002).

Diversos fatores podem influenciar no nível de glicocorticóides, e de todos os outros esteróides, que se espera que tenham reflexo na concentração dos seus metabólitos fecais. Dentre estes fatores estão diferenças entre as espécies, variação diurna, sexo e estado reprodutivo, habituação, dieta e posição hierárquica (PALME, 2005; LANE, 2006; MOHR *et al.*, 2010).

O relógio cronobiológico pode influenciar o nível basal da secreção de glicocorticóide que também se submete a um ritmo diurno resultando da variação cíclica na secreção de hormônio corticotrófico (CRH) (CAVIGELLI *et al.*, 2005; TOUMA *et al.*, 2003) e pode refletir variações diurnas e sazonais (WINGFIELD *et al.*, 1994; ASTHEIMER *et al.*, 1994; KEAY *et al.*, 2006). Em humanos, por exemplo, há aumento na secreção de CRH nas primeiras horas da manhã que resulta em maior disponibilidade de energia, após a liberação de glicocorticóides (LEVINE *et al.*, 2007). Este aumento matinal de glicocorticóides e de seus metabólitos também pode ser observado em primatas não humanos (SOUZA *et al.*, 1988; LYNCH *et al.*, 2002).

Poucos estudos investigaram diferença na excreção de glicocorticóides quanto ao gênero nas espécies. Alguns destes demonstraram pouca diferença nos níveis basais de machos e fêmeas de glicocorticóides fecais em diversas espécies silvestres, como por exemplo, cervídeos e primatas não humanos (TILBROOK *et al.*, 2000; HUBER *et al.*, 2003b). Ambos os sexos demonstram aumento no cortisol frente ao mesmo evento estressor (TOUMA *et al.*, 2003). O que torna possível utilizar-se destes hormônios para monitorar eventos estressantes em populações mistas (LANE, 2006). Em oposição, outros estudos sobre reprodução, sugeriram que há variação na quantificação hormonal durante diferentes estados reprodutivos dos animais, como num experimento com machos adultos e sub-adultos de macaco prego (*Cebus apella nigrilus*) que mostraram um incremento nos níveis de cortisol durante o período estral da fêmea (LYNCH *et al.*, 2002) e com machos de macacos muriquis (*Brachyteles arachnoides*) que também aumentaram seus níveis durante o período de acasalamento (STRIER; ZIEGLER, 1997). O aumento de glicocorticóides fecais está diretamente relacionado com o aumento do nível de estrogênio durante a gestação, provavelmente devido a um efeito positivo dos altos níveis destes no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e a liberação do hormônio CRH pela placenta, podendo servir como indicadores de parição

em bovinos. Este aumento, porém, não deve ser considerado como parâmetro para monitorar o estresse nas fases finais de gestação (LANE, 2006).

Por estes motivos, é necessária a realização de estudos para a validação de técnicas que examinam respostas ao estresse, seja em virtude da influência do ambiente físico ou social e a intensidade de estresse em que o animal se encontra. Os agentes estressores nem sempre ativam continuamente o eixo HHA. Uma vez que o animal se habitua ao agente estressor pode haver uma redução nos níveis de resposta. Por exemplo, fêmeas de chita (*Acinonyx jubatus*) que foram mantidas em pares em cativeiro, mostraram sinais comportamentais claros de estresse e diminuição da função ovariana, porém apresentaram níveis de glicocorticóides similares aos de fêmeas alocadas em recintos individuais (WIELEBNOWSKI *et al.*, 2002).

A composição da dieta que um animal consome pode ter um efeito no cortisol e no nível de metabólitos excretados nas fezes (KEAY *et al.*, 2006; LANE, 2006). Diferentemente dos animais de produção, ou de animais silvestres mantidos em cativeiro, é impossível, entretanto, determinar a dieta de animais em vida livre. Aparentemente, mudanças sutis na dieta do dia-a-dia, tanto de animais cativos quanto nos de vida livre, não afetam os níveis de glicocorticóides fecais. Contudo mudanças dramáticas no estado nutricional que possam levar à fome agem como um estressor o que, por sua vez, terá um efeito significativo nos níveis de glicocorticóides (WASSER, 1993; LANE, 2006).

Em espécies sociais, o estabelecimento da hierarquia dentro de um grupo pode agir como um potente estressor e as condições de dominância e subordinação ocasionam alterações nos níveis de glicocorticóides fecais. Alguns estudos foram realizados medindo a relação entre posição hierárquica e estresse com conseqüente mensuração dos níveis de glicocorticóides fecais. Por exemplo, Sands e Creel (2004), observaram que entre lobos (*Canis lupus*) os níveis de glicocorticóides fecais foram mais altos em animais dominantes do que em subordinados, para ambos os sexos, especialmente durante a época de acasalamento. Isso levou os autores a concluir que o custo da dominância é maior do que o da subordinação, devido ao estresse social.

Para utilização de métodos de dosagem, além da validação fisiológica e dos métodos de dosagem da resposta adrenocortical, é necessária a validação laboratorial. Com este propósito é feita uma curva padrão, também chamada de curva de dose-resposta, principal ferramenta utilizada para a quantificação hormonal no método

escolhido. A dose é a concentração de hormônio na amostra e a resposta é o sinal quantitativo, gerado no ensaio em resposta a uma determinada dose. A análise desta curva é usada para determinar a acurácia do teste – quantidade exata do hormônio presente na amostra – e saber qual a melhor diluição a ser utilizada para dosar as amostras (BROWN *et al.*, 2004; MOSTL *et al.*, 2005). A validação do método ocorre quando a curva de resposta do hormônio utilizado como padrão e do hormônio amostrado, ambos sob várias diluições, seguem o mesmo padrão, obedecendo assim uma curva de paralelismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTRICHTER, M.; ALMEIDA, R. Exploitation of white-lipped peccaries *Tayassu pecari* (Artiodactyla: Tayassuidae) on the Osa Peninsula, Costa Rica, *Oryx*. 2002; 36: 126–132.

ALTRICHTER, M. *et al.* Chanchos Cariblanco (*Tayassu pecari*) como depredadores y dispersores de semillas em el Parque Nacional Corcovado, Costa Rica, *Brenesia*, 1999; 52: 53–59.

ASTHEIMER, L. B. *et al.* Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in an arctic passerine, *Zonotrichia leucophrys gambelli*. *General and Comparative Endocrinology*. 1994; 94: 33–43.

BARRETO, G. R. *et al.* Diet of peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a dry forest of Venezuela. *Journal of Zoology*. 1997; 241: 279–281.

BERG, S.J.; WYNNE-EDWARDS, K. Salivary hormone concentrations in mothers and fathers becoming parents are not correlated. *Hormones and behavior*. 2002; 42(4): 424–36.

BODMER, R. E. Responses of ungulates to seasonal inundations in the Amazon floodplain. *Journal of Tropical Ecology*. 1990; 6: 191–201.

BODMER, R. E. Strategies of seed dispersal and seed predation in Amazonian ungulates. *Biotropica*. 1991; 23: 255–261.

BODMER, R. E.; SOWLS, L. K. Economic importance and human utilization of peccaries. In W. Oliver (ed.) *Pigs, Peccaries and Hippos Action Plan: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland. 1993; 29–36.

BODMER, R. E. Uso sustentable de los ungulados amazónicos: implicaciones para las áreas protegidas comunales. In: FANG, T. G.; MONTENEGRO, O. L.; BODMER, R. E. (Ed.). *Manejo y conservación de fauna silvestre en América Latina*. La Paz: Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés. 1999; 51–58.

BOHUS, B. *et al.* Biology of stress in farm animals: an integrative approach Seminar in the CEC programme of coordination research on animal welfare. Ed. Wiepkema and van Adrichen, The Netherlands. 1986.

BONACIC, C. *et al.* Adrenocorticotrophin-induced stress response in captive vicunas (*Vicugna vicugna*) in the Andes of Chile. *Animal Welfare*. 2003; 12: 369-385.

BREUER, M. E. *et al.* Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: Effects of social and environmental provocation. *Hormones and Behavior*. 2004; 40: 409-418.

BROOM, D. M.; JOHNSON, K.G. *Stress and Animal Welfare* Chapman & Hall, London, 1983.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal : Conceito e questões relacionadas - Revisão. *Archives of Veterinary Science*. 2004; 9 (2): 1-11.

BROOM, D. M. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, Savoy: 1991; 69: 4167- 4175.

BROWN, J. L. *et al.* Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. *Zoo Biology*. 1996; 15: 425-434.

BROWN, J. *et al.* Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 2004.

BROWNIE, A. C. The metabolism of adrenal cortical steroids. In: James VHT, editor. *The adrenal gland*. New York: Raven Press Ltd; 1992: 209-224.

CHELINI, M. O. M. Estudo comparativo de protocolos de extração de hormônios esteróides fecais em diferentes espécies de animais. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006; 85p.

COOK, C. J. Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. *Physiology & Behavior*. 2002; 75: 169-181.

CORADELLO, M. A. Validação fisiológica do uso de metabólitos de glicocorticóides fecais para avaliação do estresse em *Caititus (Pecari tajacu)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA. 2009; 57p.

CREEL, S. *et al.* Social stress and dominance. *Nature*. 1996; 379: 212.

CURTIS, C. E.; D. H. ZALD, *et al.* Organization of working memory within the human prefrontal cortex: a PET study of self-ordered object working memory. *Neuropsychologia*. 2000; 38(11): 1503-10.

DAWKINS, M. S. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. *Zoology*. 2003; 106: 383-387.

DEHNHARD, M. *et al.* Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentiles*). *General Comparative Endocrinology*. 2003; 131: 345-352.

DEHNHARD, M. *et al.* Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. *General Comparative Endocrinology*. 2001; 123: 111-120.

DEUTSCH, P; PUGLIA, L. R. R. Os animais silvestres: Proteção, Doenças e Manejo, São Paulo: Globo. 1990; 191p.

DUBOST, G. Comparison of the social behaviour of captive sympatric peccary species (genus *Tayassu*); correlations with their ecological characteristics. *Mammalian Biology*. 2001; 66(2): 65-83.

DUBOST, G. Comportments compares du pecari à Lévres Blanches , *Tayassu pecari* , et du pécarí à collier, *Tayassu tajacu* (Artiodactyles, Tayassuidae) *Mammalia*. 1997; 1. 61(3): 313- 343.

ETTINGER, S. J; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. São Paulo: Manole. 1997; 1(4): 540p.

FANG, T. G. *et al.* Certificación de Pieles de Peccaries en la Amazonía Peruana: una Estrategia para la Conservación y Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía Peruana. *Wildlife Conservation Society*. 2004; 203p.

FANG, T. G. *et al.* Certificación de pieles de peccaries en la Amazonía peruana. WUST Ed., Lima, Peru. 2008; 203p.

FERRE, I. *et al.* Effect of method of blood sample collection on adrenal activity in farmed red deer and sheep following administration of ACTH. *Animal Science*. 1998; 67: 157-164.

FOLEY, C. A. H. *et al.* Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology*. 2001; 15: 1134 -1142.

FOURNIER & FESTA-BIANCHET. Social dominance in adult female mountain goats. *Animal Behaviour*. 1995; 49: 1449-1459.

FOWLER, M. E. Wild swine and peccaries. In: FOWLER, M.E. *Zoo and wild animal Medicine: Current Therapy*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993; v. 293, 3: 513- 522.

FRAGOSO, J. M. Large mammals and the community dynamics of Amazonian Rain Forest. Florida. 1994; 210p.

FRAGOSO, J. M. White-Lipped Peccaries and Palms on the Ilha de Maracá. In Maracá: The biodiversity and environment of a Amazonian Rain Forest (W. MILLIKEN AND J. RATTER eds.) JOHN WILEY & SONS L.T.D. Clichesten: United Kingdom, 1998.

FRAGOSO, J. M. White-Lipped Peccaries and Palms on Maraca Island, Brazil. In: Manejo da Vida Silvestre para a Conservação na América Latina. Workshop e Seminários. Relatório Técnico- Belém do Pará. 1992.

FRAGOSO, J. M. V. Perception of scale and resource partitioning by peccaries: behavioral causes and ecological implications. *Journal of Mammalogy*. 1999; 80: 993-1003.

GONZÁLEZ, F. D. ; SILVA, S. C. Bioquímica hormonal. In: Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003; 137-174.

GOYMANN, W.; MOSTL, E.; VAN'T HOF, T.; EAST, M. L. ; Hofer, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General Comparative Endocrinology*. 1999; 114: 340-348.

GOYMANN, W. *et al.* Social, state-dependent and environmental modulation of faecal corticosteroid levels in free-ranging female spotted hyenas. *Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences*. 2001; 268: 2453-2459.

GOYMANN, W.; WINGFIELD, J. C. Allostatic load, social status and stress hormones: The costs of social status matter. *Animal Behaviour*. 2004; 67 (3): 591-602.

GRAEFF, F. G. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2003; 25 (1): 21-24.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007; 29 (1): 3-6.

GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Non- invasive assessment of gonadal and adrenocortical function in felid species via fecal steroids analysis. In *International Symposium of Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals*, Berlin. *Proceedings*. 1996b; 1:18-21.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Os hormônios adrenocorticais. In: *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2006; 11: 871-882.

HAN, A.; MARANDICI, A.; MONDER, C. Metabolism of corticosterone in mouse, identification of 11, 20-Dihidroxy-3-oxo-4-pregnen-21-oii acid as a major metabolite. *Journal of Biology and Chemic*. 1983; 258: 13703-13707.

HERRING, W. S. *et al.* The role of canine morphology in the evolutionary divergence of pigs and peccaries, *Journal of Mammalogy*. 1972; 501- 513.

HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, D. M. B. *et al.* Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals. *Veterinária, Mexico*. 2005; 36 (3): 335-337.

HUBER, S.; PALME, R.; ARNOLD, W. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *General Comparative Endocrinology*. 2003b; 130: 48-54.

JÁCOMO, A. T. A. Ecologia, Manejo e Conservação do Queixada (*Tayassu pecari*) no Parque Nacional das Emas e propriedades rurais de seu entorno. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2004; 120p.

JERICÓ, M. M. *et al.* Métodos de Imunoensaio Não-Radiométricos [Fluoroimunoensaio (FIE) e Enzimaimunoensaio (EIE)] e o Radioimunoensaio (RIE) na Avaliação da Função Adrenal de Cães Normais e Cães com Hiperadrenocorticism. *Ciência Rural*. 2002; 32 (2): 259-262.

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

KEAY, J. M. *et al.* Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2006; 37: 234-244.

KEUROGHLIAN, A. The response of peccaries to seasonal fluctuations in na isolated patch of tropical forest. PhD dissertation. University of Nevada, Reno, Nevada, 2003.

KEUROGHLIAN, A.; EATON, D.; LONGLAND, W. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment, *Biological Conservation*. 2004; 120: 411-425p

KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. Importance of rare habitats and riparian zones in a tropical forest fragment: preferential use by *Tayassu pecari*, a wide-ranging frugivore. *Journal of Zoology*. 2008.

KHAN, M. Z. *et al.* A matter of time: Evaluating the storage of faecal samples for steroide analysis. *General Comparative Endocrinololy*. 2002; 128: 57-64.

KILTIE, R. A. The funtion of interlocking canines in rain forest peccaries (*Tayassuidae*). *Journal of Mammalogy*. 1981b; 62 (3): 459-469.

KILTIE, R. A. Pecary jaws and canines: sizing up shape in fossil and recent specie. In REDFORD, K. H.; EISENBERG. *Advances in Neotropical Mammalogy*. Gainesville: Sanhill Crane press. 1989; 317- 336.

KILTIE, R. A.; TERBORGH, J. Observations on the behavior of rain forest peccaries in Perú: why do white-lipped peccaries form herds. *Zeit Tierpsychology*. 1983; 62: 241-255.

KORTE, S. M.; OLIVIER, B.; KOOLHAAS, J. M. A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology and Behavior*. 2007; 92 (3): 422-428.

LANDYS, M. M.; RAMENOFISKY, M.; WINGWELD, J.C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Genetic and Comparative Endocrinology*. 2006; 148:132 –149.

LANE, J. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals? *Animal Welfare*. 2006; 15: 331–342.

LANGMORE, N. E., COCKREM, J. F., CANDY, E. J. Competition for male reproductive investment elevates testosterone levels in female dunnocks, *Prunella modularis*. *Proc. R. Soc. London, Ser. B Biol. Sci.* 2002; 269: 2473–2478.

LANDSBERG, L., YOUNG, J. B. Catecholamines and the adrenal medulla. In: WILSON, J. D., FOSTER, D. W., eds. *Williams textbook of endocrinology*. New Jersey: Prentice Hall International. 1992; 532-5593

LAY Jr., D. C. Consequences of Stress during Development. In: Moberg, G. P., and J. A. Mench (eds.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, Oxon, U.K. 2002; cap.12: 249p.

LEVINE *et al.* Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiology & Behavior*. 2007; 90: 43–53

LINGLE S.; PELLIS, S. M. Fight or flight? Antipredator behavior and the escalation of coyote encounters with deer. *Ecology*. 2002; 131: 154–164.

LUNDBERG, U. Catecholamines. In: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress*. New York: Academic Press. 2000; (1): 408-413.

LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E.; STRIER, K. B. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigratus*. *Hormones and Behavior*. 2002; 41: 275–287.

MANGINI, P. Estudo dos níveis séricos de progesterona e estradiol e da estrutura do trato genital feminino de queixada (*Tayassu pecari* Link, 1795). Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1999; 88p.

MASO, F. *et al.* Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. *Brazilian Journal Sports Medicine*. 2004; 38: 260 – 3.

MASON, G. J. Stereotypies and suffering. *Behavior*. 1991; 25: 103–115.

MARCH, I. El Pecari labiado (*Tayassu pecari*). In; OLIVER, W. L. R. *Pigs, Pecaries and Hippos; Status survey and Conservation, action plan*. Suíça: IUCN. 1996; 56p.

MARGARIDO, T. C. Aspectos da historia natural de *Tayassu pecari* (Link, 1795) (Artiodactyla, Tayassuidae) no Estado do Paraná, Sul do Brasil. Curitiba, PR. 2001; 109p.

MAYER, J. J.; BRANDT, P.N. Identity, distribution and natural history of the peccaries, Tayassuidae. In Mares, M.A. & Genoways, H.H. (eds.). *Mammalian Biology in South America. Pyramiding Simposia*. University of Pittsburg. 1982; 433-455.

MAYER, J. J.; WETZEL, R.M. . *Tayassu pecary*. Mammalian sp.. American Society of Mammalogy. 1987; 293: 1-7.

MC EWEN, B. S. Stressful experience, brain, and emotions: developmental, genetic, and hormonal influences. In: GAZZANIGA, M. S. (Ed.) *The Cognitive Neuroscience*. Cambridge: The MIT Pres. 1996; 1447p.

McEWEN, B. S. Definitions and concepts of stress. In: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress*. New York: Academic Press. 2000; (3); 408-509

MILLSPAUGH, J. J. *et al.* Fecal glucocorticoid assays and the physiological stress response in elk. *Wildlife Society Bulletin*. 2001; 29 (3): 899-907.

MORAES, L. F. Digestibilidade de Nutrientes de Rações Contendo Níveis Crescentes de Volumosos Determinada com Catetos (*Tayassu tajacu*) e Queixadas (*Tayassu pecari*). Piracicaba, SP. 1992.

MORBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg, G. P., and J. A. Mench (eds.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, Oxon, U.K. 2000; 1-22.

MORATO, R. G. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; 37: 1903-1907.

MOHR, F. C.; LASLEY, B.; BURSIA, S. Fuel oil-induced adrenal hypertrophy in ranch mink (*Mustela vison*): effects of sex, fuel oil weathering, and response to adrenocorticotrophic hormone. *Journal of Wildlife Diseases*. 2010; 46(1): 103-110.

MORMEDE, P. *et al.* Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behaviour*. 2007; 92: 317-339.

MORTON, D. J. *et al.* Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Veterinary Review*. 1995; 136: 60-63.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, C.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1046: 17-34.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*. 2002; 23 (1-2): 67-74.

NEYLAN, T. C. Hans Selye and the Field of Stress Research. *Journal of Neuropsychiatry*. 1998; 10 (2): 230-231.

- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; LAVORENTI, A. O manejo do caititu (*Tayassu tajacu*) e do queixada (*T. pecari*) em cativeiro. In: PÁDUA, C. V.; BODMER, R. E.; CULLEN JUNIOR, L. (Org.). Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil. Brasília: CNPq; Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 1997; 106-115.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. Manual de criação de catetos e queixadas. Viçosa Centro de Produções Técnicas (CPT). 1999; 70p.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; CUNHA-NOGUEIRA, S. S.; TAKECHI, S. A Estrutura social de pecaris (Mammalia, Tayassuidae) em cativeiro. *Revista de Etologia*. 1999; 1.
- NOGUEIRA-FILHO S. L. G. ; NOGUEIRA S. S. C. Captive breeding programs as an alternative for wildlife conservation in Brazil, in: Silvius, K.M., Bodmer, R.E., Fragoso, J. M.V. (Eds.), *People in Nature, Wildlife Conservation in South and Central America*, Columbia University Press, New York. 2004; 171-190.
- NORRIS, D. O. Vertebrate endocrinology. San Diego: Academic press. 1997; 3: 634p.
- NOWAK, R. M. Order Artiodactyla. In: NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the world. S. JOHNS HOPKINS ed. University Press, Baltimore. 1991; (2): 1334- 1347.
- OLMOS, F. Diet of sympatric Brazilian Caatinga peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*), *Journal of tropical ecology*. 1993; 1 (9): 255- 258.
- OSTNER, J.; KAPPELER, P. M.; HEISTERMANN, M. Seasonal variation and social correlates of androgen excretion in male red fronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). *Behavior Ecology Sociobiology*. 2002; 52: 485-495.
- PALME, R. *et al.* Excretion of infused 14C-steroid hormones feces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*. 1996; 43 (196): 43-63.
- PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1046: 75-80.
- PALME, R. *et al.* Fecal metabolites of infused 14C progesterone in domestic livestock. *Reproduction Domestic Animal*. 1997; 32: 199-201.
- PEREIRA, R. J. G. Métodos não-invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2007; 36: 71-76.
- PIHL L.; HAU J. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Laboratory Animals*. 2003; 37: 166-171.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*, londrina: Efraim Rodrigues, 2001.
- QUINKLER, M.; KOSMALE, B.; BAHR, V.; OELKERS, W.; DIEDERICH, S. Evidence for isoforms of 11 β -hidroxy steroid dehydrogenase in ten liver and kidney of the guinea pig. *Journal of Endocrinology*. 1998; 153: 291-298.

ROBINSON, J. G.; E K. H. REDFORD. Neotropical wildlife use and conservation. Edited by John G. Robinson and Kent H. Redford. The University of Chicago Press. 1991; 519.

ROBINSON, J. G.; BENNETT, E. L. Carrying capacity limits to sustainable hunting in tropical forests. In: Robinson, J. G. & Bennett, E. L. (Eds.). Hunting for sustainability in tropical forests New York: Columbia University Press. 2000; 13-30.

ROOTS, C. G. Notes on the breeding of the white-lipped peccaries (*T. albirostris*) at Dudley Zoo. International Zoological Year Book. The Zoological Society of London. 1966; 6: 189-199.

RUIS, M. A. W. The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. Physiology and Behavior. 1997; 62 (3): 623-630.

SANDS, J.; CREEL, S. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. Animal. Behavior. 2004; 67: 387-396.

SALTZMAN, E. S.; AYDIN, M.; DE BRUYN, W. J.; KING, D. B.; YVON-LEWIS, S. A. Methyl bromide in preindustrial air: measurements from an Antarctic ice core. Journal of Geophysical Research. 2004; 109 (5).

SAPOLSKY, R. M. Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative feedback sensitivity. Endocrinology. 1982; 113: 2263-2267.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrine Reviews. 2000; 21(1): 55-89.

SCHATZ S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. Veterinary Research Community. 2001; 25: 271-287.

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

SENCIAL, I. R.; RAHAL, S.; ROBERTS, R. Corticosteroid side chain oxidation and metabolism of 20-dihydro steroids and evidence for steroid acid formation by direct oxidation at C-21. Journal of Steroid Biochem Molecular Biology. 1992; 41: 151-160.

SHIRTCLIFF, E. A.; GRANGER, D. A.; LIKOS, A. Gender differences in the validity of testosterone measured in saliva by immunoassay. Hormonal Behavior. 2002; 42: 62-69.

SHYLLE, V. M.; HAGGERTY, M. A.; SHACKLETON, C.; LASLEY B. L. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology. 1990; 34: 779-794.

SOUZA, M. B.; ZIEGLER, T. E. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. *American Journal Primatology*. 1998; 46: 105-117.

SOWLS, L.K. Javelinas and other peccaries: their biology, management and use. EUA: Texas A&M University Press. 1997; (2): 325 p.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T.E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. *American Journal Primatology*. 1997; 42: 299-310.

TERBORGH, J. Community aspects of frugivory in tropical forest. In: A. Estrada and T. H. FLEMING (eds.) *Frugivores and seed dispersal*. Dr. W. Publishers. 1986; 5 (15): 371- 384.

TILBROOK; A. J.; TURNER, A. I.; CLARKE, I. J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction*. 2000; 5: 105-113.

TOUMA, C. *et al.* Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General Comparative Endocrinology*. 2003; 130: 267- 278.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*. 2004; 45: 10-22.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1046: 54-74.

VON DER OHE C. G.; SERVHEEN, C. Measuring stress in mammals using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Society Bulletin*. 2002; 30 (4): 1215-1225.

WASSER, S. K. *et al.* Effects of dietary fibre in faecal steroids measurements of baboons (*Papio cynocephalus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993; 97: 569-574.

WASSER, S. K. *et al.* A Generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*. 2000; 120: 260-275.

WIELEBNOWSKI, N. C. *et al.* Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biology*. 2002; 21: 77-98.

WINGFIELD, J. C.; DEVICHE, P.; SHARBAUGH, S.; ASTHEIMER, L. B.; HOLBERTON, R.; SUYDAM, R.; HUNT, K. Seasonal changes of the adrenocortical

responses to stress in redpolls, *Acanthis flammea*, in Alaska. Journal of Experimental Zoology. 1994; 270: 372-380.

YOUNG, K. M. *et al.* Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. General and Comparative Endocrinology. 2004; 137: 148-165.

Artigo: Monitoramento da resposta do estresse em queixadas (Mammalia, Tayassuidae)*

Resumo

A crescente preocupação com o bem-estar animal nas últimas décadas levou a um aumento da consciência das necessidades de monitorar e reduzir o estresse nos animais. Para identificar comportamentos indicadores de estresse e validar o uso de metabólitos de glicocorticóides (MGlC) fecais aplicamos o teste de desafio do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) em queixadas (*Tayassu pecari*). Testamos três tratamentos: 0,25 ou 0,50mg 100kg⁻¹ ACTH, e solução salina controle em seis queixadas machos adultos em delineamento quadrado latino. Após imobilização os tratamentos foram aplicados (injeção intramuscular) às 09h00min dos dias de desafio. Fezes foram coletadas desde três dias antes até cinco dias após a aplicação dos tratamentos. No mesmo período, em seções diárias de 15 minutos de duração entre às 17h00min e 18h30min, fizemos o registro comportamental de cada indivíduo. Para dosagem hormonal, amostras de fezes liofilizadas foram hidrolisadas e analisadas pelo método imunoenzimático (ELISA). Os dados foram comparados através de ANOVA de medidas repetidas, seguidas do teste Tukey. Queixadas permaneceram mais tempo nos estados comportamentais indicadores de estresse no dia de aplicação dos tratamentos ($F_{4,60}=14,7$, $P<0,0001$). Houve aumento na concentração destes metabólitos que atingiu um pico de excreção (265% acima do nível basal) 24h após imobilização e aplicação dos tratamentos ($F_{4,60}=5,48$, $P=0,008$) seguido pelo seu declínio até atingir níveis basais nas fezes coletadas 72h após os desafios, independente dos tratamentos ($F_{2,15}=0,42$, $P=0,67$). A imobilização por si só, portanto, foi suficiente para causar estresse e afetar a resposta adrenocortical em queixadas, pela detecção do hormônio, o que torna efetiva a metodologia para acessar estresse na espécie. Como inexiste dados sobre a concentração destes metabólitos em queixadas de vida livre, é recomendado que sejam comparados registros individuais de MGlC fecais, juntamente com observações comportamentais, para medir e monitorar o estresse nessa espécie.

Palavras-chave: animais silvestres, bem-estar animal, comportamento animal, criação em cativeiro, fisiologia do estresse, pecaris, teste de desafio ACTH.

*Este artigo está sendo preparado para submissão ao periódico "*Physiology and Behavior*"

1. Introdução

O queixada, (*Tayassu pecari*) destaca-se entre as espécies ameaçadas pelo desmatamento e pela caça nos países Neotropicais [1-3]. Estes animais vivem em grupos que podem conter mais de 200 indivíduos que percorrem constantemente uma vasta área de vida [2,4]. Esta área de vida pode atingir mais de 100 km², que exploram em busca de recursos alimentares como os frutos das palmeiras buriti (*Mauritia flexuosa*) e jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) [4-8]. Desta forma, dependem de grandes extensões de florestas relativamente pouco alteradas para sua sobrevivência [4,5,9,10]. Adicionalmente, esta espécie é uma das mais perseguidas por populações humanas que dependem da caça de subsistência para sua sobrevivência [11-13].

Entre as alternativas que vem sendo adotadas no Brasil para conservar a espécie, estão o estabelecimento de unidades de conservação de grande porte [12] e a sua criação em cativeiro. A criação em cativeiro é considerada uma estratégia para a multiplicação desta espécie para atender programas de repovoamento [14], além de ser uma alternativa que garante a segurança alimentar de populações que dependem destes recursos naturais para sua sobrevivência [11-15]. Adicionalmente, pode também atender ao crescente interesse comercial pela carne de animais silvestres nos grandes centros urbanos do Brasil [16].

Alguns trabalhos mostram que a espécie dificilmente se reproduz em zoológicos [11-17]. Outros estudos, no entanto, mostraram que os queixadas se adaptam e se reproduzem bem em cativeiro quando são mantidos grupos grandes em recintos relativamente grandes, de 200 a 250m² por indivíduo [18,19]. As distintas formas de criação da espécie, tais como instalações e práticas de manejo adotadas podem intensificar a resposta de estresse e afetar a reprodução destes animais em cativeiro. Quando sob estresse, os glicocorticóides são liberados na corrente sanguínea em resposta à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Estes hormônios esteróides têm a função de mobilizar energia e cálcio dos tecidos, e inibir uma variedade de processos, entre eles a reprodução [20,21]. Por este motivo, quando se mantêm animais silvestres em cativeiro, é essencial monitorar o estresse para assegurar seu bem-estar animal e como consequência obter índices produtivos adequados [22].

Em diversas espécies, a resposta de estresse tem sido estudada tradicionalmente através de medidas hormonais [23]. Para mensuração hormonal, no entanto, a coleta de sangue *per se* é um procedimento estressante por provocar um aumento rápido e

significativo nos níveis circulantes de glicocorticóides [24-28]. Desta forma, têm sido estudadas alternativas não invasivas para monitorar essa resposta, como a mensuração de metabólitos de glicocorticóides (cortisol e corticosterona) excretados nas fezes [29]. Antes de sua aplicação, contudo, é necessário validar para cada espécie se a metodologia pode ser usada para o monitoramento fisiológico de resposta da função adrenocortical a agentes potencialmente estressores, de longo prazo [30-33].

A forma mais direta para estabelecer a importância fisiológica é a obtenção de soro sanguíneo e de fezes e sua comparação às mudanças longitudinais nos níveis de glicocorticóides circulantes e seus metabólitos [29]. No entanto, coleta de sangue é perigosa ou mesmo impossível em algumas espécies de animais selvagens, como alguns carnívoros silvestres e outras espécies perigosas, por exemplo o queixada, que pode causar graves danos a pessoas em certas situações [9]. O desafio do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é usado para imitar respostas neurais-endócrinas ao estresse [34]. O hormônio sintético simula uma resposta ao estresse natural adrenal, causando um rápido aumento nos níveis de glicocorticóides sanguíneos, seguido por um retorno aos níveis basais após um tempo relativamente curto [35]. Se um padrão típico de estresse é encontrado em metabólitos de glicocorticóides fecais após injeção de ACTH, então podemos concluir que o teste destes metabólitos fecais pode ser utilizado para medir a atividade adrenocortical endógena das espécies estudadas [36,37].

Este tipo de estudo já foi realizado para validar o uso de metabólitos fecais de glicocorticóides em algumas espécies de animais silvestres, como corça (*Capreolus capreolus*), sagüi (*Callithrix jachus*), hiena (*Crocuta crocuta*), chita (*Acinonyx jubatus*), veado galheiro (*Odocoileus virginianus*), vicunha (*Vicugna vicugna*), elefante africano (*Loxodonta africana*), e caititu (*Pecari tajacu*) [22,32,35-42]. Para a análise completa dos metabólitos de glicocorticóides fecais, em qualquer espécie estudada, é exigido que a resposta adrenocortical seja estimulada e, além do desafio farmacológico, um estressor ecologicamente relevante necessita ser aplicado [43]. Algumas vezes, no entanto, somente o uso de medidas fisiológicas de forma isolada não é suficiente para monitorar os indicadores de bem-estar animal [44]. Por este motivo, sempre que possível as medidas hormonais devem estar associadas a observações comportamentais [44].

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi o de verificar se a excreção fecal de metabólitos de glicocorticóides reflete a atividade adrenal em queixadas para validar o uso desta metodologia para avaliar a resposta de estresse na espécie. Objetivou também verificar se a aplicação de níveis crescentes ACTH exógeno influenciam nas respostas

fisiológicas e comportamentais apresentadas pelos indivíduos. Bem como, identificar os padrões comportamentais que possam ser usados para medir e monitorar o estresse nesta espécie.

2. Material e métodos

2.1. Local do estudo e sujeitos experimentais

O estudo foi realizado no Laboratório de Etologia Aplicada (LABet) da Universidade Estadual de Santa Cruz, em Ilhéus, Bahia. Neste local, foram selecionados seis machos adultos de queixadas nascidos e criados em cativeiro, com idade entre 4 e 6 anos, com massa corporal média de 34,0 ($\pm 2,3$) kg. Os animais foram introduzidos em baias individuais com 12 m² (2,0 m x 6,0 m), sendo 8,0 m² cobertos e 4,0 m² de solário, com piso de cimento e contendo comedouro, bebedouro e porta de manejo dividindo as duas áreas. Estas baias foram cercadas com tela de alambrado com 1,6 m de altura. A tela permitia a visualização e mesmo o contato físico entre os vizinhos visando reduzir o estresse do isolamento social desta espécie gregária o que poderia afetar os resultados do estudo.

2.2. Procedimentos e coleta de amostras fecais

Inicialmente, os animais foram pesados e vermifugados com Febendazole (Panacur® Intervet/Schering-Plough Animal Health, 5mg/kg de peso vivo). A dieta dos animais consistiu de capim elefante cv. Napier, farelo de milho, farelo de soja e sal mineralizado, resultando no fornecimento de 12% de proteína bruta e 3500 kcal/kg de energia bruta, fornecida na proporção de 3,5% da massa corporal em duas refeições diárias às 08h00min e às 16h00min.

Os animais passaram por período de 30 dias para ambientação às baias individuais e aos procedimentos experimentais, que incluiu a entrada do pesquisador nas baias para coleta quando notada a presença de fezes durante o dia, a partir das 07h00min até as 18h00min. Após este período, foi iniciada a coleta de dados, durante oito dias em cada período experimental, com intervalo de 10 dias entre estes, para a determinação da curva de validação fisiológica da excreção fecal de metabólitos de glicocorticóides, induzido pela administração do ACTH – desafio do ACTH. Para este fim, cada indivíduo recebeu de forma aleatória, em cada um dos três períodos experimentais do estudo, injeção intramuscular com um dos seguintes tratamentos: 2mL de solução salina controle (cloreto de sódio a 0,9% - FRESENIUS KABI BRASIL

LTDA. Aquiraz/CE); 2mL de solução salina contendo 0,25 mg/100 kg de peso vivo de ACTH (Synacthène® Dépôt - NOVARTIS PHARMA S/A - Alemanha, uso humano, 800 UI/mg 1 mg em 1 ml) e 2mL de solução salina contendo 0,50 mg/100 kg de peso vivo de ACTH. Através do uso de quadrado latino, todos os indivíduos receberam a aplicação de todos os três tratamentos. A aplicação ocorreu às 09h00min dos dias do desafio, após a captura, contenção e pesagem dos animais com auxílio de uma gaiola de contenção e uma balança (Filizola® com capacidade de 200 kg). Aproximadamente 30 minutos após o início dos procedimentos experimentais, todos os animais haviam sido pesados e os tratamentos aplicados. A coleta total de fezes foi iniciada 72 horas antes da aplicação dos tratamentos e prosseguiu até 120 horas após esta aplicação.

2.3. Conservação e processamento das amostras

O material fecal recolhido foi acondicionado em sacos plásticos, rotulados com o número do animal, data e horário do intervalo da coleta. Após a coleta, as amostras foram mantidas congeladas (-20°C) e armazenadas em *freezer* comum, até serem processadas para análise. O processamento consistiu no descongelamento das amostras em caixas térmicas com gelo, seguida da sua homogeneização realizada no próprio saco plástico. Após este processo foram retiradas sub-amostras de 2 g, identificadas e embaladas em envelopes feitos de papel alumínio, encaminhadas para liofilização. Para evitar a proliferação bacteriana este procedimento foi efetuado sob bandeja com gelo. O processo de liofilização foi realizado no Centro de Biotecnologia e Genética da UESC e durou aproximadamente 72h utilizando-se o liofilizador a vácuo (FreeZone® Plus 4.5 Liter Cascade Benchtop, LABCONCO). Depois de liofilizada, cada amostra foi pulverizada manualmente, retirando-se pelos e outras impurezas, a seguir, acondicionada em tubo de polipropileno de 2,0 mL, devidamente identificado. Posteriormente essas amostras foram acondicionadas em embalagem de poliestireno expandido contendo gelo seco. A seguir, as amostras foram enviadas para extração e dosagem no Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal - RN.

2.4. Extração e dosagem

Com o auxílio de uma espátula, cada sub-amostra fecal de 2g foi homogeneizada e utilizando-se uma balança de precisão foi pesada uma alíquota de 0,1g de fezes que foi

transferida para um tubo plástico de 15mL, devidamente identificado. Depois da pesagem as amostras foram submetidas ao processo de hidrólise para separação dos esteróides existentes nas fezes. Para esta extração, em cada tubo foi utilizada a proporção de 0,1g-1,0ml de etanol (1:10), como proposto por Coradello (2009) [22], ao invés da proporção de 0,1g-5,0mL etanol (1:50) recomendada por Brown *et al.* (2004)[45]. Este procedimento foi realizado porque a proporção 1:50 poderia ser insuficiente para extrair quantidades suficientes de glicocorticóides das fezes de queixadas como ocorreu em caititus (*Pecari tajacu*) [22].

Posteriormente à extração dos esteróides fecais, foi utilizada a técnica imunoenzimática (ELISA) para determinação da concentração dos hormônios. A metodologia empregada seguiu o protocolo experimental descrito por Nascimento *et al.* (2006)[46]. Para este fim, foi testada a similaridade imunogênica entre os antígenos padrão e os antígenos das amostras através do teste de paralelismo, de acordo com Touma e Palme (2005)[47]. Para o ensaio de paralelismo, usamos 98 extratos fecais obtidos nos três primeiros dias após a aplicação dos tratamentos (quando eram esperadas as mais altas concentrações de metabólitos de glicocorticóides). Foi determinado que as duas curvas obtidas, curva padrão do ensaio ($slope = -17.8$) e curva de validação da amostra ($slope = -17.4$), apresentaram inclinações similares ($t = 0.05$, $P = 0.85$). Adicionalmente, os coeficientes de variação intra- e inter-ensaios foram 1,7 e 9,7%, respectivamente. Estes resultados validam o uso da técnica além da precisão e confiabilidade dos ensaios [45,48]. Os resultados de concentração de metabólitos de glicocorticóides fecais obtidos foram expressos em $ng\ g^{-1}$ de fezes. O limite de detecção foi calculado pela diferença entre a média e duas vezes o desvio padrão da concentração de metabólitos de glicocorticóides fecais de 54 amostras obtidas durante as 72 horas anteriores à aplicação das injeções. O limite de detecção foi de $38,1\ ng\ g^{-1}$.

2.5. Coleta de dados comportamentais

Durante o mesmo período de coleta de material fecal também foi feita a coleta de dados comportamentais. Para este fim, foi utilizado o método de animal focal [49] em seções de 15 minutos de duração entre às 17h00min e 18h30min, quando havia menor movimentação de funcionários e alunos nas imediações do local do estudo. Para a coleta, foi utilizada uma câmera filmadora digital (Sony®, Tóquio, Japão) apoiada em tripé localizada a 1,5 m da porta das baias. As imagens digitalizadas foram analisadas,

através do programa (Ethoplayer® 1.3.0, Lycos, França) e para cada indivíduo foi feito o registro do tempo em que os animais se mantiveram nos padrões comportamentais indicadores de estresse para a espécie [50], descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição de padrões comportamentais de queixadas durante o teste de desafio de ACTH

Comportamentos	Descrição
<i>Pacing</i>	O animal caminha por toda a extensão do recinto em movimentos repetitivos de ir e vir
Alerta	O animal permanece parado em pé, com cabeça erguida e com movimentos das orelhas
Prostrado	O animal permanece deitado de olhos abertos, cabeça erguida ou apoiada no chão, com respiração ofegante

2.6. Análises estatísticas

A taxa de defecação foi muito variável entre os animais, enquanto alguns animais defecaram várias vezes ao dia outros apenas uma única vez. Por este motivo, foi calculada a média diária da concentração de metabólitos de glicocorticóides para cada indivíduo submetido a cada um dos tratamentos. A seguir, para determinação das concentrações basais destes metabólitos, foi determinada a média dos dados de concentração coletados nos dias pré-desafios. Posteriormente, considerando-se cada animal como seu próprio controle, foram determinadas as variações na concentração dos metabólitos fecais de glicocorticóides entre as duas doses de ACTH e solução salina controle através de ANOVA de medidas repetidas, seguido do teste de Duncan, através do programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Para análise dos dados comportamentais, foi calculada a duração em segundos dos comportamentos indicadores de estresse, no dias de desafio e nos dias pré e pós-desafios. Estes dados foram comparados através de ANOVA de medidas repetidas, seguido do teste de Tukey. Para todas as análises deste estudo foi empregado o nível de significância $p < 0,05$. A metodologia empregada neste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz.

3. Resultados

O valor médio da concentração basal de metabólitos de glicocorticóides nas fezes liofilizadas de queixadas foi de 160,5 (DP = 61,2) ng g⁻¹ durante o período de 72-h antes dos desafios (Fig. 1). Após a contenção e aplicação das injeções as concentrações de metabólitos fecais de glicocorticóides variaram de acordo com os tratamentos ($F_{2, 15} = 7,2$, $P = 0,006$), dias de coleta ($F_{8, 120} = 12,9$, $P = 0,00001$). Adicionalmente, o modelo estatístico mostrou interação entre os tratamentos e os dias de coleta na variação na concentração dos metabólitos de glicocorticóides nas fezes de queixadas ($F_{16, 120} = 5,6$, $P = 0,00001$). O teste *pos hoc* mostrou que houve incremento ($P_s < 0,002$) nas concentrações dos metabólitos de glicocorticóides nas fezes de queixadas no primeiro dia após à contenção e aplicação da maior dose de ACTH exógeno (0,50 mg/100 kg de peso vivo). Nas fezes coletadas até 24 horas após a aplicação deste tratamento houve aumento médio de 2,7 vezes (variação de 2,1 a 3,6 vezes) na concentração de metabólitos de glicocorticóides fecais em relação ao nível basal. A partir do terceiro dia houve diminuição na concentração destes metabólitos e esta foi similar à determinada no período prévio à aplicação dos tratamentos (Fig. 1). Também foi observado aumento na concentração destes metabólitos nas fezes dos queixadas coletadas até 24 horas após a aplicação da menor dose de ACTH (0,25 mg/100 kg de peso vivo). Este aumento de concentração, contudo, foi inferior ao verificado para os animais que receberam a maior dose de ACTH neste mesmo período. Adicionalmente esta concentração não diferiu da registrada para os animais que receberam a solução salina controle que permaneceu aproximadamente constante durante todo o estudo (Fig. 1).

Independente do tratamento aplicado ($F_{2, 15} = 0,72$, $P = 0,51$), o tempo em que os animais permaneceram em estados comportamentais indicadores de estresse variou de acordo com o dia do estudo ($F_{8, 120} = 9,45$, $P = 0,00001$). No dia do desafio, os animais permaneceram mais tempo em estados comportamentais indicadores de estresse em relação aos demais dias analisados ($P_s < 0,0001$; Fig. 2).

4. Discussão

A concentração de metabólitos de glicocorticóides nas fezes de queixadas é um meio efetivo de detectar mudanças na atividade adrenal de queixadas. Como previsto, houve incremento nas concentrações dos metabólitos de glicocorticóides nas fezes de queixadas nos primeiros dias posteriores à contenção e aplicação da maior dose de ACTH exógeno (0,50 mg/100 kg de peso vivo).

A concentração de 160,5 (DP = 61.2) ng g⁻¹ no período que antecedeu ao desafio pode ser considerada como o valor médio basal de metabólitos de glicocorticóides por grama de fezes secas de queixadas. Diferenças nos postos hierárquicos ocupados por estes animais podem ser uma das possíveis razões da grande variabilidade encontrada. Em estudo feito com lobos (*Canis lupus*), foi observado que os níveis de glicocorticóides fecais são mais altos nos animais dominantes do que nos subordinados [51]. Queixadas vivem em grupos com hierarquia social linear bem definida [52,53]. É provável, portanto, que haja interferência do posto hierárquico ocupado por cada indivíduo nas respostas individuais aos tratamentos.

Por outro lado, os níveis basais de metabólitos de glicocorticóides de queixadas são aproximadamente cinco vezes maiores que os níveis basais de caititus [22]. Uma possível explicação são as diferenças nas características de seus grupos na natureza [54]. Foi verificado que quanto maior o tamanho dos grupos em vida livre, mais elevados são os níveis de glicocorticóides, quer devido a uma maior necessidade de mobilizar energia ou por causa da intensificação da concorrência social [55-58]. Queixadas vivem em bandos grandes e coesos que podem apresentar até 200 indivíduos, compostos de animais de ambos os sexos e de diversas idades [5]. Enquanto os caititus vivem em grupos, com 5 a 15 indivíduos, caracterizados pela fusão e fissão de acordo com a oferta sazonal de recursos [7,10].

O tempo em que os animais permaneceram em estados indicadores de estresse variou conforme o dia do estudo. Nos dias de desafio, quando os animais foram imobilizados e receberam as injeções dos tratamentos, os queixadas permaneceram mais tempo nos estados *pacing*, alerta e prostrado, em relação aos demais dias. Algumas estereotipias acontecem como consequência da privação de estímulos e o percentual de tempo gasto neste tipo de comportamento são exemplos de medidas de estresse [58-61]. Quanto maior o tempo gasto com comportamentos estereotipados ou excessivos, menor o grau de bem-estar do indivíduo [61].

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que é possível monitorar a atividade adrenal através da mensuração de metabólitos de glicocorticóides nas fezes de queixadas. Desta forma, o uso deste método, associado a observações dos comportamentos indicadores de estresse, fornecem medidas efetivas para mensurar e monitorar o bem estar da espécie.

Referências

- [1] Taber, A. *et al.* The destiny of the Neotropical forest architects: an evaluation of the distribution and conservation status of the white-lipped peccaries. Suiform Sound, 2009; 8: 17-19.
- [2] Jacomo, A. T. A. Ecologia, Manejo e Conservação do Queixada (*Tayassu pecari*) no Parque Nacional das Emas e propriedades rurais de seu entorno. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2004; 120p
- [3] Margarido, T. C. Aspectos da historia natural de *Tayassu pecari* (Link, 1975) (Artiodactyla, Tayassuidae) no Estado do Paraná, Sul do Brasil. Curitiba, PR. 2001; 109p
- [4] Kiltie, R. A. Stomach contents of rain forest peccaries (*Tayassu tajacu* and *T.pecari*). Biotrópica, Washington, 1981; 13 (3): 234-236.
- [5] Kiltie, R. A.; Terborgh, J. Observations on the behavior of rain forest peccaries in Perú: why do white-lipped peccaries form herds. Zeit Tierpsychology, 1983; 62: 241-255.
- [6] Fragoso, J. M. White-Lipped Peccaries and Palms on Maraca Island, Brazil. In: Manejo da Vida Silvestre para a Conservação na América Latina. Workshop e Seminários. Relatório Técnico- Belém do Pará, Belém, PA. 1992.
- [7] Fragoso, J. M. White-Lipped Peccaries and Palms on the Ilha de Maracá. In Maracá: The biodiversity and environment of a Amazonian Rain Forest (W. MILLIKEN AND J. RATTER eds.) JOHN WILEY & SONS L.T.D. Clichesten: United Kingdom, 1998.
- [8] Altrichter, M. *et al.* Chanchos Cariblanco (*Tayassu pecari*) como depredadores y dispersores de semillas em el Parque Nacional Corcovado, Costa Rica, Brenesia, 1999; 52: 53-59.
- [9] Sows, L. K. Javelinas and other peccaries: their biology, management and use. 2. ed. Texas A&M University Press, 1997.
- [10] Fragoso, J. M. V. Perception of scale and resource partitioning by peccaries: behavioral causes and ecological implications. Journal of Mammalogy, 1999; 80: 993-1003.

- [11] Bodmer, R. E. Uso sustentable de los ungulados amazónicos: implicaciones para las áreas protegidas comunales. In: FANG, T. G.; MONTENEGRO, O. L.; BODMER, R. E. (Ed.). Manejo y conservación de fauna silvestre en América Latina. La Paz: Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés, 1999; 51- 58.
- [12] Robinson, J. G.; Redford, K. H. Neotropical wildlife use and conservation. Edited by John G. Robinson and Kent H. Redford. The University of Chicago Press, 1991; 519.
- [13] Bodmer, R.; Fang, T.; Moya, L.; Gill, R. Managing wildlife to conserve Amazonian forests: population biology and economic considerations of game hunting. *Biological Conservation*, 1994; 67: 29-35.
- [14] Nogueira-Filho, S. L. G.; Lavoretti, A. O manejo do caititu (*Tayassu tajacu*) e do queixada (*T. pecari*) em cativeiro. In: Pádua, C. V.; Bodmer, R. E.; Cullen Junior, L. (Org.). Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil. Brasília: CNPq; Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 1997; 106-115.
- [15] Bodmer, R. E.; Sows, L. K. Economic importance and human utilization of peccaries. In W. Oliver (ed.) *Pigs, Peccaries and Hippos Action Plan: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland, 1993; 29-36.
- [16] Nogueira-Filho S. L. G.; Nogueira S. S. C. Captive breeding programs as an alternative for wildlife conservation in Brazil, in: Silvius, K.M., Bodmer, R.E., Fragoso, J. M.V. (Eds.), *People in Nature, Wildlife Conservation in South and Central America*, Columbia University Press, New York, 2004; 171-190.
- [17] McDonald, L. E.; Lasley, B. L. Infertility in a Captive Group of White-Lipped Peccaries *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 1978; 9: 90-95.
- [18] Mangini, P. Estudo dos níveis séricos de progesterona e estradiol e da estrutura do trato genital feminino de queixada (*Tayassu pecari* Link, 1795). Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1999; 88p.
- [19] Nogueira-Filho, S. L. G.; Nogueira, S. S. C; Takechi, S. A Estrutura social de pecaris (Mammalia, Tayassuidae) em cativeiro. *Revista de Etologia*, 1999; 1.
- [20] Sapolsky, R. M.; Romero, L. M.; Munck, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and 8 preparative actions. *Endocrine Reviews*, 2000; 21(1): 55-89.
- [21] Sapolsky, R. M. Neuroendocrinology of the stress response. In. BECKER, JB. *et al.* (Ed.) *Behavioral Endocrinology*. Massachusetts: Institute of Technology Press, 1992; 287-324.
- [22] Coradello, M. A. Validação fisiológica do uso de metabólitos de glicocorticoides fecais para avaliação do estresse em Caititus (*Pecari tajacu*) Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus, BA. 2009; 57p.

- [23] Von Der Ohe, C.G.; Serveen, C. Measuring stress in mammals using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Society Bulletin*, 2002; 30 (4): 1215-1225.
- [24] Sapolsky, R. M. Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative feedback sensitivity. *Endocrinology*, 1982; 113: 2263-2267.
- [25] Astheimer, L. B.; Buttemer, W. A.; Wingfield, J. C. Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in an arctic passerine, *Zonotrichia leucophrys gambelli*. *General and Comparative Endocrinology*, 1994; 94: 33-43.
- [26] Wingfield, J. C.; Deviche, P.; Sharbaugh, S.; Astheimer, L. B.; Holberton, R., Suydam, R.; Hunt, K. Seasonal changes of the adrenocortical responses to stress in redpolls, *Acanthis flammea*, in Alaska. *Journal of Experimental Zoology*, 1994; 270: 372-380.
- [27] Ferre, I. *et al.* Effect of method of blood sample collection on adrenal activity in farmed red deer and sheep following administration of ACTH. *Animal Science*, 1998; 67:157-164.
- [28] Millspaugh, J. J. *et al.* Fecal glucocorticoid assays and the physiological stress response in elk. *Wildlife Society Bulletin*, 2001; 29 (3): 899-907.
- [29] Hernández-Jáuregui D. M. B.; Maldonado F. G.; Perez R. A. V.; Pardo M. R.; de Aluja A. S. "Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals," *Veterinaria México*, 2005; 36 (3): 325-338.
- [30] Touma, C.; Palme, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005; 1046: 54-74.
- [31] Souza, M. B.; Ziegler, T. E. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. *American Journal Primatology*, 1998; 46: 105-117.
- [32] Goymann, W.; Mostl, E.; Van't Hof, T.; M. L. East, M.L.; Hofer, H. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General Comparative Endocrinology*, 1999; 114: 340-348.
- [33] Schwarzenberger, F.; Mostl, E.; Palme, R.; Bamberg, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*, 1996; 42: 515- 526.
- [34] Young, K. M. *et al.* Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and Comparative Endocrinology*, 2004; 137: 148-165

- [35] Wasser, S. K. *et al.* A Generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*, 2000; 120: 260-275.
- [36] Dehnhard, M.; Clauss, M.; Lechner-Doll, H.; Meyer, H. E.; Palme, R. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. *General Comparative Endocrinology*, 2001; 123: 111-120.
- [37] Bonacic, C.; MacDonald, D. W.; Villouta, G. Adrenocorticotrophin-induced stress response in captive vicunas (*Vicugna vicugna*) in the Andes of Chile. *Animal Welfare* 2003; 12: 369-385.
- [38] Foley, C. A. H.; Papageorge, S.; Wasser, S.K. Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology*, 2001; 15: 1134 -1142.
- [39] Millspaugh, J. J.; Washburn, B. E. Within sample variation of fecal glucocorticoid measurements. *General Comparative Endocrinology*, 2003; 132: 21-26.
- [40] Graham, L. H.; Brown, J. L. Non-invasive assessment of gonadal and adrenocortical function in felid species via fecal steroids analysis. In *International Symposium of Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals Proceedings*, Berlin, 1996b; (1): 18-21.
- [41] Goymann, W. *et al.* Social, state-dependent and environmental modulation of fecal corticosteroid levels in free-ranging female spotted hyenas. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*, 2001; 268: 2453-2459.
- [42] Lima, S. G. C. Avaliação do uso de comedouros-desafio como enriquecimento ambiental sobre o comportamento exploratório e agonístico de caititus (*Pecari tajacu*). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil, 2010.
- [43] Harper, J. M.; Austad, S. N. Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiology Biochemical Zoology*, 2000. 73, 12-22.
- [44] Dawkins, M. S. Behavior as a tool in the assessment of animal welfare. *Zoology*, 2003; 106: 383-387.
- [45] Brown, J.; Walker, S.; Steinmain, K. *Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species*. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia - EUA, 2004.
- [46] Nascimento, H. G.; Fernandes, L. C.; Sousa, M. B. C. Avaliação da fidedignidade dos ensaios de esteróides fecais realizados no Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da UFRN. *Publica - Natal, RN*. 2006; 2: 39 - 48.
- [47] Touma, C.; Palme, R.; Sachser, N. Analyzing corticosterona metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*. 2004; 45: 10-22.

- [48] Möstl, E.; Rettenbacher, C.; Palme, R. Measurement of corticosterona metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005; 1046: 17-34.
- [49] Altmann, J. Observational study of behaviour: sampling methods. *Behaviour*, 1974; 49: 223-265.
- [50] Nogueira, S. S. C. Indicators of social stress and poor welfare in neotropical farmed wild animals (dados não publicados). In: International Ethological Conference, Rennes : Rennes's Universidad, 2009; 31:111-112.
- [51] Sands, J.; Creel, S. Social dominance, aggression and fecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal Behavior* 2004; 67: 387-396.
- [52] Dubost, G. Comparison of the social behaviour of captive sympatric peccary species (genus *Tayassu*); correlations with their ecological characteristics. *Mammalian Biology*, 2001; 66(2): 65-83.
- [53] Nogueira-Filho, S. L. G.; Nogueira, S. S. C. Criação comercial de animais silvestres: produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil. *Revista Econômica do Nordeste*, Fortaleza, CE. 2000; 31 (2): 188-195.
- [60] Kiltie, R. A.; Terborgh, J. Observations on the behavior of rain forest peccaries in Perú: why do white-lipped peccaries form herds. *Zeit Tierpsychology*, 1983; 62: 241-255.
- [61] Brown, K. J.; Grunberg, N. E. Effects of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females. *Physiology & Behavior*, 1995; 58: 1085-1089.
- [62] Bugajski, J.; Borycz, J.; Glod, R.; Bugajski, A. J. Crowding stress impairs the pituitary-adrenocortical responsiveness to the vasopressin but not corticotrophin-releasing hormone stimulation. *Brain Research*, 1995; 681: 223-228.
- [63] Chapman, J. C.; Christian, J. J.; Pawlikowski, M. A.; Michael, S. D. Analysis of steroid hormone levels in female mice at high population density. *Physiology & Behavior*, 1998; 64: 529-533.
- [64] Mason, G. J. Stereotypies and suffering. *Behavior*, 1991; 25: 103-115
- [65] Bloomstrand, K. R. *et al.* Objective evaluation of an enrichment device for chimpanzees. *Journal of the Comparative Physiology*, 1986; 5: 293-300.
- [66] Broom, D. M.; Johnson, K. G. *Stress and Animal Welfare* Chapman & Hall, London, 1983.
- [67] Broom, D. M.; Molento, C. F. M. Bem-estar animal: Conceito e questões relacionadas. *Revisão. Archives of Veterinary Science*, 2004; 9 (2): 1-11.

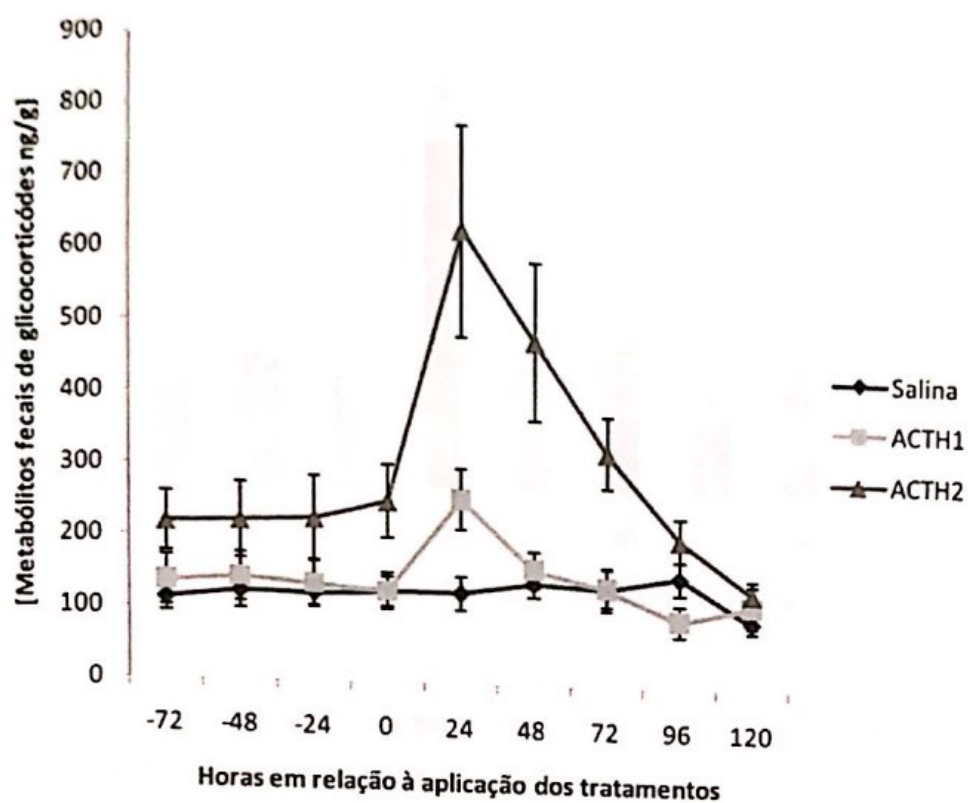


Fig. 1. Variação da concentração média ($\pm$ EP) de metabólitos de glicocorticóides nas fezes secas de queixadas antes e após a aplicação dos tratamentos (salina: solução salina controle; ACTH1: $0,25\text{mg } 100\text{kg}^{-1}$ de peso vivo e ACTH2: $0,50\text{mg } 100\text{kg}^{-1}$ de peso vivo).

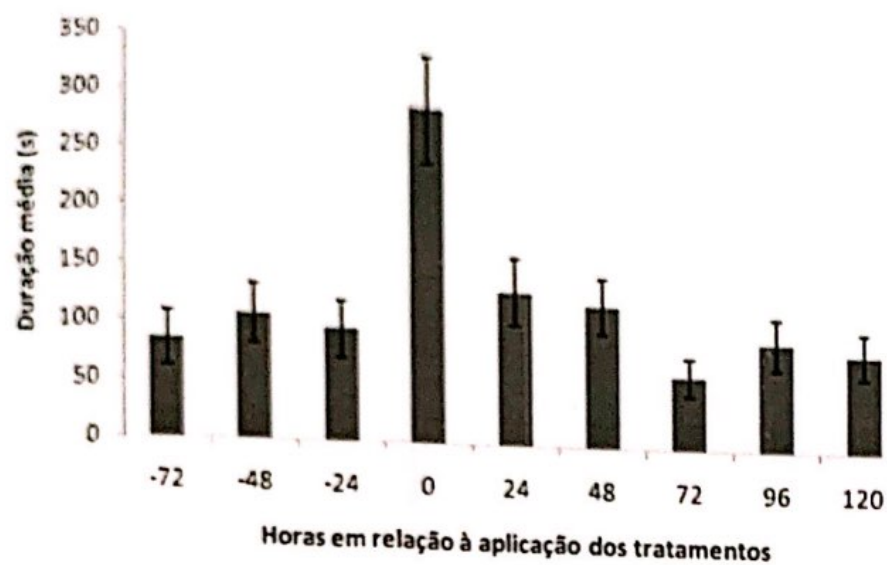


Fig. 2. Duração média ($\pm$ EP) em segundos de permanência dos queixadas em estados indicadores de estresse ao longo do tempo em relação à contenção e aplicação dos tratamentos (desafio).