

ALEXANDRA ACCO

MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E DE
LACTATO DESIDROGENASE COMO INDICADORES
DE ESTRESSE EM CUTIA (*Dasyprocta azarae*)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias como
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.
Área de Concentração Patologia Animal, Setor de
Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Metry Bacila

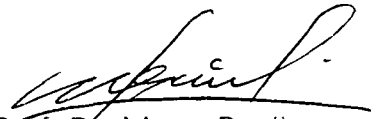
CURITIBA

1998


ALEXANDRA ACCO

MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E DE
LACTATO DESIDROGENASE COMO INDICADORES
DE ESTRESSE EM CUTIA (*Dasyprocta azarae*)

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Metry Bacila
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR
Orientador/ Presidente



Prof.ª Dr.ª Clotilde de Lourdes Branco Germiniani
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR
Membro Efetivo



Prof. Dr. Pedro Ribas Werner
Curso de Medicina Veterinária, UNIPAR
Membro Efetivo

Curitiba, 28 de setembro de 1998.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Metry Bacila*, pelos ensinamentos e pela demonstração de persistência e paixão pela ciência, elementos que o tornam um eminente pesquisador e um ser humano ímpar.

Ao *Prof. José Ricardo Pachaly*, mestre e querido amigo, pelo inestimável auxílio nos experimentos, pelos conhecimentos transmitidos e pela agradável convivência.

À ilustre coordenadora do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, *Profª. Dr.ª Clotilde de Lourdes Branco Germiniani*, pelo irrestrito apoio sempre que necessário.

Ao médico veterinário *Rogério Ribas Lange*, à bióloga *Teresa Cristina Margarido* e ao biólogo *Vinícius Abilhôa*, profissionais do Museu de História Natural Capão da Imbuia da Prefeitura Municipal de Curitiba, por permitirem a realização de experimentos em seu local de trabalho, pelo material literário e colaboração na análise estatística.

Ao biólogo *Luiz Roberto Francisco*, diretor do Zoológico Municipal de Curitiba, pela concessão de experimentos com alguns dos animais de exposição.

Às colegas de pós-graduação, *Rita Maria Venâncio Mangrich* e *Solange Ribas*, pela amizade e generosa contribuição nos experimentos.

Aos profissionais do Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR, sob a orientação da farmacêutica-bioquímica *Vivian Mara Cortes Camargo*, pela oportunidade de estágio e pelo auxílio na realização de alguns ensaios.

À *Profª. Rosângela Locatelli Dittrich*, aos funcionários e estagiários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFPR, pelas sempre presentes disponibilidade e dedicação que facilitaram os trabalhos da presente dissertação.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR, que estiveram sempre prontos a me socorrer e que compreenderam as ausências em decorrência das atividades do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo subsídio financeiro no decorrer de todas as fases deste curso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, *Genuino e Oliva*, que mesmo sem entenderem de fato a importância deste trabalho sempre o sustentaram, e embora distantes sempre estiveram presentes, juntos do meu coração, enlaçados aos meus mais nobres sentimentos.

Ao *Milton*, pela compreensão, paciência, carinho, partilha e encorajamento sempre e sempre... Sem os quais este caminho teria sido muito mais árduo.

Aos meus irmãos e familiares, pelo apoio, afeto e dedicação constantes... sentimentos e ações que enobrecem a existência de qualquer ser.

O que constitui a essência da descoberta científica não é ver alguma coisa primeiro, mas estabelecer uma sólida relação entre o que já se conhecia e o que é até então desconhecido. É precisamente esse processo de relacionar que pode promover a verdadeira compreensão...

Hans Selye

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 CUTIA.....	4
2.2 ESTRESSE.....	9
2.3 CORTISOL.....	17
2.4 LACTATO DESIDROGENASE.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1 PROTOCOLO DA ANESTESIA.....	33
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
4.2.1 Espectrofotometria das Amostras de Sorô.....	33
4.2.2 Níveis Séricos de LDH.....	33
4.2.3 Eficácia do Ensaio de Cortisol.....	36
4.2.4 Níveis Séricos de Cortisol.....	36
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Espécime adulto de *Dasyprocta azarae* farmacologicamente contido com a associação de cloridrato de xilazina, cloridrato de cetamina e sulfato de atropina. 6
- Fig. 2. Reação reversível da conversão de L-lactato a piruvato por ação da lactato desidrogenase. 23
- Fig. 3. Valores médios de LDH sérica, em U.I./l, encontrados em cutias (*D. azarae*) provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (ZMC) e do Museu de História Natural (MHN). (ANOVA). 34
- Fig. 4. Valores médios de LDH sérica, em U.I./l, encontrados em cutias (*D. azarae*), em diferentes horários de colheita de sangue, sendo: A = 08:00 - 10:30 h; B = 10:31 - 13:30 h; C = 13:31 - 16:30 h. (ANOVA). 34
- Fig. 5. Valores médios de LDH sérica, em U.I./l, encontrados em cutias (*D. azarae*) jovens e adultas de ambos os sexos. Os números sobre as barras representam o número de animais em cada grupo, aonde MJ = macho jovem, MA = macho adulto, FJ = fêmea jovem e FA = fêmea adulta. (ANOVA). 35
- Fig. 6. Mensuração de cortisol, em µg/dl, em três amostras diluídas de soro de cutia (*D. azarae*) para verificar a eficácia do ensaio. A, B e C representam cada uma das amostras e 2, 4 e 8 as diluições 1:2, 1:4 e 1:8, respectivamente. 36
- Fig. 7. Valores médios de cortisol sérico, em µg/dl, encontrados em cutias (*D. azarae*) provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (ZMC) e do Museu de História Natural (MHN). (ANOVA). 37
- Fig. 8. Valores médios de cortisol sérico, em µg/dl, encontrados em cutias (*D. azarae*), em diferentes horários de colheita de sangue, sendo: A = 08:00 - 10:30 h; B = 10:31 - 13:30 h; C = 13:31 - 16:30 h. (ANOVA). 37
- Fig. 9. Valores médios de cortisol (µg/dl) para as variáveis sexo e idade. Os números sobre as barras representam o número de animais em cada grupo, aonde MJ = macho jovem, MA = macho adulto, FJ = fêmea jovem e FA = fêmea adulta. (ANOVA; Teste de Tukey; *p < 0,05). 38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Doses de cloridrato de cetamina, cloridrato de xilazina e sulfato de atropina, calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica a partir de doses para o cão doméstico, a serem administradas a exemplares de <i>D. azarae</i>	28
Quadro 2. Distribuição dos animais de experimentação em subgrupos para análise estatística.	32

LISTA DE TABELAS

Tab. 1. Valores de "p" e "f" obtidos pelo Teste "t" de Student para a absorvância de amostras de soro de cutia (<i>D. azarae</i>) separadas pelo grau de hemólise.	33
Tab. 2. Valores de ANOVA para os níveis séricos de LDH de soro de cutia (<i>D. azarae</i>).	35
Tab. 3. Valores de ANOVA para os níveis séricos de cortisol de soro de cutia (<i>D. azarae</i>).	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
- ALT: alanina aminotransferase
- cAMP: adenosina monofostato cíclico
- ANOVA: análise de variância
- CAH: hiperplasia adrenal congênita
- CBG: globulina ligante de cortisol
- CD4⁺: *cluster of differentiation*
- CRH: hormônio liberador de corticotrofina
- CPK: creatina fosfoquinase
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- F: razão entre variâncias
- GABA: ácido gama-amino-butírico
- GH: hormônio do crescimento
- HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal
- IL: interleucina
- LDH: lactato desidrogenase
- LH: hormônio luteinizante
- LTD: *long-term depression*
- LTP: *long-term potentiation*
- α -MSH: hormônio estimulador de α -melanócitos
- MC: miopatia de captura
- NAD: nicotina adenina dinucleotídeo
- NADH+H⁺: nicotina adenina dinucleotídeo reduzida
- NK: *natural killer*
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- p: probabilidade
- PAF: fator de ativação plaquetária
- RIA: radioimunoensaio
- RNA: ácido ribonucléico
- SNA: sistema nervoso autônomo
- SNC: sistema nervoso central
- TNF α : fator de necrose tumoral alfa
- TSH: hormônio estimulador da tireóide
- U.I.: unidade internacional
- VIP: peptídeo intestinal vasoativo

RESUMO

MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTISOL E DE LACTATO DESIDROGENASE COMO INDICADORES DE ESTRESSE EM CUTIA (*Dasyprocta azarae*)

O estresse é uma síndrome que acomete animais, e em particular, aqueles de vida cativa. Associada ao estresse está a miopatia de captura, enfermidade capaz de produzir lesões sistêmicas que levam os animais rapidamente ao óbito. Em ambas as circunstâncias ocorrem alterações hormonais e enzimáticas. O presente trabalho objetivou mensurar níveis séricos de cortisol e de lactato desidrogenase (LDH) como indicadores de estresse em cutias (*Dasyprocta azarae*), animal típico da fauna paranaense e que possui importante ação ambiental como dispersor de sementes. Foram utilizadas 28 cutias, sendo cinco provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (ZMC) e 23 do Criadouro Científico do Museu de História Natural de Curitiba Capão da Imbuia (MHN). Os animais foram mantidos em jejum por 14 a 16 horas e então contidos farmacologicamente com a associação de cloridrato de xilazina, cloridrato de cetamina e sulfato de atropina. No 20.º min da anestesia procedeu-se a colheita de sangue. O soro foi separado por centrifugação para subsequente dosagem de LDH através de espectrofotometria e de cortisol através de radioimunoensaio de fase sólida (RIA) de uso humano. Os resultados mostraram não haver diferença entre os níveis séricos de LDH quando as variáveis procedência, sexo, idade e hora de colheita foram analisadas, sendo $259 \pm 153,43$ UI/l o valor médio. A análise das variáveis hora de colheita e procedência também mostrou não haver diferença significativa para os níveis de cortisol. No entanto, nas fêmeas o valor médio ($82,25 \pm 58,14$ µg/dl) foi significativamente maior do que o valor nos machos ($45,11 \pm 13,35$ µg/dl), sendo a maior diferença observada entre machos adultos e fêmeas jovens. O valor de cortisol em uma fêmea gestante ($201,48$ µg/dl) foi mais elevado do que a média das demais fêmeas. Concluiu-se que ambos os grupos de cutias deviam estar sendo criados em condições similares; que os valores de cortisol foram mais elevados em fêmeas; que a associação anestésica utilizada foi eficaz para a contenção durante o colheita de sangue; que o kit de RIA de uso humano mostrou-se eficaz para a dosagem de cortisol sérico em cutias; que o cortisol não apresentou ritmo circadiano, e, adicionalmente, foi possível supor que durante a gestação de cutias a cortisolemia eleva-se.

Unitermos: cutias, *Dasyprocta azarae*, cortisol, lactato desidrogenase

ABSTRACT

MEASUREMENT OF CORTISOL AND LACTATE DEHYDROGENASE SERIC LEVELS AND THEIR ROLES AS STRESS INDICATORS IN AGOUTIS (*Dasyprocta azarae*)

Stress is a syndrome that commonly affects animals, particularly those in captivity. In close association with the stress syndrome is the capture myopathy, a disease capable of producing systemic lesions and quick death. In both circumstances, hormonal and enzymatic changes occur in the body. In the present study the objective was to measure cortisol and lactate dehydrogenase in serum. The measurements served as stress parameters in agoutis (*Dasyprocta azarae*), a typical specie from Paraná state fauna and very important to the environment as a seed spreader. Twenty eight agoutis were used in the experiment, five originating from Zoológico Municipal de Curitiba (ZMC) and 23 from Criadouro Científico do Museu de História Natural de Curitiba Capão da Imbuia (MHN). Food was withheld from the animals for 14 to 16 hours and they were then pharmacologically restrained by the association xylazine hydrochloride, ketamine hydrochloride and atropine sulfate. Blood samples were taken 20 min after the administration of the anesthesia. The serum was separated by centrifugation and then LDH levels were measured by spectrophotometry. Cortisol levels were measured by solid phase radioimmunoassay (RIA), the same method used in humans. Statistical analysis reveals no differences among the LDH seric levels when precedence, sex, age and time of blood removal were considered. The mean value was found to be $259 \pm 153,43$ IU/l. The variable analysis between time of day and precedence did not show difference when the cortisol level was considered. However, females exhibited a mean cortisol value ($82,25 \pm 58,14$ $\mu\text{g/dl}$) which was significantly higher than that found in males ($45,11 \pm 13,35$ $\mu\text{g/dl}$), the difference was even more pronounced between adult males and young females. The cortisol level of a pregnant female ($210,48$ $\mu\text{g/dl}$) was found to be higher than the mean values of the rest of the females. The conclusion is that both agouti populations were being bred under similar conditions; cortisol values were higher in females; the anesthetic method used in the experiment was efficient for drawing blood samples; the RIA kit used for human blood samples showed to be as efficient in agoutis; cortisol did not show a circadian rhythm and, additionally, it was possible to estimate that during agouti gestation, cortisol levels are higher than normal.

Key-words: agouti, *Dasyprocta azarae*, cortisol, lactato dehydrogenase

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que na Terra existem cerca de dez milhões de espécies vivas, 50 a 90 por cento das quais estão presentes nas florestas tropicais (FAO & UNESCO, 1992).

Desde o seu aparecimento no Novo Mundo, durante o Eoceno, os roedores têm sido submetidos a uma adaptação intensa. Assim, este grupo exibe uma diversidade que é, em comparação com outros grupos de mamíferos do mesmo nível taxonômico, extraordinária (SMYTHE, 1978). No Quaternário o Brasil possuía rica fauna de roedores, representada pelos gêneros *Hydrochaeris*, *Cavia* e *Dasyprocta*. Sob o ponto de vista zoogeográfico o conjunto de roedores presentes no Brasil oferece particularidades notáveis (GOELDI, 1893).

Nas regiões tropical e subtropical da Terra os animais selvagens são importante fonte natural renovável utilizada pelas populações indígenas. A utilização não é meramente limitada a necessidades pessoais como a obtenção de carne ou couro e pele para confecção de roupas, de adornos ou para uso em medicina, mas serve também como base para transações comerciais de permuta ou venda (VON RICHTER, 1979).

As cutias são uma importante fonte de alimento para o homem (CABRERA & YEPES, 1960; SMYTHE, 1978; TOLEDO, 1995). Crônicas escritas no século XVI, pouco após o desembarque dos portugueses em terras brasileiras, atestam que os índios costumavam fornecer alimento a cutias, para posteriormente alimentar-se delas (TOLEDO, 1995). A carne, geralmente, não é considerada tão saborosa quanto a de paca (*Agouti paca*), mas são presas mais fáceis durante a caça. Para muitas populações que vivem próximas das áreas habitadas por cutias e cuja alimentação é cronicamente deficiente em proteínas, estes animais são uma das principais formas de suplementação protéica (SMYTHE, 1978). Segundo WETTERBERG *et al.* (1976), a carne de cutia é uma das preferidas pelo público freqüentador de restaurantes em Manaus, bem como é um dos animais mais caçados para consumo nas comunidades ao longo da rodovia Transamazônica (SMITH, 1976).

Além de se constituírem em alimento para o homem, as cutias também são importantes na dieta de vários carnívoros. Na natureza, elas são provavelmente a principal fonte alimentar de alguns felinos (*Felis pardalis*, *Panthera onca*, *Felis concolor* e *Felis yaguaroundi*) e de quatis (*Nasua narica*) (SMYTHE, 1978).

A pressão antrópica imposta à fauna, representada pela caça predatória e pela progressiva destruição das áreas naturais que lhes servem de habitat, tem diminuído progressivamente a diversidade de espécies selvagens. Estimou-se que, em 1983, o número de animais abatidos clandestinamente na Amazônia girou em torno de dois milhões (FAUNA..., 1984). No estado do Paraná, também são crescentes os problemas ambientais, destacando-se os impactos causados pelo desmatamento da vegetação ribeirinha e de florestas, o aumento das áreas de lavoura e a construção de barragens e hidroelétricas, especialmente nas bacias dos rios Paraná e Iguaçu (BRASIL, 1998). Frente a este quadro, o prognóstico de sobrevivência para algumas espécies é bastante reservado, o que torna necessária a manutenção e a reprodução de tais animais em cativeiro, como forma de preservá-los e também de estudar seu potencial zootécnico e suas particularidades fisiológicas.

As espécies selvagens não prosperam a menos que o ambiente seja favorável (FITZPATRICK, 1963), pois seu sucesso reprodutivo e a sua sobrevivência dependem de um manejo correto (SALTZ *et al.*, 1995). Plantas e animais conservados em jardins botânicos, criadouros e zoológicos podem ser usados para recuperar terras degradadas, reintroduzir espécies no ambiente selvagem e repor populações esgotadas (FAO & UNESCO, 1992). Para tanto, porém, os animais devem estar em boas condições e ausentes de situações estressantes no cativeiro.

A preocupação com o meio ambiente encontra respaldo na medida em que o direito à vida, como o mais importante direito fundamental dos seres vivos, é o valor pelo qual deve-se pautar toda a atuação nessa área, pois é através da proteção do meio ambiente que se protege um valor de maior importância, a vida com qualidade (BRASIL, 1998).

Considerando esses fatores de implicações sócio-econômicas e conservacionistas e visando maior conhecimento de parâmetros fisiológicos de cutias é que o presente trabalho foi proposto, com os objetivos de:

- Contribuir para o incipiente estudo da *Dasyprocta azarae*, espécie típica da fauna paranaense;
- Mensurar os níveis séricos de cortisol e de lactato desidrogenase como parâmetros de estresse em animais provenientes de dois diferentes locais;
- Avaliar se o hormônio cortisol apresenta ritmo circadiano, comum em diversas espécies animais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CUTIA

A América do Sul ascendeu em número de espécies animais durante o período Terciário, quando muitos mamíferos tiveram origem em consequência do seu isolamento do resto do mundo. Muitas destas espécies desapareceram entre as épocas Miocena e Pliocena, como resultado da competição com outros mamíferos provenientes das Américas Central e do Norte. Sobreviveram apenas os grupos mais prósperos e diversificados, como a sub-ordem de roedores Hystriognathi. Muitos desses animais, que incluem alguns dos grandes roedores, ainda habitam as regiões neotropicais. (DUBOST, 1988). A ordem Rodentia conta com, aproximadamente, 1.750 espécies (EMMONS & FEER, 1990), das quais as capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) são as de maior porte (CLARK & OLFERT, 1986).

A principal característica dos roedores é a presença de quatro dentes incisivos, proeminentes e amarelados, com crescimento contínuo durante toda a sua vida. Como um processo natural de desgaste destes incisivos, os animais passam boa parte do tempo roendo pedaços de madeira, objetos, troncos de árvores e alimentos. (CLARK & OLFERT, 1986).

Dentre os roedores, os hystriognatas são numericamente pouco expressivos, correspondendo a 9,8% das espécies e 15,2% dos gêneros existentes, mas incluem as espécies de maior porte corporal (DUBOST, 1988). A principal característica destes animais é a existência de uma mandíbula com estrutura especializada para a sustentação de músculos (EMMONS & FEER, 1990) como o masseter lateral, por meio de distorção do processo angular, e o masseter mediano, por meio de uma crista nos alvéolos da série molar, além de um forame infra-orbitário bastante largo (MOOJEN, 1952).

A classificação sistemática da *Dasyprocta azarae*, segundo WOODS (1993) é a seguinte:

- Classe MAMMALIA
- Ordem RODENTIA
- Sub-Ordem Hystriognathi
- Família Dasyproctidae

- Gênero *Dasyprocta* Illiger, 1811. Prod. Syst. Mamm. Avium., p.93.
- *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823. Verz. Doublet. Zool. Mus. Berlin, p. 3.

À família *Dasyproctidae* pertencem cutias e cotiaras (MOOJEN, 1952). As cotiaras (*Myoprocta* spp.) são semelhantes às cutias, mas consideravelmente menores (SMYTHE, 1978). As cutias são animais adaptados à vida terrestre por uma redução de dedos funcionais, sendo quatro nos membros torácicos e três nos membros pélvicos. As unhas dos membros torácicos são ligeiramente arqueadas dando-lhes capacidade de escavar, embora não sejam verdadeiros cavadores. As extremidades posteriores são bem maiores do que as anteriores, capacitando-as para saltos (MOOJEN, 1952; CABRERA & YEPES, 1960), enquanto os membros anteriores são utilizados para conduzir o alimento à boca (MOOJEN, 1952).

As cutias (*Dasyprocta* spp.), segundo EMMONS & FEER (1990) e REDFORD & EISENBERG (1992), além de apresentarem grande variação geográfica, ainda não receberam uma revisão taxonômica moderna. Elas são divididas em muitas espécies sem se saber exatamente as origens de cada uma delas. É possível que no futuro haja reclassificação e redução para duas ou três espécies apenas, em função das características fenotípicas e da distribuição geográfica.

Segundo REDFORD & EISENBERG (1992), a família *Dasyproctidae* distribui-se geograficamente desde Veracruz, no México, até o norte da Argentina e Uruguai em habitats únicos apropriados. Pela descrição de CABRERA & YEPES (1960) a *D. azarae* encontra-se distribuída nos estados do Sul do Brasil, enquanto EMMONS & FEER (1990) afirmam que sua distribuição abrange o leste dos Andes, a partir de Santa Cruz (Bolívia), leste de São Paulo, florestas tropicais do sudeste do Mato Grosso e ainda sul e norte da Argentina e do Paraguai. MOOJEN (1952), HONACKI *et al.* (1982) e WOODS (1993) afirmaram que a localidade típica é o estado de São Paulo. LANGE (1998) relatou que a Região Metropolitana da cidade de Curitiba (PR) é contemplada com esta espécie. Sua permanência neste espaço, entretanto, encontra-se ameaçada pela destruição desordenada do ambiente natural e pelo avanço da ocupação urbana, pois cutias e cotiaras se ausentam de áreas

modificadas pelo homem, como plantações e florestas secundárias (DUBOST, 1988).

A *D. azarae* é uma das espécies mais distintas dentre as cutias. Os pêlos ao longo do corpo, sempre espessos e lisos (TOLEDO, 1995), possuem coloração de cinza a preta, com partes alaranjadas ou amarelo escuro (EMMONS & FEER, 1990). A superfície ventral da *D. azarae* também é amarelada (MOOJEN, 1952), e devido a estas características na pelagem é que são chamadas de cutias- amarelas (Figura 1) . Os adultos atingem peso de 2,0 a 3,5 kg (MOOJEN, 1952; EMMONS & FEER, 1990). No entanto, LANGE (1998) encontrou exemplares adultos de *D. azarae* pesando até 4,0 kg, assemelhando-se ao peso da *D. punctata* (MERRIT, 1983). O tamanho médio encontrado por LANGE (1998) para animais com seis meses de idade foi de 48,33 cm, corroborando dados publicados anteriormente por DEUTSCH & PUGLIA (1988). A cauda é rudimentar e nua (MOOJEN, 1952), estando quase oculta entre os pêlos (CABRERA & YEPES, 1960).

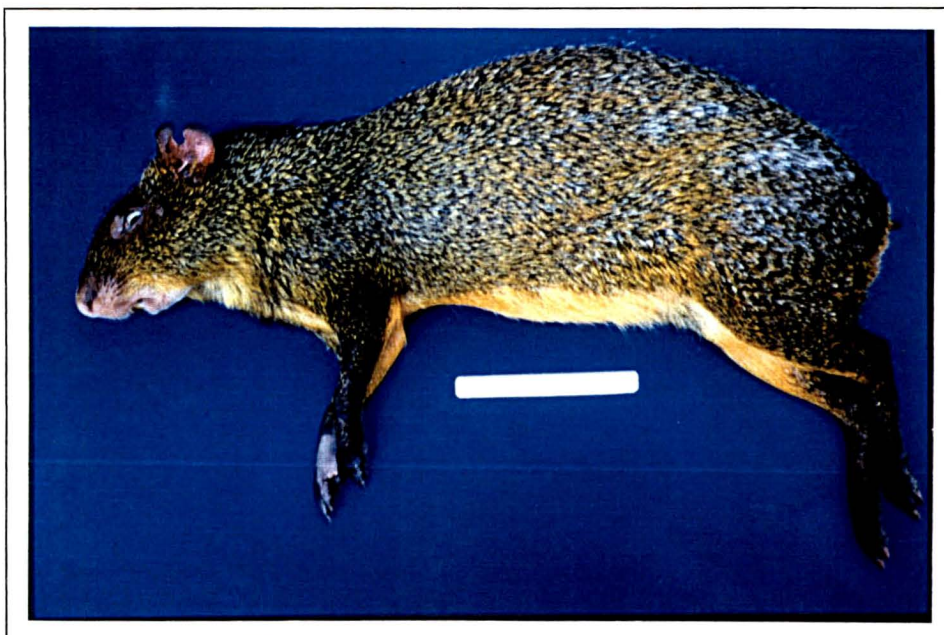


Fig. 1. Espécime adulto de *Dasyprocta azarae* farmacologicamente contido com a associação de cloridrato de xilazina, cloridrato de cetamina e sulfato de atropina.

Segundo DEUTSCH & PUGLIA (1988) e CLARK & OLFERT (1986) a maturidade sexual das cutias é atingida aos seis meses de idade. MERRIT (1983) relatou que a puberdade em *D. punctata* deve ocorrer próximo de um ano de idade,

enquanto um estudo feito por LANGE (1998) com espécimens de *D. azarae* criados em cativeiro demonstrou que a maturidade em fêmeas ocorre aos 10,83 (\pm 3,48) meses, enquanto os machos apresentaram-se mais precoces. O comportamento reprodutivo da *D. azarae* observado por LANGE (1998) foi do tipo poliestral contínuo, assim como o ciclo da *D. prymnolopha* (GUIMARÃES, 1993), com período médio de cio de 31 dias (GUIMARÃES *et al.*, 1992). O período de gestação da *D. azarae* é de aproximadamente 103 a 104 dias, e os filhotes, cerca de dois ou três, nascem cobertos de pêlos, com olhos abertos e capazes de andar (MOOJEN, 1952; LANGE, 1998). A presença de duas vesículas gestacionais medindo 2,3 cm de diâmetro, portanto no terço inicial de gestação, foi descrita por AUGUSTO *et al.* (1995) que utilizaram o método ultrassonográfico para diagnóstico de gestação gemelar em um espécime fêmea de *D. azarae*. O período normal de lactação, segundo CLARK & OLFERT (1986), tem duração de três meses.

As cutias são animais muito alertas e entram em pânico ao mínimo sinal de alarme. São bastante tímidas, mas em cativeiro podem perder esta característica. São animais de vida solitária ou podem viver em casais, mas os machos não toleram outros em um mesmo recinto. São ágeis e podem saltar longas distâncias, sendo que sua maior atividade ocorre durante o dia. O tempo de vida máximo estimado para uma cutia é de 18 anos (CLARK & OLFERT, 1986).

Fósseis de um animal semelhante a uma cutia e de uma árvore (*Astrocaryum* spp.) foram encontrados na América do Sul, com idade de 35 milhões de anos. A sua presente relação sugere que estes dois seres possam ter exercido pressão seletiva em um ou outro durante suas respectivas histórias evolutivas. As cutias enterram sementes de diversos de seus alimentos durante períodos de abundância, e as desenterram durante períodos de escassez, quando então constituem um importante componente da sua dieta (SMYTHE, 1989; REDFORD & EISENBERG, 1992). Por causa deste hábito são importantes agentes dispersores de sementes, uma vez que as enterram a uma distância de até 50 metros do local onde as encontraram (SMYTHE, 1978; SMYTHE, 1989; REDFORD & EISENBERG, 1992). Um estudo feito por FORGET (1992) demonstrou que as cutias desenvolvem papel essencial na dispersão de *Gustavia superba*, uma árvore lecitidácea de ocorrência em Barro Colorado, no Panamá, onde a ausência destes animais compromete o

ecossistema. O mesmo fato foi relatado por SMYTHE (1989) com relação à planta *Astrocaryum standleyanum*, que também depende das cutias para sua perpetuação. Os roedores, portanto, assumem ecologicamente a função de dispersores de sementes, além de contribuírem para o enriquecimento do solo com suas fezes.

Recentemente relatou-se que *D. azarae*, além de herbívora, é também zoófaga. MONTEIRO-FILHO *et al.* (1995) verificaram que houve pronta predação de filhotes de *Gallus gallus* e de adultos de *Cothurnix japonica*, bem como a ingestão de ovos de ambas as espécies quando oferecidos a exemplares de cutias mantidos em cativeiro, sugerindo que, em condições naturais, são potenciais predadores de aves e de ninhos construídos a seu alcance. Ao se alimentarem, as cutias costumam ficar sentadas sobre os membros posteriores, segurando e girando habilmente a comida com os membros anteriores (TOLEDO, 1995).

Muitos roedores são menos espetaculares que animais de outras ordens e, portanto, são vistos com menos interesse pelos visitantes e responsáveis por jardins zoológicos em todo o mundo. Conseqüentemente, poucos trabalhos científicos têm sido publicados com informações sobre esta ordem de mamíferos (CLARK & OLFERT, 1986).

Existe, atualmente, interesse no estudo detalhado da *D. azarae*, uma vez que é característica da região Sul do Brasil e por estar sendo utilizada em um programa de repovoamento animal de parques públicos da cidade de Curitiba (PR). Diversos dados referentes à sua biologia, anatomia e fisiologia estão sendo obtidos a partir de pesquisas que visam esclarecer ou definir parâmetros biofisiológicos desta espécie. Alguns destes estudos foram conduzidos por FERREIRA *et al.* (1997), que pesquisaram valores para a pressão intra-ocular de cutias mantidas sob anestesia; por VILANI *et al.* (1997), que definiram valores de oximetria em cutias submetidas à anestesia dissociativa; e por MANGRICH *et al.* (1997) e ACCO *et al.* (1997a), que quantificaram parâmetros bioquímicos e físicos de urina em grupos de cutias. LANGE (1998) publicou resultados de estudos sobre a criação e a relocação desta espécie em área verde urbana de Curitiba (PR), em pesquisa que reuniu o maior volume de dados biológicos referentes a estes animais até o presente momento. Há ainda um vastíssimo campo de trabalho a ser explorado na medicina

desta importante espécie da fauna paranaense, que merece atenção pelo seu potencial zootécnico e, principalmente, pela sua atuação ambiental.

2.2 ESTRESSE

Desde a descrição da “reação de alarme” feita por Hans Selye na década de 30, muitas publicações vêm tratando deste assunto e do fenômeno chamado “síndrome geral da adaptação” ou “síndrome do estresse” (SELYE, 1936; 1946).

O estresse é uma resposta resultante da interação de um animal com o ambiente em que vive, naturalmente ou ao qual é artificialmente submetido quando em cativeiro, e é um fenômeno adaptativo (FOWLER, 1986; BREAZILE, 1987; PACHALY *et al.*, 1993). Qualquer estímulo que altere o estado homeostático de um animal, seja interno ou externo, é um agente estressante, e as diversas reações do corpo para combater esta alteração compõem a resposta do estresse (SPRAKER, 1993). Procedimentos de contenção constituem-se em um dos incidentes mais estressantes na vida de um animal (FOWLER, 1986), bem como medo, ansiedade, percepção de perigo, novos ambientes e condições de superpopulação. Muitos agentes estressantes produzem alterações comportamentais que variam de uma simples alteração na movimentação ou no apetite até o comprometimento da libido e da fertilidade, conforme a intensidade e a frequência do estímulo (SPRAKER, 1993).

O conceito de estresse foi empregado na medicina por Selye a partir do seu uso na engenharia, onde significava um conjunto de forças que atuavam contra determinada resistência (ROITMAN, 1989). Ainda, na linguagem corrente da época, *stress* significava solicitação excessiva do sistema nervoso central (SELYE, 1959). Este mesmo autor usou, inicialmente, o termo “síndrome geral da adaptação” para definir manifestações individuais que estimulavam defesas adaptativas. Mais tarde passou a chamar de estresse o estado manifestado pela síndrome geral de adaptação, que para ele era a soma de todas as reações sistêmicas não-específicas do corpo que sucedem uma exposição contínua a estímulos nocivos (SELYE, 1946). O conceito de estresse é universalmente entendido, entretanto, depois de algumas décadas de pesquisas sobre este tema, uma definição clínica ainda não foi

estabelecida. A razão encontra-se no fato do estresse ser um conceito abstrato, e de que existem algumas dúvidas importantes ainda a serem esclarecidas: 1) parâmetros biológicos que melhor indiquem o estresse; 2) falta de respostas não-específicas que realmente caracterizem cada tipo de agente estressante; 3) variabilidade interanimal na resposta ao estresse; e 4) incapacidade para estabelecer uma correlação entre a mensuração do estresse e o impacto no bem-estar animal (MOBERG, 1987).

BREAZILE (1987) definiu três formas de estresse: "eustresse" ou "bom estresse", que é um estímulo benéfico ao animal, sendo a homeostase mantida; "estresse neutro", que não provoca reações malélicas e tão pouco benéficas ao animal; e "distresse", que pode ou não por ele próprio ser prejudicial ao animal, mas envolve respostas que interferem no bem-estar e/ou na reprodução e são capazes de induzir alterações patológicas. ROITMAN (1989) discorda deste autor e de FOWLER (1986). Para ele, o estresse é um fenômeno no qual não se consegue uma resposta suficientemente adaptativa. Segundo SELYE (1936; 1946), a resposta adaptativa envolve três fases distintas: reação de alarme, estágio de resistência e estágio de exaustão. A adaptação fisiológica é o desenvolvimento de processos de adaptação ao estresse que levam ao retorno à homeostase, e exaustão é a falha nestes processos adaptativos (PACHALY *et al.*, 1993).

No presente trabalho foi utilizado o termo "estresse" para definir o que BREAZILE (1987) chamou de "distresse", isto é, um estímulo orgânico cujas respostas são freqüentemente funcionais e iniciam uma variedade de distúrbios, como alteração no comportamento alimentar, hipertensão, ineficiência reprodutiva e de conversão alimentar, ulcerações gástricas ou duodenais, desequilíbrio eletrolítico e deficiências imunológicas.

Segundo FOWLER (1986), os agentes estressantes podem ser classificados como somáticos (sons, odores, pressão, frio, estiramento anormal de tendões e músculos e efeitos de drogas ou agentes químicos), psicológicos (apreensão, ansiedade, medo, fúria e frustração), comportamentais (superpopulação, disputas hierárquicas, falta de contato social e mudanças no ritmo biológico) e variados (má nutrição, parasitos, infecções, cirurgias, imobilização química ou física e confinamento). A temperatura e a restrição dietética têm sido

descritas como agentes estressantes para coelhos, influenciando a resposta imunológica (FRANCI *et al.*, 1996), entretanto, têm havido divergências com relação ao efeito do estresse nutricional na reprodução de taiassuídeos (LOCHMILLER *et al.*, 1986; 1987). A contenção física e o transporte estão entre os principais agentes estressantes para espécies animais selvagens e domésticas. Desta forma, são usados como modelos de estresse em pesquisas (GANHAO *et al.*, 1989; WILLEMSE *et al.*, 1993; MINTON *et al.*, 1995; MORTON *et al.*, 1995; ROOZEN *et al.*, 1995; LAY *et al.*, 1996; NWE *et al.*, 1996; THUN *et al.*, 1996; MOE & BAKKEN, 1997). Outros agentes estressantes incluem os procedimentos de venopunção (YOUNG & BERMES, 1994; MOE & BAKKEN, 1996) e de descorna (COOPER *et al.*, 1995), processos inflamatórios (JAHOR *et al.*, 1995), mudanças de grupos animais socialmente estabelecidos (HANLON *et al.*, 1995) e isolamento social (MUNKSGAARD & SIMONSEN, 1996). Quando um animal é estimulado por mudanças ambientais, através de receptores, o sistema nervoso analisa e processa impulsos e responde através de vários componentes do próprio sistema nervoso para órgãos efetores, que produzem reações específicas ou não específicas, ou ainda ambas (FOWLER, 1986). Condições inadequadas durante o nascimento constituem um agente estressante para crianças até os dois meses de idade (RAMSAY & LEWIS, 1995), e o trabalho incessante comporta-se como agente estressante para a espécie humana (BENOLIEL *et al.*, 1990), na qual o estresse é considerado um problema psicossocial, pois predispõe indivíduos a uma variedade de enfermidades, como, por exemplo, doenças cardiovasculares (CASSEL, 1974).

Para assegurar o bem-estar e otimizar a saúde e a reprodução de animais de fazenda, de laboratório e de zoológico, há necessidade de elucidar os impactos biológico e psicológico do cativeiro sobre eles. Muitas situações de cativeiro podem ser cronicamente estressantes, por não permitirem respostas normais de comportamento. Ocorre, por exemplo, em felinos, que sob estas condições, apresentam redução do comportamento exploratório, reação de alerta exacerbada e escondem-se ou permanecem em repouso durante boa parte do tempo (CARLSTEAD *et al.*, 1993). Alterações comportamentais incluem aumento da agressividade e tendências anti-sociais. Animais cronicamente estressados podem recusar alimento e água, ou, em uma situação contrária, podem apresentar

polifagia. Do mesmo modo, a atividade sexual pode mostrar-se reprimida ou exacerbada, sendo a hipersexualidade evidenciada por masturbação e excessiva copulação (FOWLER, 1986).

A resposta ao estresse pode variar com a estrutura social, comportamento agressivo, idade do animal, complexidade e familiaridade do agente estressante (COOK, 1996). Cada reação a um agente estressante tem significado adaptativo, e reações extremas podem suscitar respostas potencialmente fatais em um animal (FOWLER, 1986). Uma "resposta padrão" a um agente estressante envolve a ativação do sistema límbico, que regula os comportamentos víscero-somático, sexual, defensivo, agressivo, irracional e instintivo (ROITMAN, 1989). O sistema límbico também é um regulador neuro-endócrino, e quando estimulado induz o hipotálamo a produzir o fator de neurosecreção conhecido como hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), um peptídeo que regula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este atua na córtex adrenal, resultando em um aumento da síntese e liberação de cortisol (GREKIN, 1986; BREAZILE, 1987; PACHALY, *et al.*, 1993; SPRAKER, 1993; COOK *et al.*, 1996; TRAINER *et al.*, 1998). Os receptores cerebrais para glicocorticóides estão mais concentrados no hipocampo, no septo e na amígdala (CLARK *et al.*, 1981), e em humanos foi demonstrado que o hipocampo pode sofrer atrofia em decorrência de elevados níveis de glicocorticóides, em situações severamente estressantes (SAPOLSKY, 1996). As células hipofisárias também contêm vários receptores para esteróides, que devem estar em células responsivas a seus próprios hormônios, assim as células corticotróficas possuem receptores para glicocorticóides (CLARK *et al.*, 1981). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) também está submetido ao controle da serotonina, que pode atuar diretamente nas adrenais e possivelmente na hipófise anterior, participando da resposta do estresse (DINAN, 1996).

Embora haja controvérsias a respeito da definição de estresse, dois consensos estão estabelecidos na literatura especializada: não há parâmetros específicos para a sua mensuração e os níveis de corticosteróides adrenais ainda são seus melhores indicadores. Está bem descrita a correlação entre situações estressantes e a hiperfunção no eixo HHA (FOWLER, 1986; GREKIN, 1986; BREAZILE, 1987; McDONALD *et al.*, 1988; ROITMAN, 1989; CARLSTEAD, *et al.*,

1993; GANONG, 1995; MORTON *et al.*, 1995; ROOZEN *et al.*, 1995; COOK *et al.*, 1996; LAY *et al.*, 1996; MOE & BAKKEN, 1996; NWE *et al.*, 1996; PIAZZA & LEMOAL, 1996; SAPOLSKY, 1996; CARROL *et al.*, 1997; MOE & BAKKEN, 1997). Pesquisas relacionadas com estresse têm concentrado atenção nos mecanismos e nas ações do eixo HHA, uma vez que muitos estímulos considerados agentes estressantes ativam-no. Uma técnica comumente usada para determinar a sensibilidade do eixo HHA é a administração de ACTH para testar a capacidade das glândulas adrenais de secretarem glicocorticóides (LAY *et al.* 1996), já que níveis acima dos basais têm se mostrado um índice confiável da reatividade adrenocortical ao estresse em animais e seres humanos (RAMSAY & LEWIS, 1995). Segundo JANSSENS *et al.* (1995), diversas espécies submetidas a estresse crônico ou repetido podem apresentar, como consequência, alteração prolongada ou definitiva na regulação da função do eixo HHA e aumento do peso das adrenais.

Uma importante ação dos glicocorticóides é a modulação da resposta imune, o que torna os animais estressados susceptíveis a enfermidades. Sabe-se que esteróides induzem neutrofilia, provavelmente como resultado da liberação de neutrófilos marginais na circulação. Causam também lise e marginalização de linfócitos T, de monócitos e de eosinófilos, diminuem a proliferação de células linfóides (FOWLER, 1986; BREAZILE, 1987; SPRAKER, 1993) e afetam a atividade de células CD4⁺ e NK (HINES *et al.*, 1996). A supressão da proliferação clonal de linfócitos resulta da redução de seus receptores para interleucina-1 induzida pelos glicocorticóides. Para MINTON *et al.* (1995), no entanto, o cortisol circulante não deve ser o único responsável pela diminuição da função blastogênica de linfócitos. A endorfina, um peptídeo liberado pela hipófise simultaneamente com o ACTH, e as encefalinas, sintetizadas por células medulares das glândulas adrenais e liberadas juntamente com as catecolaminas destas glândulas, também proporcionam relação entre o encéfalo e o sistema imune em animais sadios, e acredita-se que tenham influência nos mecanismos de alterações imunológicas observadas no estresse (BREAZILE, 1987). Linfopenia também foi detectada em raposas (*Vulpes vulpes*) sob condições estressantes (MOE & BAKKEN, 1996; 1997).

O estresse, segundo DHABHAR & McEWEN (1996), induz a um significativo e persistente aumento no número de leucócitos em reações de

hipersensibilidade tardia, mas não tem efeito na sensibilidade de contato, o que pode mediar aspectos benéficos (resistência a certas viroses, bactérias e tumores) e nocivos (dermatite alérgica) da função imune. Para HINES *et al.* (1996), o estresse de exercícios pode ter efeito ambíguo no sistema imune, causando tanto aumento quanto supressão do número de leucócitos.

Os glicocorticóides, em altos níveis, inibem respostas inflamatórias em danos teciduais, bem como suprimem manifestações de doenças alérgicas devidas à liberação de histamina. A diminuição da reação inflamatória local é mediada pelo aumento de lipocortinas e pela inibição da fosfolipase A-2, com conseqüente redução na liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípídeos teciduais (GANONG, 1995) e diminuição da produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas, importantes mediadores da resposta inflamatória (BREAZILE, 1987).

Uma segunda via neuroendócrina envolvida na resposta do estresse é a de interação entre o sistema nervoso simpático (SNA) e a medular das adrenais, particularmente as células cromafins (WHITLEY *et al.*, 1994). A estimulação desta via resulta na chamada "reação de fuga ou luta" ou "reação de alarme" (FOWLER, 1986), devido a uma reação da medula adrenal e liberação de adrenalina, noradrenalina e encefalinas. Em suínos, foi registrada a elevação de adrenalina e noradrenalina meio minuto após iniciar-se um procedimento de contenção física (ROOZEN *et al.*, 1995), mas dificilmente estas catecolaminas respondem ao estresse sozinhas, já que são liberadas concomitantemente ao cortisol (NWE *et al.*, 1996). As catecolaminas liberadas produzem efeito inotrópico positivo, constrição de vasos localizados nos rins, pele, sistema digestivo e tecidos conectivos, e correspondente dilatação de vasos do encéfalo, musculatura esquelética, coração e pulmões, resultando em um desvio circulatório no sentido de preservar órgãos vitais (BREAZILE, 1987). Interagem, ainda, com células imunológicas (BREAZILE, 1987), e aumentam o catabolismo provocando lipólise e gliconeogênese (SPRAKER, 1993). Assim, a glicose plasmática pode ser usada como um indicador da atividade do eixo simpático-adrenal (MOE & BAKKEN, 1997). Foi demonstrado *in vitro* que a adrenalina e o cortisol afetam a viscosidade sangüínea de trutas (*Oncorhynchus mykiss*), assumindo importância quando estes peixes estão com o sangue

circulante hipóxico devido a algum agente estressante (SØRENSEN & WEBER, 1995).

A terceira via de resposta do estresse é a motora voluntária, que pode ser iniciada periférica ou internamente. O impulso é levado ao tálamo e ao neocórtex, onde é categorizado e integrado para transmissão em áreas motoras, que conduzem a informação a núcleos inferiores através da medula espinhal e dos nervos periféricos. As atitudes observadas em resposta ao estímulo desta via podem variar grandemente entre as espécies, incluindo esquivar-se, esconder-se, debater-se, correr, tentar fugir, vocalizar ou agredir (FOWLER, 1986; PACHALY *et al.*, 1993).

A resposta ao estresse é extremamente complexa, e inclui outros moduladores e ações além daqueles supracitados. Muitos mediadores imune/inflamatórios têm se mostrado potentes ativadores do eixo HHA, incluindo interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6), interferons, metabólitos de fosfolípidos (eicosanóides e PAF), aminas (histamina e serotonina), enzimas (fosfolipase A) e lipocortina 1. Esta tem como principal função mediar a ação de glicocorticóides no sistema neuroendócrino (BUCKINGHAM, 1996). A liberação de renina do sistema justaglomerular renal, a síntese e liberação de vasopressina pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, de VIP através da estimulação simpática do intestino, de substância P através da estimulação simpática de terminações nervosas em vários tecidos (BREAZILE, 1987; SPRAKER, 1993), de ocitocina (ESPLUGUES *et al.*, 1996) e a liberação de α -MSH pelo lobo intermediário da hipófise (WILLEMSE *et al.*, 1993) também estão envolvidos na resposta do estresse. Segundo POPOVIC *et al.* (1996), estímulos estressantes interferem na resposta da medular adrenal à ocitocina.

É interessante notar que o estresse induzido por choque, por extensas queimaduras, por sepse ou por grandes traumas está associado à hiposecreção gástrica, enquanto o estresse relacionado a lesões cerebrais é acompanhado de hipersecreção gástrica. Segundo ESPLUGUES *et al.* (1996), a inibição da secreção gástrica é mediada por um reflexo nervoso envolvendo uma via neuronal que inclui a síntese de óxido nítrico (NO) no cérebro, especificamente no núcleo motor dorsal do vago. A L-arginina faz parte da mesma via neuronal do NO, ativada durante o

estresse. O NO é sintetizado pela NOS (sintase do óxido nítrico) a partir de impulsos nervosos mediados pelo glutamato em células cerebrais, resultando em uma reação NADPH+H⁺-dependente, na qual o O₂ reage com a arginina, formando NO e citrulina. KAWABATA & HATA (1996) também acreditam no envolvimento do NO como mediador do estresse, particularmente na fibrinólise induzida nesta situação. O NO atuaria suprimindo a atividade do fator inibidor da ativação do plasminogênio, liberado das plaquetas. Este fato, associado à diminuição do número de plaquetas, à queda dos níveis plasmáticos de fibrinogênio e à redução do tempo de lise de coágulos, também presentes no estresse, implicaria em insuficiência circulatória.

O maior problema clínico relacionado com a reação de alarme são as contusões, concussões, lacerações, injúrias nervosas, hematomas e fraturas originadas da atitude de fuga ou luta. Tais lesões comumente se seguem a práticas de contenção. A reação de alarme pode também modificar a resposta do organismo a uma série de drogas, incluindo os agentes de contenção farmacológica rotineiramente utilizados (FOWLER, 1986; PACHALY *et al.*, 1993). Alterações na concentração de proteínas plasmáticas, em decorrência do estresse agudo, também podem afetar a cinética de alguns fármacos (MOYER & PIPPENGER, 1994). Um outro problema decorrente da estimulação simpática é a diarreia, que pode ocorrer por diminuição da motilidade gastrointestinal e conseqüente exacerbação do crescimento bacteriano, e por liberação do VIP, que por um mecanismo dependente do cAMP induz hipersecreção intestinal (BREAZILE, 1987).

As conseqüências do estresse crônico sobre a reprodução estão entre as maiores preocupações de pesquisadores que trabalham com animais selvagens, principalmente de cativeiro. Um efeito bem conhecido do estresse é o decréscimo na libido, na fertilidade, na implantação de óvulos fertilizados e no desenvolvimento fetal, o que tem levado à proposição de melhorias nos recintos dos animais, com o objetivo de minimizar tais conseqüências (BREAZILE, 1987; SPRAKER, 1993). A infertilidade, segundo THUN *et al.* (1996), é provocada pela ativação dos sistemas HHA e simpático-adrenal, e ainda pela ação direta de glicocorticóides sobre os ovários. Estes autores, entretanto, observaram que o aumento de cortisol devido ao estresse agudo por contenção não afetou a secreção do LH, tanto em vacas em estro quanto naquelas em diestro, o que sugere uma reação individual estímulo-

específica. Para BREAZILE (1987), no entanto, os mecanismos pelos quais o sistema límbico afeta a liberação de LH parecem representar uma das formas pelas quais o estresse interfere na reprodução. Problemas reprodutivos provocados por agentes estressantes foram relatados em sagüis (*Callithrix jacchus*), que apresentaram significativa redução no volume de sêmen e na concentração espermática (CUI, 1996). Em felídeos cativos a insuficiência reprodutiva pode ser atribuída a uma diminuição da tolerância às condições do cativeiro, pois os corticosteróides excessivamente liberados nesta situação, têm ação direta sobre os níveis circulantes de testosterona, devido a uma redução na concentração de receptores de LH nas células de Leydig (CARLSTEAD *et al.*, 1993).

O estresse tem efeitos prejudiciais na performance cognitiva em muitas espécies, incluindo o homem, que exibem déficit em diversas tarefas de aprendizado e de memória (KIM *et al.*, 1996; ROOZENDAAL, 1998). Alguns resultados de pesquisas indicam que indivíduos com hipercortisolemia respondem pobremente à performance de memória frente a um agente estressante (KIRSCHBAUM *et al.*, 1996), principalmente devido a seus efeitos sobre o hipotálamo, uma estrutura vital para o aprendizado e a memória (SAPOLSKY, 1996). Os mecanismos neurais com que agentes estressantes exercem estas ações ainda não estão definidos, mas os efeitos do estresse sobre a LTP e a LTD parecem ser mediados através da ativação de subtipos de receptores NMDA (KIM *et al.*, 1996).

2.3 CORTISOL

As glândulas adrenais diferem entre classes e espécies zoológicas quanto à morfologia, à anatomia e aos produtos de secreção. Em peixes, freqüentemente, os tecidos cromafins e adrenocorticais são separados; em pássaros estes tecidos parecem fundidos; em cães e em cobaias o tecido adrenocortical é mais abundante do que o tecido cromafim, em torno de cinco e 60 vezes mais predominante, respectivamente. O córtex adrenal de mamíferos é dividido em zonas, mas a zona glomerulosa não é vista em alguns deles, como lêmures, camundongos e macacos (BENTLEY, 1982).

Histologicamente, a adrenal de mamíferos tem três zonas: glomerulosa (externa), fasciculada (intermediária) e reticular (interna) (LIDDLE, 1974), que se

comportam, segundo seus produtos de secreção e de regulação, como glândulas distintas. A fasciculada é primariamente controlada pelo ACTH, enquanto a glomerulosa o é pelo sistema renina-angiotensina (NEW *et al.*, 1983). O cortisol ou hidrocortisona, principal glicocorticóide endógeno, é sintetizado a partir da pregnenolona pela camada fasciculada da córtex adrenal e em menor quantidade pela reticular (DUNCAN & PRASSE, 1982; WHITLEY *et al.*, 1994; Di RIO *et al.*, 1994), em uma quantidade de 20 a 25 mg por dia em seres humanos (GREKIN, 1986; WHITLEY *et al.*, 1994). A zona glomerulosa produz aldosterona e corticosterona, mas é deficiente em 17α -hidroxilase e assim não é capaz de formar 17α -hidroxiprogesterona, um dos precursores do cortisol. Foi demonstrado que as glândulas adrenais de ratos hipertensos possuem maior número de grânulos eletrondensos do que as adrenais de ratos hipotensos, e que tais grânulos aumentam quando estimulados pelo ACTH, sugerindo que contenham esteróides em seu interior (PUDNEY *et al.*, 1981).

As adrenais são dotadas de mecanismos enzimáticos capazes de sintetizar colesterol e de captá-lo a partir da circulação. O colesterol será então convertido em diferentes esteróides, inclusive sexuais (Di RIO *et al.*, 1994), mas os corticosteróides são o mais importante grupo de esteróides adrenais, fisiológica e quantitativamente (WHITLEY *et al.*, 1994). Os vários tipos de esteróides endógenos podem ser classificados quanto ao número de átomos de carbono (C). Os que contém 21 C são os adrenocorticais e a progesterona, os que contém 19 C são os andrógenos e, finalmente, os esteróides estrogênicos são os que possuem 18 C. A sua distribuição em vertebrados é variável. A maioria dos peixes produz cortisol e corticosterona, com exceção dos holocéfalos, que produzem somente cortisol, e dos seláquios, cujo principal esteróide adrenal é o 1α -hidrocorticosterona. Nos anfíbios, aves e répteis a corticosterona é o principal esteróide. Este hormônio é também predominante em alguns mamíferos, enquanto em outros o cortisol assume maior importância. A relação cortisol:corticosterona varia com as espécies, por estar geneticamente determinada. Ratos, coelhos e camundongos secretam pouco ou nenhum cortisol devido à deficiência de 17α -hidroxilase (BENTLEY, 1982; GANONG, 1995). A maioria dos mamíferos placentados e marsupiais, no entanto, secretam mais cortisol que corticosterona, com exceção da équidna (*Tachyglossus*

aculeatus) (BENTLEY, 1982; McDONALD *et al.*, 1988). Alguns estudos feitos com células adrenocorticais de bovinos, ovinos e humanos têm indicado que a integração entre as proteinaquinases A e C é a chave determinante para a expressão diferencial de várias enzimas metabolizadoras de esteróides (BIRD *et al.*, 1998).

Algumas alterações genéticas ligadas às enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo dos glicocorticóides produzem hiperplasia adrenal congênita (CAH). A deficiência enzimática mais freqüente ocorre no processo da 21-hidroxilação, no qual a carência de 17 α -hidroxipregnenolona causa hirsutismo em homens. A deficiência de 11 β -hidroxilase induz a presença de genitália ambígua em fêmeas, e a carência de 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, 17 α -hidroxilase e colesterol desmolase induz à incompleta virilização da genitália de machos. Defeitos da 18-hidroxilase e 18-dehidrogenase causam alteração na síntese de aldosterona (NEW *et al.*, 1983; WHITLEY *et al.*, 1994). O tratamento geralmente é feito com reposição de glicocorticóides (GIRGIS & WINTER, 1997). Os neonatos humanos apresentam carência de 5 α -redutases e deficiência de glicoronil transferase e, portanto, produzem mais metabólitos 6 β -hidroxilados do que pessoas adultas (WHITLEY *et al.*, 1994).

Outros problemas clínicos conhecidos das glândulas adrenais são a hiper e a hipofunção, produzindo, respectivamente, o hiperadrenocorticismismo (síndrome de Cushing) e o hipoadrenocorticismismo (doença de Addison) (WHITLEY *et al.*, 1994). Na síndrome de Cushing, o ACTH provavelmente é secretado sem um controle coordenado dos hormônios hipotalâmicos CRH e vasopressina. Assim a sensibilidade à retroalimentação negativa do cortisol é diminuída (ROELFSEMA *et al.*, 1998). Na hipocortisolemia ocorre deficiência na produção de glico e mineralocorticóides nas adrenais, mas a deficiência isolada de glicocorticóides em associação com insuficiência primária de outras glândulas endócrinas tem sido relatada em cães (DUNN & HERRTAGE, 1998).

Em condições normais o cortisol é secretado dentro de cinco minutos após elevação da concentração sérica do ACTH (WHITLEY *et al.*, 1994), que se une aos receptores ligados à adenilatociclase, estimulando a formação do segundo mensageiro cAMP. Assim, o metabolismo celular das adrenais aumenta, o

colesterol é captado a partir do plasma e a síntese e a liberação de cortisol são intensificadas (GREKIN, 1986).

A distribuição do cortisol é feita por meio da globulina ligante de corticosteróides (CBG ou transcortina) ou da albumina, sendo que apenas 10% do hormônio plasmático circula na forma livre, que é metabolicamente ativa (Di RIO *et al.*, 1994), o restante está reversivelmente ligado às proteínas (LIDDLE, 1974). O fígado metaboliza cortisol em cortisona, incapaz de ligar-se a receptores de glicocorticóides pela redução da dupla ligação entre C4 e C5, por 5 α ou 5 β -redutases. Mais de 95% dos metabólitos do cortisol são conjugados pelo fígado, principalmente com glicuronídeos e sulfatos. O metabólito de menor peso molecular do cortisol é o 6 β -cortisol, que é excretado na urina. A excreção, além das vias urinárias, pode ser feita também pelo trato gastrintestinal, aonde os metabólitos podem ser reabsorvidos. Na senilidade ocorre redução de 25% na produção e no *clearance* de cortisol (WHITLEY *et al.*, 1994).

A secreção diária de cortisol caracteriza-se pela atividade aumentada nas primeiras horas da manhã e inatividade nas últimas horas da noite, perfazendo um ritmo circadiano (GREKIN, 1986; Di RIO *et al.*, 1994; GANONG, 1995), que pode sofrer influência do sono, da alimentação, da escuridão, da luminosidade (YOUNG & BERMES, 1994) e do estresse (HUIZENGA *et al.*, 1998). A magnitude da concentração matinal é afetada por fatores genéticos (WHITLEY *et al.*, 1994). A origem deste ritmo circadiano é o sistema nervoso central, no qual o ACTH também é liberado na forma de pulsos (LIDDLE, 1974; GREKIN, 1986). O controle do “relógio metabólico” em mamíferos está localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. A proteína mutante *CLOCK*, que foi identificada em uma linhagem diferenciada de camundongos, é responsável pela periodicidade e pela persistência do ritmo circadiano nesta espécie e, provavelmente, de outros mamíferos, mas o mecanismo ainda é desconhecido (GEKAKIS *et al.*, 1998). Esta mesma proteína foi identificada em *Drosophila* spp., onde é responsável por um ritmo circadiano rudimentar. Acredita-se que proteínas que controlam a estabilidade do DNA e a estabilidade de outras proteínas estejam também envolvidas neste controle (DARLINGTON *et al.*, 1998). No entanto, nem todas as espécies animais possuem controle circadiano da secreção de cortisol, como os gatos e os cães.

A atividade do eixo HHA varia entre indivíduos e sofre influência da auto-sensibilidade à retroalimentação hormonal, do ritmo circadiano, de episódios de secreção, dos níveis da CBG, da idade, de doenças hepáticas, renais e tireoideanas, da nutrição, de drogas e do estresse, além de estar submetida a um controle genético (WHITLEY *et al.*, 1994; HUIZENGA *et al.*, 1998).

A ativação do eixo HHA produz muitas alterações metabólicas, incluindo modulação do sistema imune e desenvolvimento de úlceras gástricas (SPRAKER, 1993; GANONG, 1995). As ações globais podem ser resumidas como gliconeogênicas, com efeitos poupadores de glicose e catabolismo intensificado de proteínas e gorduras (GANONG, 1995). Grande parte destas alterações são decorrentes dos altos níveis de cortisol circulante que afetam o metabolismo intermediário de carboidratos, de gorduras e de proteínas, que regulam o metabolismo da água (DOXEY, 1971; GANONG, 1995) e antagonizam a ação da insulina (DOXEY, 1971). Segundo RAO & ROSE (1995), glicocorticóides em excesso aumentam a secreção de insulina para contrabalançar seus próprios efeitos, assim a glicemia geralmente não se altera. Tal afirmação não é aceita por MIZOCK (1995). Para este autor, o estresse é seguido de hiperglicemia em função do aproveitamento do lactato e da alanina liberados principalmente a partir de músculos esqueléticos, na gênese de glicose. Segundo WEISS (1996), a hiperglicemia observada no estresse agudo pode ser devida à ausência de diagnóstico prévio para o diabetes melito ou devido às alterações metabólicas próprias do estresse. O estresse séptico prolongado pode ser caracterizado por ser bifásico. Inicialmente ocorre hiperglicemia em função da gliconeogênese, e na fase subsequente esta é suprimida, podendo estar associada à hipoglicemia (MIZOCK, 1995).

Quando animais ou seres humanos são expostos a estímulos potencialmente nocivos ocorre aumento da secreção de ACTH e de cortisol. Este aumento é essencial à sobrevivência. Animais hipofisectomizados ou adrenalectomizados morrem quando expostos aos mesmo estímulos estressantes (GANONG, 1995). A elevação de cortisol, a níveis suprafisiológicos durante muito tempo tem efeitos maléficos, como discutido anteriormente (item 2.2). Altas doses de glicocorticóides inibem o crescimento e diminuem a secreção

de GH e de TSH, e durante a vida fetal os glicocorticóides aceleram a maturação de surfactantes nos pulmões (GANONG, 1995).

A avaliação dos níveis circulantes de glicocorticóides, especialmente do cortisol em mamíferos, é útil no diagnóstico de distúrbios adrenocorticais e de estresse. O cortisol pode ser mensurado diretamente no plasma ou no soro pelos métodos de colorimetria (LIDDLE, 1974), radioimunoensaios (RIA), fluorimetria e ligação competitiva com proteínas. Os corticosteróides sintéticos não afetam os resultados obtidos por esses métodos (DUNCAN & PRASSE, 1982).

O cortisol também pode ser mensurado a partir de amostras de urina, fezes e saliva. A avaliação do cortisol livre na urina é um dos principais testes diagnósticos de hipercortisolismo (Di RIO *et al.*, 1994; MERICQ & CUTLER, 1998). Segundo Di RIO *et al.* (1994), a excreção urinária do cortisol livre em 24 horas é um índice direto da quantidade de cortisol não ligado à transcortina e, portanto, a excreção intensificada espelha a elevação do cortisol nos fluidos extracelulares. MERICQ & CUTLER (1998), entretanto, observaram significativo aumento da excreção de cortisol urinário durante períodos de ingestão normal e aumentada de fluidos, mas a excreção de 17-hidroxycorticosteróide não se elevou, indicando que o aumento do cortisol não parece resultar da ativação do eixo HHA, e sim que a ingestão de fluidos parece diminuir o metabolismo renal ou a reabsorção do cortisol filtrado. McLEOD *et al.* (1996), avaliaram a relação cortisol:creatinina a partir de amostras de neve contaminada com urina de lobos (*Canis lupus*) e concluíram que tal relação é adequada para indicar estresse agudo.

Do mesmo modo que na urina, moléculas não conjugadas de esteróides são secretadas na saliva por difusão passiva a partir de células acinares das glândulas salivares. Segundo COOK *et al.* (1996), existe forte correlação entre os níveis de cortisol salivar e sérico, e o cortisol livre da saliva pode ser melhor indicador de estresse do que o cortisol total medido de amostras de sangue, além de ser um método pouco invasivo. Os esteróides também podem ser extraídos de amostras fecais. Algumas publicações mostram a importância desta técnica não invasiva para o controle da reprodução de felinos selvagens através da mensuração de metabólitos de esteróides sexuais através da análise de fezes (BROWN *et al.*, 1994; GRAHAM *et al.*, 1995; BROWN & WILDT, 1997)

Os níveis de cortisol poderão ser determinados em animais capturados para identificar a potencialidade de estresse em alguns exemplares, e uma vez que tenham sido identificados deve-se tomar providências para reduzir o grau de estresse e prevenir a sua mortalidade e morbidade (MORTON *et al.*, 1995).

2.4 LACTATO DESIDROGENASE

A lactato desidrogenase (LDH) (E.C. 1.1.1.27) é uma enzima que catalisa a oxidação do L-lactato para piruvato com a mediação do NAD^+ como aceptor de hidrogênio. A reação é reversível e o equilíbrio favorece fortemente a reação reversa, nomeada *redução do piruvato para lactato*, como mostrado na Figura 2 (MOSS & HENDERSON, 1994). Em presença de NAD^+ a LDH sofre uma drástica redução no efeito *quenching*, o que possibilita determinar o piruvato baseando-se em alterações na intensidade da fluorescência da LDH, método anteriormente utilizado somente para mensurar lactato e etanol (MARCOS *et al.*, 1997).

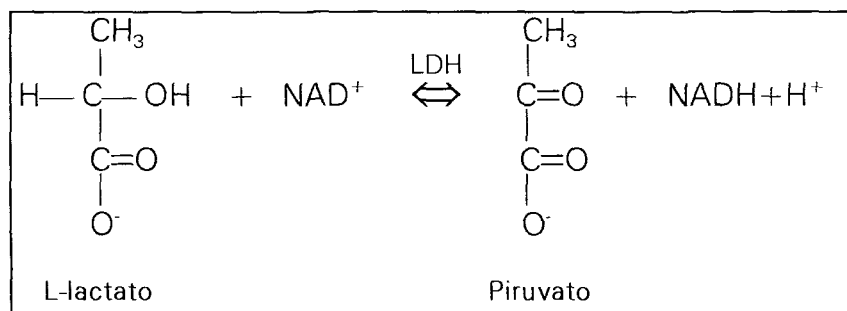


Fig. 2. Reação reversível da conversão de L-lactato a piruvato por ação da lactato desidrogenase.

Estruturalmente, a LDH comporta-se como β -folhas circundadas por α -hélices, com resíduos de histidina presentes no sítio ativo (ABELES *et al.*, 1992). A LDH tem peso molecular de 134.000 e é composta por quatro cadeias de peptídeos dos tipos M (ou A) e H (ou B), cujos controles genéticos são independentes. A deficiência genética das subunidades já foi descrita em seres humanos. A composição das subunidades determina diferentes formas múltiplas ou isoenzimas: LDH_1 , LDH_2 , LDH_3 , LDH_4 e LDH_5 (MOSS & HENDERSON, 1994; MOURA *et al.*, 1997). Há ainda uma sexta isoenzima, LDH_x , identificada também em seres humanos após

a puberdade, e uma sétima, chamada LDH₆, que tem sido encontrada em soros de pessoas severamente enfermas (MOSS & HENDERSON, 1994).

As isoenzimas são codificadas por três diferentes genes: *ldh a* (tipo muscular), *ldh b* (tipo cardíaco) e *ldh c* (tipo células germinativas testiculares). Os genes *ldh a* e *ldh b* possibilitam grande número de combinações das proteínas LDH-A e LDH-B e, particularmente, regulam as cinco primeiras isoenzimas anteriormente citadas (NEHAR *et al.*, 1997). O TNF- α e as citocinas estimulam o RNA mensageiro que regula a subunidade LDH-A (NEHAR *et al.*, 1997).

As isoenzimas variam entre espécies e entre tecidos, o que reflete diferenças na função fisiológica das mesmas. LDH₄ e LDH₅ favorecem a formação de lactato em piruvato e são encontradas em tecidos nos quais o metabolismo anaeróbico predomina, enquanto LDH₁ e LDH₂ favorecem a formação de piruvato (MILNE & DOXEY, 1987). Os níveis séricos normais das isoenzimas, no entanto, são pouco conhecidos na maioria das espécies animais, mas BEATTY & DOXEY (1983) os descreveram em ovinos, e ZHAN *et al.* (1991) em raposas, em ambas as espécies houve predominância sérica de LDH₁.

A LDH está localizada no citoplasma celular (ATROSHI *et al.*, 1996; MOURA *et al.*, 1997) e encontra-se em todos os tecidos humanos, principalmente renal, cardíaco, esquelético, hepático (MOURA *et al.*, 1997), pancreático, ósseo e mucosa do intestino delgado (MILNE & DOXEY, 1987). O aumento de sua atividade, portanto, não é específico e ocorre em enfermidades hepáticas e renais, após infarto do miocárdio, nas miocardites, na distrofia muscular, nas anemias perniciosas e hemolíticas e em carcinomas. A maior parte da LDH sérica é originária dos eritrócitos e das plaquetas. (MOURA *et al.*, 1997). Em artiodáctilos a LDH sérica encontra-se aumentada na síndrome denominada miopatia de captura (MC), observada em animais capturados com armadilhas e durante imobilizações. A MC pode manifestar-se como choque de captura, ataxia mioglobínúrica, ruptura muscular e síndrome peraguda tardia. Nestas síndromes ocorrem alterações na musculatura esquelética chegando à necrose muscular. Conseqüentemente há liberação de enzimas das fibras musculares cujos valores séricos encontrar-se-ão elevados (SPRAKER, 1993). Em animais nestas condições, a morte é iminente.

A patogênese da MC é um processo dinâmico e complexo, envolvendo percepção do medo, sistema nervoso simpático-adrenal e atividade muscular. A musculatura é simultaneamente ativada na resposta de medo. O temor de perseguição e captura é percebido através dos sentidos do animal e integrado no tálamo, resultando em ativação do córtex motor. Neurônios motores da medula espinhal são estimulados, causando liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares. Ocorre também ingurgitamento celular, que interrompe a função da célula e permite difusão, para o sangue, de componentes intracelulares como potássio, CPK (creatina fostoquinase), AST (aspartato aminotransferase) e LDH, evoluindo para morte celular. As causas primárias de óbito nestes animais incluem azotemia, acidose e insuficiência renal (SPRAKER, 1993). Para GODDARD *et al.* (1997) estas enzimas, e em especial a LDH, são índices de estresse muscular em uma grande variedade de espécies. Segundo ZHAN *et al.* (1997) o estresse de captura e contenção ou de cativeiro pode alterar alguns parâmetros bioquímicos em animais selvagens, e HINES *et al.* (1996) afirmam que exercícios físicos elevam a concentração plasmática de cortisol e de catecolaminas, cuja magnitude tem sido influenciada pela intensidade e pela duração do exercício.

A elevação sérica da LDH, em decorrência de estresse, não é exclusividade de aves e mamíferos. Uma pesquisa com tilápias (*Oreochromis mossambicus*), feita por VIJAYAN *et al.* (1997), mostrou que a atividade da LDH eleva-se significativamente 24 horas após o confinamento desses animais em tanques pequenos, sugerindo que a capacidade hepática de utilização do lactato pode estar aumentada em peixes estressados.

O estabelecimento dos níveis séricos normais de parâmetros que sejam indicadores de estresse em animais selvagens, como a LDH e o hormônio cortisol, é de capital importância para a identificação de exemplares potencialmente estressáveis, o que torna possível aos profissionais que atuam junto a eles a prevenção ou a minimização de situações estressantes ao manipulá-los.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas 28 cutias-amarelas (*Dasyprocta azarae*), sendo cinco provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (grupo 1) e as demais do Criadouro Científico de Animais Selvagens do Museu de História Natural Capão da Imbuia (grupo 2), ambos órgãos pertencentes à Prefeitura Municipal de Curitiba.

O criadouro é constituído de 10 recintos com cerca de 20 metros quadrados, sendo 10 metros quadrados a área mínima recomendada para a criação de um casal (DEUTSCH & PUGLIA, 1988). Em cada recinto encontram-se manilhas medindo 25 centímetros de diâmetro por 1,5 metros de comprimento que são utilizadas pelos animais como local de proteção, fuga ou como ninho, uma vez que no seu centro há palha, folhas ou capim seco, além de galhos e troncos de árvores.

O criadouro, diferentemente do Zoológico Municipal de Curitiba, não é aberto à visitação pública. As cutias têm contato unicamente com os funcionários responsáveis pela alimentação e com os profissionais envolvidos em projetos de pesquisa. Desta forma, são, teoricamente, animais que estão em uma condição de vida muito semelhante àquela encontrada na natureza, conseguindo, inclusive, reproduzirem-se em cativeiro, indicando uma boa ambientação ao criadouro.

O recinto das cutias do Zoológico Municipal de Curitiba mede 25x30 metros e abriga um plantel de, em média, sete animais. Aqui há algumas manilhas, troncos de árvores e arbustos. À noite as cutias são recolhidas a grandes caixas fechadas localizadas junto ao recinto, cujo acesso se dá por uma pequena porta na altura do solo. Estas caixas são forradas com folhas e capim secos.

Os alimentos propiciados para os animais de ambos os locais foram os mesmos durante o período experimental, constituindo-se de frutas frescas e de ração comercial para roedores. O manejo alimentar, no entanto, foi diferente. Enquanto os animais do Zoológico Municipal de Curitiba foram alimentados uma única vez ao dia, os do Museu de História Natural receberam a ração pela manhã e as frutas no período vespertino.

Na véspera dos dias de experimento, as cutias foram capturadas em seus recintos com o auxílio de um longo puçá colocado em uma das extremidades

das manilhas, de onde os animais foram afugentados até adentrarem o puçá. Em seguida foram transferidas para caixas individuais construídas de madeira laminada, com 30 cm de altura, 30 cm de largura e 50 cm de comprimento, onde permaneceram de 14 a 16 horas até o início da experimentação. Neste intervalo de tempo os animais não receberam qualquer alimento ou água, a fim de se evitar complicações no procedimento anestésico.

As cutias foram retiradas das caixas de isolamento com auxílio de um puçá colocado na saída da mesma, levantando-se a porta (tipo guilhotina) lentamente, evitando-se, assim, a sua fuga. Foram pesadas, ainda no puçá, para o cálculo das doses dos fármacos usados na contenção farmacológica, descontando-se posteriormente o desse. Utilizou-se a associação de cloridrato de xilazina (2%)¹, cloridrato de cetamina (10%)² e sulfato de atropina (0,05%)³, cujas doses foram calculadas com base na extrapolação alométrica interespecífica, partindo-se de doses já descritas na literatura para o cão doméstico (*Canis familiaris*) com 10 kg de peso vivo, uma vez que nesta espécie as doses das drogas utilizadas já foram abundantemente pesquisadas. As doses para as cutias, segundo o peso, estão descritas, em mg/kg, no Quadro 1

¹ Rompun, Bayer S.A. Saúde Animal (Porto Alegre - RS)

² Francotar, Virbac do Brasil Ltda (São Paulo - SP)

³ Sulfato de Atropina 0,5 mg, Geyer S.A. (Porto Alegre - RS)

Quadro 1. Doses de cloridrato de cetamina, cloridrato de xilazina e sulfato de atropina, calculadas por meio de extrapolação alométrica interespecífica a partir de doses para o cão doméstico, a serem administradas a exemplares de *D. azarae*.

Peso (kg)	N.º de animais por peso	Cloridrato de cetamina (mg/kg)	Cloridrato de xilazina (mg/kg)	Sulfato de atropina (mg/kg)
1.5	1	32,137	3,214	0,080
1.6	1	31,623	3,162	0,079
1.7	1	31,147	3,115	0,078
1.75	2	30,922	3,092	0,077
1.85	1	30,496	3,050	0,076
2.3	1	28,880	2,888	0,072
2.45	1	28,427	2,843	0,071
2.5	1	28,284	2,828	0,071
2.55	2	28,145	2,814	0,070
2.6	1	28,008	2,801	0,070
3.0	5	27,024	2,702	0,068
3.05	1	26,913	2,691	0,067
3.15	1	26,696	2,670	0,067
3.2	1	26,591	2,659	0,066
3.3	1	26,388	2,639	0,066
3.4	2	26,191	2,619	0,065
3.45	1	26,096	2,610	0,065
3.55	3	25,910	2,591	0,065
3.8	1	25,473	2,547	0,064

A associação anestésica foi administrada por via intramuscular profunda por meio de seringas de 3 ml acopladas a agulhas 25x7 (22G1) que transfixaram o puçá até atingir o membro pélvico direito do animal. A partir do momento em que os animais mostraram-se passíveis de manipulação devido ao relaxamento muscular por perda de respostas reflexas, o que ocorreu geralmente até o 4.º minuto após a administração dos fármacos, foram retirados do puçá e, então, colocados sobre uma mesa.

Para obtenção das amostras de sangue utilizou-se punção nas veias pudendas externas com agulhas 20x5,5 (24G ¾) e seringas de 3 ml para a colheita,

uma vez que os vasos mais comumente utilizados em outras espécies para colheita de sangue ou para a administração de drogas, como as veias cefálicas, safenas e jugulares, não são acessíveis em cutias. Após a colheita, o sangue foi transferido para tubos de ensaio sem anticoagulante, para a obtenção de soro. A venopunção foi realizada no vigésimo minuto de anestesia, quando os animais se apresentaram sedados e sem reação ao contato humano. Este procedimento realizou-se sempre no período compreendido entre 08:00 e 16:30 horas.

O volume de sangue conseguido foi em torno de 1,5 a 2 ml, o que resultou em 0,5 a 0,8 ml de soro após a centrifugação, sendo que alguns soros apresentaram-se hemolisados. O pequeno volume obtido limitou o número de análises *in vitro*, excluindo alguns ensaios inicialmente planejados. Após a manipulação das veias pudendas externas houve, invariavelmente, a formação de hematoma, mesmo com a utilização de agulha pouco calibrosa. Esta coleção sangüínea localizada impossibilitou que venopunções seqüenciais fossem realizadas, assim houve uma única colheita de sangue de cada animal.

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

A fim de se evitar falsos resultados, as amostras de soro foram separadas quanto ao grau de hemólise seguindo um critério subjetivo de avaliação da coloração do soro, estabelecendo-se três níveis: leve hemólise (LM), severa hemólise (SH) e ausência de hemólise (AH). Em seguida, os soros foram submetidos à espectrofotometria (540 nm), e as médias das absorbâncias obtidas em cada nível de hemólise foram comparadas pelo Teste "t" de Student ($p < 0,05$).

Ao final das colheitas do dia o material foi levado ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, e centrifugado⁴ (3000 rpm durante 5 minutos) para a separação do soro. Este foi armazenado em tubos de ensaio menores. Imediatamente após, dosou-se a LDH com kit comercial⁵ para uso humano, pois após três dias à temperatura ambiente a LDH diminui em 2% sua atividade, e em 8% quando mantida sob temperatura de 4°C (MOURA *et al.*, 1997). SAEED *et al.* (1995) relataram que esta enzima reduziu sua atividade em 67% e 81% após nove dias sob refrigeração ou congelamento (-23

⁴ Centrífuga Fanem Ltda - Mod. 208N

a -25°C), respectivamente. Devido à pequena quantidade de soro obtida a LDH não foi mensurada em todas as amostras, pois o volume de soro necessário para tal análise é maior do que o exigido para a dosagem de cortisol, optando-se pela dosagem deste ao invés da enzima em alguns casos.

A LDH foi determinada em mistura de reagentes contendo lactato como substrato, NAD, fenazina metosulfato (FMS), alúmen férrico e 1,10-fenantrolina. A intensidade da cor do complexo que se formou ao final da seqüência de reações foi mensurada em espectrofotômetro⁶ a 510 nm. Para o cálculo da LDH das amostras, determinou-se o fator F_{LDH} obtido a partir de três tubos-padrão (P) do kit, onde:

$$F_{LDH} = \frac{350}{\text{absorbância}}$$

Obteve-se, então, o valor de LDH em Unidades Internacionais (U.I.) multiplicando-se F_{LDH} pela absorbância da amostra.

Uma alíquota de cada soro foi congelada a -20°C, temperatura recomendada por CARLSTEAD *et al.* (1993), JANSSENS *et al.* (1995) e GODDARD *et al.* (1997) para que não ocorresse alteração do cortisol, até que todas as colheitas fossem realizadas. Ao findar os procedimentos de colheita de sangue e obtenção de soro, todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde se dosou o hormônio cortisol por meio de kit⁷ de radioimunoensaio (RIA) de fase sólida para uso humano, o mesmo utilizado por CARLSTEAD *et al.* (1993), HANLON *et al.* (1995) e GODDARD *et al.* (1997). A leitura do ensaio foi efetuada em um contador de raios gama⁸, necessário para a dosagem de hormônios marcados com material radioativo.

O RIA de fase sólida tem como princípio a interação específica antígeno-anticorpo. A amostra (antígeno não marcado) é incubada na presença de anticorpos específicos fixados em uma fase sólida e de uma quantidade definida de antígeno marcado com isótopo radioativo, que para o cortisol é o iodo 125 (¹²⁵I).

⁵ Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório Ltda - lote A 6121 (Goiânia - GO)

⁶ Metrolab 330 (Bernal Oeste - Argentina)

⁷ Coat-a-Count - DPC - lote TK CO2 718 (Los Angeles - CA)

⁸ ICN - IsomedicTM

Assim, a superfície interna dos tubos de polipropileno, que é a própria fase sólida, é recoberta por anticorpos com capacidade para fixar uma grande quantidade de antígenos em um curto intervalo de tempo, sejam eles marcados ou não.

Pelo princípio dos testes imunoenzimáticos, ambos os antígenos travam uma competição para ligarem-se aos anticorpos presentes na parede interna dos tubos, seguindo a Lei de Ação das Massas. O resultado obtido é uma curva de calibração inversamente proporcional quando os valores são registrados em um gráfico contendo a unidade ($\mu\text{g/ml}$), na ordenada, e a relação entre hormônio ligado (B) e hormônio não ligado (B_0), na abcissa (MIRA, 1998).

A metodologia utilizada seguiu as instruções de uso do kit, adicionando-se aos tubos de polipropileno o cortisol marcado com ^{125}I e as amostras contendo valores desconhecidos de cortisol. Após a incubação, a 37°C , por 45 minutos, quando a reação atingiu o equilíbrio, decantou-se o material contido nos frascos e apenas a radioatividade remanescente nos tubos foi medida no contador de raios gama. O limite mínimo de detecção do ensaio, definido como uma aparente concentração de 95% B/B_0 , é $0,2 \mu\text{g/dl}$, demonstrando a alta sensibilidade do método. Os anticorpos do ensaio são altamente específicos para o cortisol, com baixa reatividade cruzada com outros esteróides naturais ou drogas terapêuticas que possam estar presentes nas amostras dos pacientes. Para os esteróides de ocorrência natural, a reatividade não ultrapassa 0,98%.

Cada amostra foi dosada em duplicata para conferir maior segurança ao ensaio, seguindo as orientações de THOMPSON *et al.* (1988) e PETERSON *et al.* (1993). Os resultados foram aceitos quando o coeficiente de variação entre os valores obtidos do mesmo soro não ultrapassou 10%. O ensaio foi repetido quando, eventualmente, a variação excedeu este limite.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita através do programa *Statistica for Windows*, versão 4.2 (Statsoft, 1993) comparando-se os dados obtidos dos animais provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (grupo 1) e do Museu de História Natural (grupo 2). Avaliaram-se também valores séricos de cortisol e de LDH entre

sexos, idades e horas de colheita de sangue, uma vez que, sabidamente, o cortisol apresenta ritmo circadiano em algumas espécies. Os animais foram então divididos em subgrupos para tais análises, segundo o Quadro 2.

Quadro 2: Distribuição dos animais de experimentação em subgrupos para análise estatística.

Variável	Procedência		Sexo		Idade		Hora de Colheita		
	ZMC	MHN	M	F	2 - 8 m	>9m	08:00-10:30 (A)	10:31-13:30 (B)	13:31-16:30 (C)
n	5	23	18	9	10	17	6	9	13

ZMC = Zoológico Municipal de Curitiba; MHN = Museu de História Natural; M = machos; F = fêmeas; m = meses; n = número de animais.

Para subdividir os animais em adultos e jovens, utilizou-se como parâmetro o seu peso. Segundo LANGE (1998), o peso de adulto é atingido aos 8 meses, quando as cutias estão com aproximadamente 2.600 g. É nesta idade, portanto, que devem iniciar sua atividade sexual.

As médias de cada subgrupo, com seus respectivos desvios padrão, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e quando necessário fez-se o Teste de Tukey, considerando 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Estes mesmos testes estatísticos foram usados por COOPER *et al.* (1995), JOHNSTON & MATHER (1979), JANSSENS *et al.* (1995) e SAEED *et al.* (1995) em experimentos semelhantes ao presente.

Para verificar a eficácia do ensaio *in vitro* do cortisol, além do controle padronizado e recomendado pelo fabricante ao qual o kit foi submetido, realizou-se outro teste para avaliar a acurácia deste material de uso humano quando aplicado a outra espécie. Foram usadas três amostras de soro de cutia, escolhidas aleatoriamente, cujo valor de cortisol foi previamente dosado. Diluiu-se cada soro com água destilada nas proporções 1:2, 1:4 e 1:8, de modo que os valores teóricos esperados e os valores obtidos pudessem ser registrados em gráficos para análise de similaridade entre eles.

4. RESULTADOS

4.1 PROTOCOLO DE ANESTESIA

Todos os animais responderam satisfatoriamente ao protocolo de anestesia utilizado. Dentro de um a três minutos após a administração da associação anestésica todas as cutias perderam a reação postural de endiretamento, deixando-se manipular após, aproximadamente, quatro minutos. A anestesia teve duração total de 70 a 120 minutos e os animais foram clinicamente monitorizados até a recuperação da ambulação. A partir de então foram transferidos a caixas de contenção para posteriormente serem relocados em seus recintos.

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Espectrofotometria das Amostras de Soro

Compararam-se as médias dos três níveis de hemólise, com seus respectivos desvio padrão e, estatisticamente, eles não se mostraram diferentes (Tabela 1). A partir desta análise passou-se a considerar todos os dados de LDH como válidos e homogêneos, desconsiderando que a hemólise afetaria seus valores.

Tab. 1. Valores de "p" e "t" obtidos pelo Teste "t" de Student para a absorvância de amostras de soro de cutia (*D. azarae*) separadas pelo grau de hemólise.

Níveis de Hemólise	p	t
ABLH x ABSH	0,967	0,041
ABLH x ABAH	0,057	2,14
ABSH x ABAH	0,334	1,06

ABLH = absorvância de soros com leve hemólise, ABSH = absorvância de soros com severa hemólise; ABAH = absorvância de soros com ausência de hemólise

4.2.2 Níveis Séricos de LDH

Ao serem analisados os valores de LDH dos animais provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba e do Museu de História Natural nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada (Fig. 3).

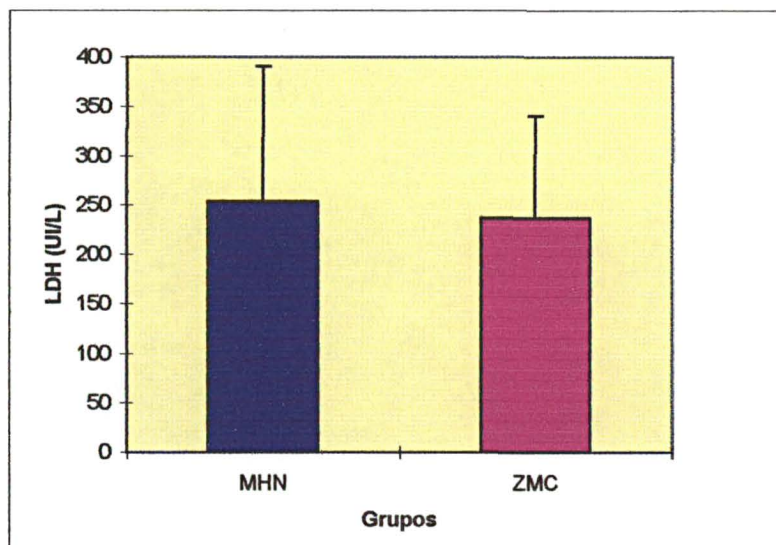


Fig. 3. Valores médios de LDH sérica, em U.I./l, encontrados em cutias (*D. azarae*) provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (ZMC) e do Museu de História Natural (MHN). (ANOVA).

Os valores séricos de LDH apresentaram pequena variação ao longo do dia, porém estatisticamente não significativa, como mostra a Figura 4.

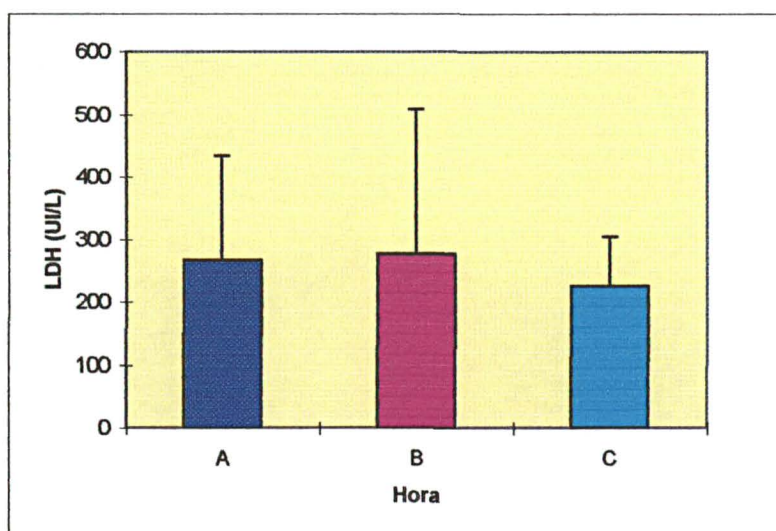


Fig. 4. Valores médios de LDH sérica, em U.I./l, encontrados em cutias (*D. azarae*), em diferentes horários de colheita de sangue, sendo: A = 08:00 - 10:30 h; B = 10:31 - 13:30 h; C = 13:31 - 16:30 h. (ANOVA).

Resultado similar às duas primeiras análises (Figs. 3 e 4) foi encontrado ao se comparar os valores séricos de LDH entre sexos, idades e quando

estas duas variáveis foram cruzadas. Embora os machos tenham apresentado valores séricos tendenciosamente mais elevados do que os das fêmeas, não houve diferença estatisticamente importante (Fig. 5).

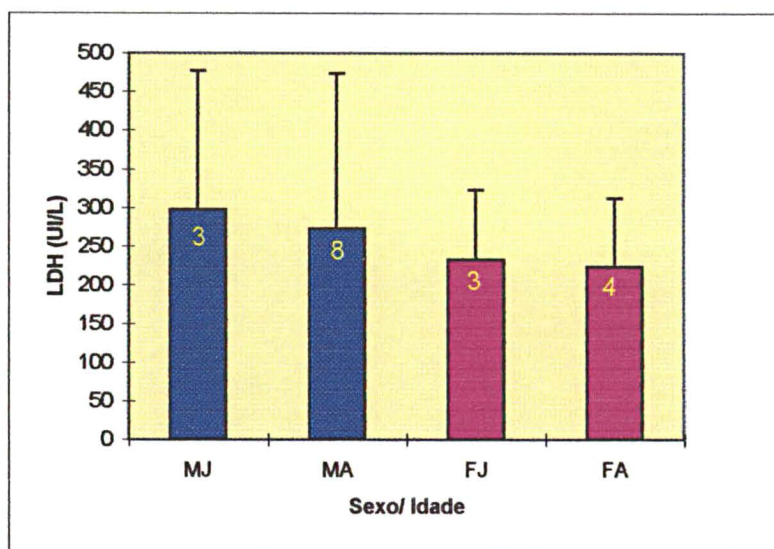


Fig. 5. Valores médios de LDH sérica, em U.I./l, encontrados em cutias (*D. azarae*) jovens e adultas de ambos os sexos. Os números sobre as barras representam o número de animais em cada grupo, aonde MJ = macho jovem, MA = macho adulto, FJ = fêmea jovem e FA = fêmea adulta. (ANOVA).

A média geral encontrada para os níveis séricos de LDH, considerando que não houve disparidade entre os subgrupos, portanto que todos os dados constituíram um grupo homogêneo, foi de $259 \pm 153,54$ U.I./l. Os valores estatísticos para todas as variáveis da enzima LDH encontram-se na Tabela 2.

Tab. 2. Valores de ANOVA para os níveis séricos de LDH de soro de cutia (*D. azarae*).

Variável	Grau de Liberdade do Efeito	Grau de Liberdade do Erro	F	p
Procedência	1	18	0,470	0,830
Hora	2	17	0,231	0,790
Sexo	1	17	0,804	0,382
Idade	1	17	0,031	0,861
Sexo e Idade	1	14	0,009	0,925

4.2.3 Eficácia do Ensaio de Cortisol

As três amostras utilizadas, cada uma com três diluições, apresentaram resultados muito próximos daqueles esperados, satisfazendo a dúvida da eficácia do kit humano para mensuração do cortisol em uma espécie tão distinta (Fig. 6).

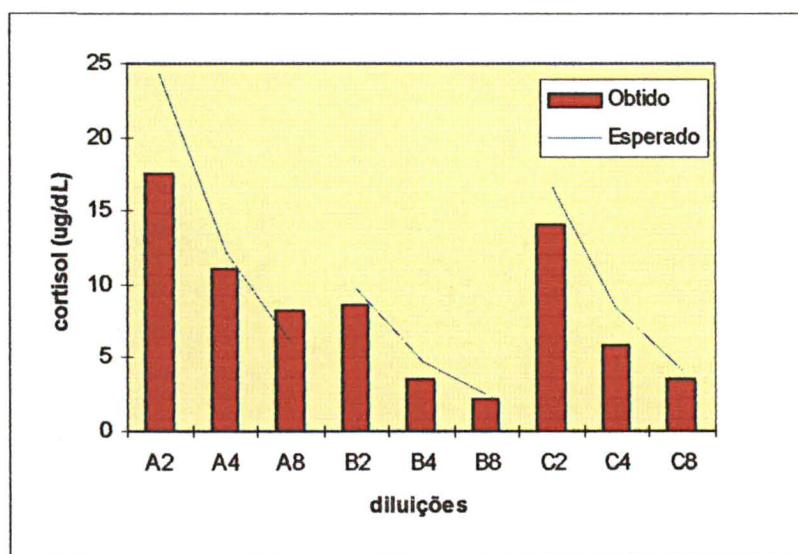


Fig. 6. Mensuração de cortisol, em $\mu\text{g/dl}$, em três amostras diluídas de soro de cutia (*D. azarae*) para verificar a eficácia do ensaio com a utilização de kit humano. A, B e C representam cada uma das amostras e 2, 4 e 8 as diluições 1:2, 1:4 e 1:8, respectivamente.

4.2.4 Níveis Séricos de Cortisol

Os níveis séricos médios de cortisol de cutias provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba, embora mais elevados, não diferiram significativamente do valor encontrado para o cortisol de cutias do Museu de História Natural (Fig. 7).

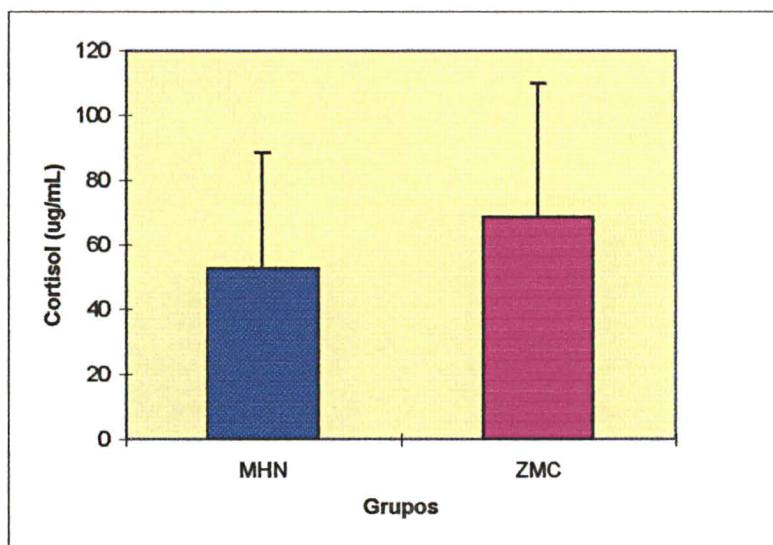


Fig. 7. Valores médios de cortisol sérico, em $\mu\text{g/dl}$, encontrados em cutias (*D. azarae*) provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba (ZMC) e do Museu de História Natural (MHN). (ANOVA).

Os níveis séricos de cortisol de cutias cujo sangue foi colhido no primeiro horário (subgrupo A) apresentaram-se um pouco mais elevados do que os níveis dos demais horários, porém não houve diferença estatisticamente significativa (Fig. 8).

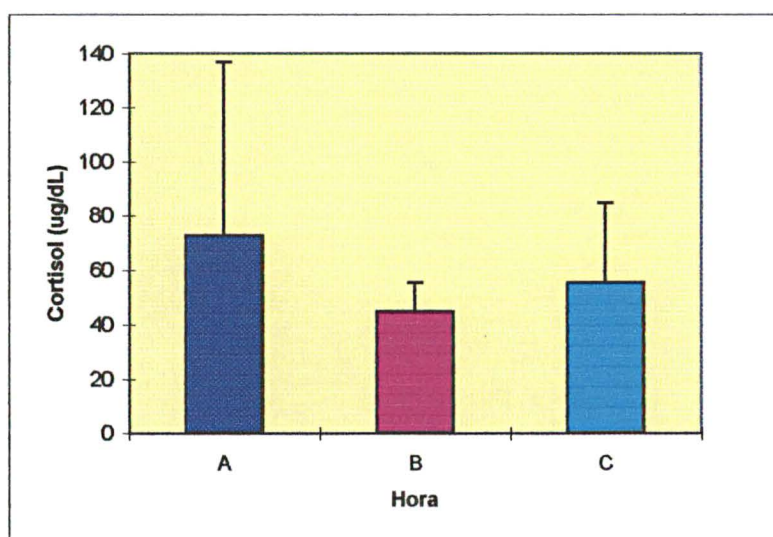


Fig. 8. Valores médios de cortisol sérico, em $\mu\text{g/dl}$, encontrados em cutias (*D. azarae*), em diferentes horários de colheita de sangue, sendo: A = 08:00 - 10:30 h; B = 10:31 - 13:30 h; C = 13:31 - 16:30 h. (ANOVA).

A análise de variância mostrou haver diferença significativa entre os valores médios de cortisol de machos e fêmeas, que foram, respectivamente, $45,11 \pm 13,35 \mu\text{g/dl}$ e $82,25 \pm 58,14 \mu\text{g/dl}$. Para esclarecer esta diferença observada entre os sexos aplicou-se o Teste de Tukey ($p < 0,05$) sobre as variáveis sexo e idade conjuntamente. Esta análise identificou que a diferença existiu predominantemente entre machos adultos e fêmeas jovens, como apresentado na Figura 9.

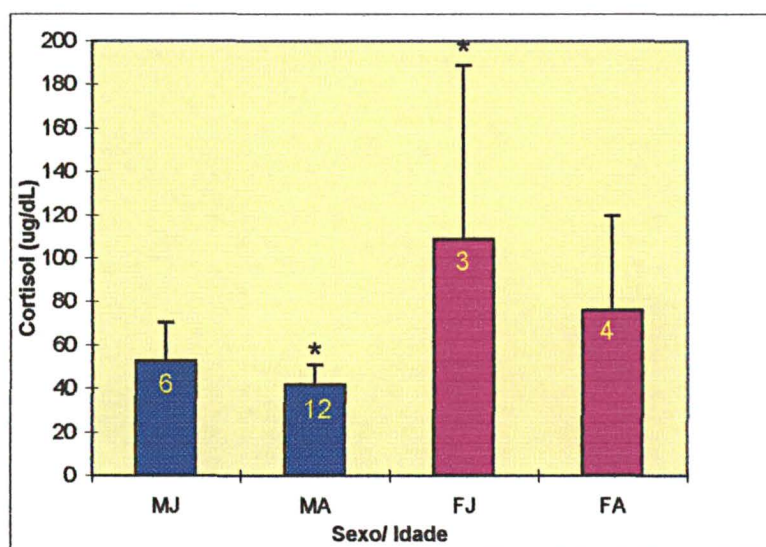


Fig. 9. Valores médios de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) para as variáveis sexo e idade. Os números sobre as barras representam o número de animais em cada grupo, aonde MJ = macho jovem, MA = macho adulto, FJ = fêmea jovem e FA = fêmea adulta. (ANOVA; Teste de Tukey; $*p < 0,05$).

Excluiu-se dos testes estatísticos o valor de cortisol relativo a uma fêmea de nove meses de idade em estado gestacional avançado, em razão do valor encontrado ser muito superior aos demais ($201,48 \mu\text{g/dl}$). Se este dado fosse incluído nas análises não alteraria os resultados estatísticos. Entretanto, optou-se por excluí-lo, uma vez que durante a gestação os hormônios esteróides têm seus níveis elevados.

Os dados estatísticos encontrados nos testes procedentes de todas as variáveis analisadas para o cortisol são mostrados na Tabela 3.

Tab. 3. Valores de ANOVA para os níveis séricos de cortisol de soro de cutia (*D. azarae*).

Variável	Grau de Liberdade do Efeito	Grau de Liberdade do Erro	F	p
Procedência	1	25	0,750	0,394
Hora	2	24	1,173	0,326
Sexo	1	25	4,951	0,039*
Idade	1	24	1,280	0,268
Sexo e Idade	1	22	0,002	0,962

*p<0,05

5. DISCUSSÃO

A fauna silvestre constitui grande desafio para os médicos veterinários com relação ao seu manuseio para procedimentos de pesquisa e de clínica (DINIZ, 1996). A restrição química em animais exóticos pode ser necessária para avaliações diagnósticas, especialmente procedimentos como radiografias e colheitas de sangue (HUERKAMP, 1995).

A extrapolação alométrica é um método de cálculo de doses de fármacos que leva em conta as taxas metabólicas de vertebrados e seus pesos, o que permite extrapolar matematicamente para um animal (selvagem, por exemplo) doses de medicamentos indicados para outra espécie (animal doméstico ou ser humano) (José Ricardo Pachaly, comunicação pessoal, 1998). Este método foi empregado com sucesso por PACHALY & BRITO (1995) para a contenção farmacológica de cutias, usando a associação de cloridrato de cetamina, cloridrato de detomidina e sulfato de atropina, cujas doses foram extrapoladas utilizando como modelo um equino com 500 kg de peso vivo.

A associação de cloridrato de xilazina, cloridrato de cetamina e sulfato de atropina mostrou-se satisfatória e segura para o procedimento pretendido, a colheita de sangue, pois não houve incidentes com os animais em experimentação. Efeitos adversos foram observados por PACHALY *et al.* (1997a, b) em cutias anestesiadas com o neuroléptico azaperone, isolado ou em combinação com cloridrato de xilazina. Em ambos os protocolos os animais não atingiram sequer a tranquilização, apresentando hiperexcitação e hiperestesia. Tal droga, isolada ou associada, é contra-indicada para esta espécie.

A cetamina induz a um efeito chamado de "anestesia dissociativa", na qual há diminuição da sensibilidade e analgesia, bem como paralisia de movimentos sem perda de consciência (RANG *et al.*, 1995). O termo deriva do relato de pessoas que receberam esta droga, e que experimentaram a sensação de manterem-se despertas, porém dissociadas do ambiente (BLOOM, 1996; HARVEY & CHAMPE, 1998). A sensação de dissociação e o estado de inconsciência são atingidos dentro de 15 e de 30 segundos, respectivamente (BLOOM, 1996). A cetamina induz anestesia e amnésia por ruptura funcional do sistema nervoso central (SNC) mediante estímulo acentuado deste sistema, ou induz um estado cataléptico. É um inibidor relativamente potente da

ligação do GABA no SNC (BOOTH, 1992), mas acredita-se que deva também produzir inibição do receptor NMDA, ativado por aminoácidos excitatórios (RANG *et al.*, 1995).

Um efeito farmacológico importante do cloridrato de cetamina é aquele sobre a ventilação pulmonar, já que este agente anestésico, diferente de muitos outros, não deprime a resposta ventilatória em doses anestésicas efetivas (BOOTH, 1992; RANG *et al.*, 1995; BLOOM, 1996). Também aumenta o tônus simpático central, o que acarreta estímulo cardíaco e aumento da pressão arterial (HARVEY & CHAMPE, 1998). O tônus muscular também pode estar aumentado (BLOOM, 1996), gerando catalepsia, provavelmente por deficiência na função da dopamina ou por um desequilíbrio na função colinérgico-dopaminérgica (BOOTH, 1992). Para evitar este efeito indesejado comumente associa-se o cloridrato de cetamina ao cloridrato de xilazina, um agonista α_2 -adrenérgico que produz relaxamento da musculatura esquelética por inibição da transmissão intraneural no SNC (BOOTH, 1992; DINIZ, 1996). Este fármaco tornou-se o medicamento de eleição em medicina de animais selvagens pela facilidade de administração via intramuscular e por permitir o uso associado com outros agentes, além de ter boa ação em várias espécies de herbívoros, como camelos, dromedários, cervos, girafas, antílopes, zebras (DINIZ, 1996) e em grande número de roedores (HUERKAMP, 1995).

A utilização de sulfato de atropina, um agente anticolinérgico obtido da planta *Atropa belladonna*, é recomendada para inibir a salivação exacerbada e o aumento das secreções das glândulas mucosas traqueobronquiais provocados pela cetamina, bem como para poupar os pacientes dos distúrbios hemodinâmicos produzidos pela xilazina (BOOTH, 1992; WILSON *et al.*, 1997). As ações da atropina são devidas ao bloqueio de todas as respostas muscarínicas da acetilcolina, tanto excitatórias quanto inibitórias. Devido a um efeito vagolítico as secreções salivares, sudoríparas, faríngeas e bronquiais são inibidas (WILSON *et al.*, 1997). De fato, não houve aumento de secreção durante o tempo de anestesia a que foram submetidos os animais em experimento.

Os resultados aqui obtidos diferem daqueles reportados por WIXSON *et al.* (1987). Estes autores compararam efeitos provocados pelo pentobarbital e pelas associações fentanil/droperidol e xilazina/cetamina em ratos adultos, tendo registrado maior mortalidade nesta última associação. No entanto, como a profundidade

anestésica alcançada foi maior, indicaram-na para procedimentos que exijam excessiva manipulação em roedores.

MORTON *et al.* (1995) reportaram valores menores de cortisol em várias espécies selvagens contidas quimicamente, enquanto o uso de contenção física elevou seu nível. Há relatos demonstrando que em algumas espécies a utilização de drogas anestésicas, em conjunto ou isoladamente, pode alterar os níveis séricos de cortisol (THOMPSON *et al.*, 1988; CARROL *et al.*, 1997). Segundo CARROL *et al.* (1997), o efeito da anestesia geral sobre o cortisol parece ser dependente do tipo de anestesia (injetável ou inalatória), da duração e combinação de drogas usadas na pré-medicação e da indução antes da anestesia inalatória. Estes autores afirmam ainda que a concentração de cortisol diminui quando a manutenção anestésica é feita por via injetável em comparação com a via inalatória. Para PACHALY *et al.* (1993), no entanto, apesar das alterações biológicas provocadas pela contenção, o sucesso das atividades na medicina de animais selvagens depende dos métodos de abordagem dos pacientes e da contenção, necessários tanto em procedimentos médicos como de manejo para minimizar riscos de acidentes.

No estudo feito por GANHAO *et al.* (1989), que utilizaram etorfina/xilazina ou xilazina/cetamina em impalas (*Aepyceros melampus*), búfalos africanos (*Syncerus caffer*), gnus (*Connochaetes taurinus*), kudus (*Strepsiceros strepsiceros*), leões (*Panthera lion*) e zebras (*Equus burchelli*), não houve alteração nos valores séricos de cortisol até o 15.º minuto de anestesia, exceto em zebras, indicando que esta combinação de drogas não anestesia ou tranqüiliza igualmente todas as espécies, podendo resultar em diferentes respostas fisiológicas. TAYLOR (*apud* CARROL *et al.*, 1997) demonstrou que a associação xilazina/cetamina como indutora anestésica em pôneis, cuja manutenção anestésica foi feita com halotano ou isoflurano, retardou a elevação dos níveis séricos de cortisol até o 80.º minuto de anestesia. THOMPSON *et al.* (1988) observaram, em éguas, que a administração de xilazina não elevou os níveis séricos do cortisol durante as oito horas seguintes em que houve monitorização, enquanto a combinação xilazina/cetamina provocou sua elevação a partir de 90 minutos até a oitava hora.

Devido à variação hormonal sérica decorrente de procedimentos anestésicos, HELLGREN *et al.* (1985) sugerem que colheitas de sangue para análise de hormônios esteróides, particularmente para o estudo da concentração sérica de

glicocorticóides, devam ser feitas até o 15.º minuto da anestesia em catetos (*Tayassu tajacu*) imobilizados com cetamina. A escolha do tempo de colheita utilizado no presente estudo baseou-se na capacidade dos animais de deixarem-se manipular. Foi somente a partir do 20.º minuto de contenção química que as cutias possibilitaram o procedimento de venopunção.

Em histicognatas não há veias superficiais visíveis (CLARK & OLFERT, 1986), tornando a punção venosa em roedores da família Dasyproctidae bastante difícil quando se tenta utilizar os vasos usualmente empregados em espécies domésticas. As veias jugulares de tais animais têm pequeno diâmetro, enquanto as veias femorais e cefálicas sofrem colapso com extrema facilidade. As veias mais indicadas para a punção nestes animais são as pudendas externas (PACHALY *et al.*, 1997c). A sua anatomia foi descrita por FARIAS *et al.* (1997) em um exemplar de cutia do sexo masculino, cujas veias pudendas externas dispunham-se dorsolateralmente à túnica vaginal e seguiam trajetória retilínea no sentido caudocranial.

A saúde e o bem-estar de animais têm recebido maior atenção nas últimas décadas, especialmente de animais domésticos mantidos em confinamento com restrição de espaço físico, como, por exemplo, suínos (EKKEL *et al.*, 1996). O estresse assumiu importância quando se percebeu que o seu conhecimento poderia assegurar bem-estar aos animais. Como o conceito de bem-estar animal ainda está bastante vago, a mensuração clínica do estresse é necessária para determinar quando esta situação está ocorrendo e quando está causando sofrimento (MOBERG, 1987), principalmente em espécies selvagens, bastante susceptíveis ao estresse e à miopatia de captura decorrente deste.

Na literatura especializada existem algumas discordâncias a respeito da síndrome do estresse, mas já há muito tempo se estabeleceu que os níveis de corticosteróides adrenais são um dos melhores indicadores de estresse (MOBERG, 1987; BREAZILE, 1987; PACHALY *et al.*, 1993; SPRAKER, 1993; MORTON *et al.*, 1995), embora um maior número de componentes esteja envolvido na resposta orgânica a agentes estressantes, como β -endorfinas (ROOZEN *et al.*, 1995; COOPER *et al.*, 1995), colecistoquinina, neromoduladores, catecolaminas (BREAZILE, 1987) e α -MSH (WILLEMSE *et al.*, 1993).

Valores séricos de cortisol foram reportados por MORTON *et al.* (1995) em 18 espécies selvagens do Zimbabwe submetidas à captura. Excetuando-se os búfalos, as demais espécies tiveram os níveis deste corticosteróide elevados após a captura, confirmando a validade deste hormônio no diagnóstico de estresse. HANLON *et al.* (1995) também apresentaram dados relativos à elevação de cortisol em veados nobres (*Cervus elaphus*) submetidos a repetidas trocas de indivíduos entre grupos, quando comparados a um grupo controle após uma injeção de ACTH, indicando haver aumento da função adrenal sob estresse social. NWE *et al.* (1996) determinaram valores plasmáticos de cortisol na faixa de 42 ng/ml para caprinos em repouso e 166 ng/ml para caprinos submetidos a um estresse de transporte em uma jornada com duração de seis horas.

Os resultados do presente trabalho revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de cutias estudados, provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba e do Museu de História Natural, permitindo adiantar não ter havido estresse social durante o período avaliado. Se o período de estudo fosse maior e abrangesse a mudança de animais dentro dos grupos, fato que ocorre quando há relocação de algumas cutias para parques públicos desta cidade, possivelmente teriam sido obtidos dados diferentes em relação aos níveis séricos de cortisol. A visitação constante a que os cutias do Zoológico Municipal de Curitiba ficaram expostas, não parece ter sido um agente estressante considerável quando o parâmetro para avaliação do estresse foi o cortisol sérico, já que se manteve em níveis semelhantes àqueles encontrados nos animais do Museu de História Natural, que estavam isolados da visitação pública.

Antes da colheita de sangue as cutias foram colocadas em caixas por algumas horas. Esta situação poderia representar um tipo de estresse agudo, o que ocasionaria elevação do cortisol sérico. ROOZEN *et al.* (1995) encontraram valores normais de cortisol sérico para porcas em torno de 52,4 nmol/l, e três e meio minutos após o início da contenção, sua concentração se elevou para 70,2 nmol/l. Resultado similar foi observado por WILLEMSE *et al.* (1993) em gatos não sedados, dentro de cinco a 20 minutos após contenção física e concomitante realização de teste alérgico intradérmico, concluindo que a combinação de estresses emocional e físico pode contribuir para uma rápida elevação nos níveis séricos desse hormônio. Em vacas sob

estresse de contenção o valor plasmático de cortisol elevou-se de três para mais de 20 ng/ml uma hora após o início da contenção, e retornou ao normal rapidamente quando esta findou (THUN *et al.*, 1996).

Metodologia semelhante à adotada neste estudo foi utilizada por McDONALD *et al.* (1988) para mensurar glicocorticóides sanguíneos de ornitorrincos (*Ornithorhynchus anatinus*), anestesiados para a colheita de sangue 15 a 24 horas após a captura. A metodologia utilizada por SOUZA (1996), SOUZA *et al.* (1996), AMARO & SOUZA (1996) e GOLDBARG *et al.* (1996) em *D. primnolopha* para análise de alguns parâmetros bioquímicos, como proteínas séricas, uréia, creatinina, ácido úrico e lipídios, também foi semelhante à utilizada no presente trabalho, porém os animais foram submetidos a um período maior de restrição física e jejum.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de cortisol de machos e fêmeas (Fig. 9), e quando a variável idade foi correlacionada com o sexo, observou-se que esta diferença existiu apenas entre machos adultos e fêmeas jovens. Este resultado corrobora o relato de COOK *et al.* (1996), que correlaciona a dependência da concentração de cortisol e de suas globulinas ligantes, com sexo, idade e raça em suínos. Com relação à variável sexo, nossos resultados confrontam os descritos por JOHNSTON & MATHER (1978) e WILLEMSE *et al.* (1993), ambos em gatos, e por GANHAO *et al.* (1989) em impalas, zebras, kudus, leões e gnus, bem como os resultados obtidos por McLEOD *et al.* (1996) que correlacionaram valores de creatinina e cortisol urinários em lobos machos e fêmeas.

O córtex adrenal deriva do epitélio celômico mesodérmico (BENTLEY, 1982), portanto esta parte da glândula está embriologicamente associada com outras glândulas esteroideogênicas importantes, as gônadas (DUKES & SWENSON, 1978). Algumas referências bibliográficas correlacionam hormônios adrenocorticotróficos com hormônios gonadais em espécies animais, relatando que alterações no córtex adrenal ocorrem paralelamente a variações do ciclo estral em fêmeas (ZUCKERMAN, 1953). Em humanos, segundo AZZIZ *et al.* (1990), secreção exacerbada de andrógenos adrenais pode ocorrer secundariamente a deficiências enzimáticas na biossíntese do cortisol, bem como pode haver elevação de 50% no nível de dehidroepiandrosterona sulfato, um andrógeno formado primariamente pela córtex adrenal de mulheres com síndrome do ovário policístico. BENTLEY (1982) descreve que, em peixes-dourados, a concentração

de cortisol eleva-se sucedendo o aumento de gonadotrofinas, e que, embora a função de diferentes esteróides sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos e sobre a ovulação não esteja bem definida, é provável que nos peixes teleósteos o cortisol esteja envolvido.

O elevado valor para o cortisol encontrado nas cutias fêmeas jovens pode estar relacionado com o pequeno número de animais desta categoria ($n= 3$) usado na análise estatística. Pode também ter correlação com o início da atividade sexual culminando com níveis elevados de esteróides. As glândulas adrenais também produzem esteróides sexuais, principalmente na ausência das gônadas (BRADER & PUGH, 1977). Em ratas ovariectomizadas as glândulas adrenais passam a ser uma fonte espúria de estradiol e de estrona (KAYE, 1978) e, segundo THUN *et al.* (1996), o aumento da atividade do eixo HHA em vacas pode ser atribuído aos efeitos de estrógenos. Não são muito claras, entretanto, as ações destes esteróides sobre o crescimento adrenal, mas acredita-se que eles elevam a atividade da corticotrofina (LIDDLE, 1974; ESTIVARIZ *et al.*, 1992). Conseqüentemente, aumentariam a produção de cortisol e elevariam o seu nível circulante, o que explicaria os resultados obtidos em nosso estudo. SMITH & DOBSON (1990), trabalhando com veados, também encontraram valores plasmáticos de cortisol mais elevados em fêmeas do que em machos, ambos considerados estressados devido a uma longa jornada até um abatedouro.

Segundo TORPY (1997), o hipotálamo de mulheres possui maior quantidade de CRH do que o hipotálamo de homens, de modo que o dimorfismo sexual observado na resposta ao estresse em seres humanos poderia ser devido à síntese de CRH mediada por estrógenos, que aumentariam a transcrição gênica de CRH com subsequente secreção. Recentemente TRAINER *et al.* (1998) publicaram um estudo que revelou ser mais elevada a concentração circulante de proteína ligante de CRH em mulheres jovens do que em homens, o que poderia sugerir um efeito no eixo HHA estrógeno-dependente. No entanto, não houve variação em seus níveis durante a menopausa ou durante o tratamento com reposição estrogênica, sugerindo que deva haver um outro mecanismo regulatório. Para HUIZENGA *et al.* (1998) a regulação dos níveis de cortisol e a função do eixo HHA sofrem influência genética, mesmo que a hereditariedade pareça ter pouco efeito sobre a resposta adrenocortical ao estresse.

Segundo SLAYDEN *et al.* (1998) a presença de receptores para estrógenos no córtex adrenal em várias espécies animais sugere que estes hormônios sejam reguladores fisiologicamente importantes da esteroidogênese adrenal, mas em suas pesquisas a administração de estrógenos não alterou os níveis basais e pós-dexametasona de cortisol, dehidroepiandrosterona, androstenediona e 17-hidroxiprogesterona.

A maioria dos autores anteriormente citados acredita que mais pesquisas devam ser feitas para esclarecer a influência do sexo e, principalmente, dos estrógenos, na ação adrenocortical.

O maior valor individual de cortisol observado neste trabalho ocorreu em uma fêmea gestante (201,48 µg/dL). O período gestacional coincide com elevação dos níveis de transcortina e, conseqüentemente, com a elevação das concentrações plasmáticas totais de cortisol (WHITLEY *et al.*, 1994). Este efeito no eixo HHA pode ser simulado com terapia estrogênica (Di RIO *et al.*, 1994). Os roedores, em particular, apresentam uma camada de células nas glândulas adrenais chamada "zona-X" ou "de transição", capaz de produzir hormônios sexuais (VERZÁR, 1953). Este tecido regride nos machos durante a puberdade e em fêmeas durante a gestação, contrastando com fêmeas de marsupiais, cujas adrenais possuem uma camada de células justaglomerulares que sofrem hipertrofia durante os períodos de gestação e de lactação, e que também podem produzir esteróides androgênicos (BENTLEY, 1982).

Neste estudo não foi observada diferença para os valores de cortisol entre os diferentes períodos de colheitas do sangue, mesmo sendo estas realizadas durante o dia. Segundo RODRIGUEZ & VAUGHAN (1985) o período de atividade da *D. punctata* compreende das 5:30 às 20:00 horas. Em muitas espécies domésticas e selvagens a periodicidade da cortisolemia é conhecida (KIRKPATRICK *et al.*, *apud* MORTON *et al.*, 1995; MIKULECKY *et al.*, 1995). Em animais de hábitos noturnos, tem sido observado um padrão inverso nos níveis de glicocorticóides (JANSSENS *et al.*, 1995).

A cortisolemia depende, diretamente, do estímulo do ACTH, com o qual mantém retroalimentação negativa, que ocorre sob a forma de pulsos, em número de sete a 13 por dia. Destes, 50% ocorrem nas primeiras nove horas do dia, e sua magnitude sofre uma variação circadiana, responsável por níveis máximos e mínimos do hormônio em 24 horas (Di RIO *et al.*, 1994). Alterações plasmáticas do ACTH, por sua vez, ocorrem na dependência da ciclicidade do CRH (JANSSENS *et al.*, 1995).

A literatura é controversa quanto aos horários de maior e menor secreção do cortisol. Segundo Di RIO *et al.* (1994), os níveis máximos são encontrados entre 07:00 e 08:00 horas, enquanto WHITLEY *et al.* (1994) afirmam ser durante um período maior, abrangendo das 04:00 às 12:00 horas. Para estes mesmos autores a magnitude da concentração matinal de cortisol é afetada por fatores familiares e genéticos. Um estudo conduzido por MIKULECKY *et al.* (1995) em mulheres que se encontravam na fase folicular do ciclo menstrual, cujo cortisol foi monitorizado durante 24 horas consecutivas, revelou que o pico hormonal ocorreu especificamente às 10:47 horas. Modificações neste ritmo nictemeral ocorrem como resposta fisiológica adaptativa a várias formas de estresse (Di RIO *et al.*, 1994; JANSSENS *et al.*, 1995).

O ritmo circadiano de secreção do cortisol não foi detectado por JOHNSTON & MATHER (1979) em um estudo com seis gatos saudáveis, cujo sangue, para análise da cortisolemia, era colhido a cada três horas por um período de três dias. Estes mesmos autores (1978) aplicaram semelhante metodologia em cães e obtiveram idênticos resultados, isto é, ausência de secreção circadiana para o cortisol. Mesmo que não tenham sido feitas colheitas sanguíneas consecutivas nas cutias utilizadas neste trabalho, nossos resultados corroboram estes estudos, indicando que nem todas as espécies apresentam um padrão cíclico na secreção do hormônio cortisol.

A cortisolemia basal é descrita em diferentes espécies com uma grande variação de valores, tornando difícil o estabelecimento de uma correlação interespecífica. McDONALD *et al.* (1988) encontraram valores normais para o cortisol, em ornitorrincos, entre 201 e 620 nmol/l. CARROL *et al.* (1997) observaram valores basais, em pôneis, equivalentes a $5,9 \pm 0,5$ µg/ml. COOK (1996) relatou valores basais próximos de 7,0 ng/ml em ovelhas. DUNN & HARRTAGE (1998) descreveram que o cortisol sérico em cães normais varia de 20 a 250 nmol/l, enquanto que, para JOHNSTON & MATHER (1978), os valores encontrados foram $19,4 \pm 3,0$ ng/ml. COOK *et al.* (1996) reportaram valores de 67,6 a 370,5 nmol/l e 11,8 a 29,3 nmol/l para cortisol sérico e salivar de suínos, respectivamente, enquanto MANGINI *et al.* (1997) obtiveram valores próximos de 10 µg/dl em fêmeas de queixada (*Tayassu pecari*). Para gatos, o valor basal de cortisol encontrado por WILLEMSE *et al.* (1993) foi 87 ± 16 nmol/l, enquanto PETERSON *et al.* (1993) encontraram $36,7 \pm 3,5$ nmol/l. Segundo WHITLEY *et*

al. (1994), a cortisolemia, dependendo do horário, varia entre 5 e 35 $\mu\text{g/dl}$ em seres humanos.

ACCO *et al.* (1997b) determinaram cortisol sérico em dois exemplares de *D. azarae*, sendo 67 $\mu\text{g/dl}$ e 89 $\mu\text{g/dl}$ os valores encontrados para macho e fêmea, respectivamente. Estes dados corroboram os resultados do presente trabalho, onde os machos apresentaram menor concentração de cortisol sérico ($45,11 \pm 13,35 \mu\text{g/dl}$) do que as fêmeas ($82,25 \pm 58,14 \mu\text{g/dl}$).

Após a leitura de vários estudos sobre dosagem de cortisol concluiu-se que o protocolo ideal para o presente trabalho seria a obtenção de amostras seqüenciais de sangue, inclusive antes da anestesia, para se ter um parâmetro com os animais em condições fisiológicas mais próximas da normalidade. Porém, devido ao pequeno calibre das veias pudendas externas, as quais formaram hematomas perivascular após a venopunção, não foi possível sua execução, e a venopunção tornou-se única em cada animal. Além disto, seria muito difícil proceder uma colheita sangüínea sem contenção farmacológica nesta espécie.

Como citado anteriormente, o cortisol é apenas um dos indicadores de disfunções adrenocorticais e de estresse, porém não o único. Durante a miopatia de captura (MC), entidade nosológica associada ao estresse de contenção e/ou perseguição, ocorrem importantes alterações enzimáticas e eletrolíticas na dependência, principalmente, de modificações musculares sofridas. SONODA *et al.* (1996) reportaram necrose multifocal no córtex, associada à congestão medular, em glândulas adrenais de cervos do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) acometidos pela MC.

A MC, conhecida também como miopatia de estresse ou de esforço, é uma síndrome que ocorre em mamíferos e aves selvagens, cativos e de vida livre. Na natureza, a MC é provavelmente um mecanismo que acelera a morte de um animal após sua captura por um predador, reduzindo a dor da presa e conservando energia para o predador. Alterações bioquímicas séricas, como a elevação das enzimas aminotransferase (ALT), creatina fosfoquinase (CPK) e lactato desidrogenase (LDH), são observadas durante o tempo que precede a morte da presa, entre uma e 48 horas após a captura (SPRAKER, 1993). Assim, a análise destas enzimas em animais selvagens

pode auxiliar pesquisadores que necessariamente utilizam contenção farmacológica ou física para manipulá-los.

Para GALZIGNA & BURLINA (1977), a CPK é a enzima de escolha para diagnóstico de miopatia, pois seu nível sérico aumenta imediatamente após traumas musculares. Mas há outras que podem ser úteis em diagnósticos diferenciais de miopatias humanas, como a LDH, e particularmente a isoenzima LDH₅, que encontra-se em níveis mais altos na distrofia muscular e mais baixos em músculo miopático.

Os procedimentos de venopunção em animais selvagens, via de regra, são influenciados por fatores que podem implicar em resultados alterados, como a contenção e as condições físicas de trabalho. O presente estudo não fugiu à regra, com alguns implicantes como a contenção farmacológica, a anatomia do vaso utilizado para a venopunção e o local de trabalho. Ainda, o material colhido precisou ser transportado do local de procedência das cutias até o laboratório, para, finalmente, ser processado. O resultado final foi a alteração da coloração das amostras de soro devido à hemólise. Acredita-se que a hemólise ocorreu devido à fragilidade eritrocitária ou devido ao transporte ao qual as amostras foram submetidas. A hemólise não altera os valores de cortisol, porém pode elevar os valores de LDH sérica (MOURA *et al.*, 1997; PERRY *et al.*, 1997) devido à presença desta enzima nos eritrócitos, principalmente de LDH₁ e LDH₅ (BEATTY & DOXEY, 1983). No presente trabalho, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de LDH encontrados em soros límpidos e soros hemolisados. Todos os valores, portanto, foram considerados como homogêneos.

O valor médio de LDH encontrado ($259 \pm 153,54$ U.I./l) pode ser considerado um valor de referência para a *D. azarae*, uma vez que não houve diferença significativa quando as variáveis procedência, sexo, idade e hora foram analisadas. A atividade das enzimas musculares é influenciada por fatores não patológicos, como o exercício físico intenso. Esta prerrogativa sustenta ainda mais os resultados obtidos, pois a restrição de espaço a que as cutias foram submetidas horas antes da colheita de sangue permitiu maior repouso muscular. Os valores obtidos estão de acordo com aqueles aceitáveis para o homem, de 297 a 618 U.I./l (PERRY *et al.*, 1997), com o valor médio de LDH assinalado por ATROSHI *et al.* (1996) para vacas saudáveis ($365,5 \pm 74,5$ U.I./l), com os assinalados por ZHAN *et al.* (1991; 1997) em raposas (*Vulpes vulpes*)

jovens e adultas, que apresentaram níveis de 208 U.I./l e 143 U.I./l, respectivamente, bem como os níveis quantificados em cordeiros por BEATTY & DOXEY (1983). Os níveis séricos normais desta enzima em cães saudáveis são mais baixos do que os descritos em outras espécies, girando em torno de 50 a 70 U.I./l (MILNE & DOXEY, 1987).

HELLGREN *et al.* (1985), trabalhando com taiassuídeos contidos farmacologicamente com cetamina, observaram que a concentração sérica de LDH elevou-se discretamente nos primeiros 45 minutos de contenção, mas sem apresentar diferença estatística significativa. O valor basal para estes animais está em um patamar bem mais elevado quando comparado a outras espécies, inclusive com suínos domésticos. A LDH sérica encontrada por estes autores alcançou níveis de 1.204 ± 53 U.I./l, enquanto LOCHMILLER & GRANT (1984) observaram valor médio de 2.617 U.I./l. Os mesmos autores acreditam que esta elevada concentração de LDH esteja relacionada a alterações fisiológicas pelo estresse de captura, e que quando há adaptação ao estresse do manejo os valores séricos diminuem para 600 U.I./l.

No presente trabalho não se observaram diferenças nas concentrações de LDH entre sexos e idades. Estes resultados corroboram os de LOCHMILLER & GRANT (1984), que também não observaram diferenças significativas para valores médios de LDH entre exemplares de catetos machos e fêmeas e entre adultos e jovens. Também ZHAN *et al.* (1997) não encontraram diferenças para esta enzima quando compararam exemplares jovens de raposa de ambos os sexos. No entanto, quando os mesmos autores estudaram o padrão de LDH em raposas adultas observaram diferenças entre os sexos, sendo os níveis séricos nos machos mais elevados. Estes resultados, segundo os autores, podem ter sido afetados pelo pequeno tamanho da amostra em cada grupo de raposas. CASTRO *et al.* (1977) reportaram valores de LDH mais elevados em bodes do que em cabras, ambos íntegros, mas não observaram diferenças de valores entre grupos de fêmeas de várias idades, bem como entre machos castrados e íntegros e entre machos e fêmeas castrados.

GODDARD *et al.* (1997) procuraram correlacionar cortisol com LDH e suas isoenzimas como uma maneira de avaliar estresse em veados nobres (*Cervus elaphus*), uma vez que se tem sugerido que a quantificação destas pode ser útil no estudo do bem-estar destes animais, pois sua atividade poderia aumentar em resposta a um agente estressante. No seu trabalho, a atividade da LDH mostrou-se negativamente

correlacionada com a concentração plasmática de cortisol. No modelo experimental utilizado, no entanto, não havia lesão muscular ou dano em qualquer órgão, e o que está de fato estabelecido são alterações em alguns parâmetros bioquímicos no estresse de captura ou de contenção, que culminam em miopatias ou lesões tissulares. Os próprios autores concluem que outros estudos devam ser feitos para que esta correlação seja estabelecida como positiva ou negativa.

Embora no presente trabalho não se tenha conseguido estabelecer diferenças entre os grupos de cutias com procedências distintas, o que é desejável sob o ponto de vista da conservação da espécie, primou-se por quantificar valores para as variáveis analisadas a fim de se ter parâmetros para futuras pesquisas ou para situações que envolvam estresse ou lesões teciduais. Como os padrões de enzimas tissulares variam muito com as espécies, é necessário estabelecê-los para conhecer a atividade enzimática em órgãos sadios (TYÖPPÖNEN *et al.*, 1982), a fim de que, em casos de enfermidades, as enzimas possam ser utilizadas como esclarecedoras de diagnósticos.

Alguns aspectos bioquímicos, mas não enzimáticos, foram estudados na espécie *D. prymnolopha* em cativeiro (SOUZA, 1996; SOUZA *et al.*, 1996; AMARO & SOUZA, 1996; GOLDBARG *et al.*, 1996). Não há, porém, citações de estudos hormonais e enzimáticos para a espécie *D. azarae* na literatura especializada, exceto o relato preliminar de ACCO *et al.* (1997b). Não foram encontrados, portanto, parâmetros de comparação para os valores obtidos no presente estudo. Tais valores poderão ser considerados como um referencial para a *D. azarae*, principalmente quando exemplares forem submetidos à contenção química e/ou restrição física para procedimentos médicos, biológicos ou de manejo. Em tais situações, o conhecimento de indicadores de estresse ou de miopatia, como o cortisol e a LDH, é de grande interesse para que os manipuladores possam avaliar a que nível de estresse estão sendo submetidos os animais, e também para a identificação e caracterização de distúrbios adrenocorticais.

O estresse associado à colheita de sangue pode interferir com processos fisiológicos (MOE & BAKKEN, 1996) e mascarar efeitos de outros agentes estressantes que estejam sob investigação (MOE & BAKKEN, 1997). É possível que os valores encontrados no presente trabalho, para o cortisol, estejam mais elevados do que o "normal" devido à contenção utilizada para a obtenção do sangue. Devemos considerar, entretanto, que a maioria dos procedimentos realizados em cutias necessitam de

contenção, tornando qualquer manuseio uma situação capaz de alterar a homeostase destes animais, de modo que será muito difícil conseguir estabelecer um procedimento de colheita sangüínea sem torná-lo um momento desconfortante para os mesmos. Além disto, o método de contenção deve permitir plena segurança para o paciente e para a equipe envolvida, bem como permitir a realização adequada do procedimento pretendido (PACHALY, 1997). A obtenção do sangue para a análise, neste estudo, seguiu um protocolo que possivelmente será repetido por pesquisadores que necessitem manipular esta espécie de cutia. Certamente, para tais situações, o conhecimento de parâmetros indicadores de estresse é fundamental.

Face ao prognóstico desfavorável e à ineficácia dos tratamentos disponíveis, a prevenção é a única medida aconselhável para o controle do estresse e da miopatia de captura (SONODA *et al.*, 1996), fato que evidencia ainda mais a necessidade da definição de seus mediadores e indicadores em espécies animais selvagens.

6. CONCLUSÕES

- A contenção farmacológica realizada com a associação de cloridrato de cetamina, cloridrato de xilazina e sulfato de atropina mostrou-se satisfatória para procedimentos de venopunção em cutias. Invariavelmente, todos os animais perderam a reação postural de endireitamento dentro de até quatro minutos, e o tempo de duração da contenção variou de 70 a 120 minutos. A recuperação foi tranqüila, sem incidentes ou reações inesperadas nos animais usados no experimento.
- Os níveis séricos de lactato desidrogenase não diferiram quando as variáveis procedência, sexo, idade e hora foram analisadas. O valor médio encontrado para esta enzima na espécie *D. azarae*, nas condições estudadas, foi de 259 ± 153 , 54 U.I./l.
- O kit de radioimunoensaio de fase sólida para uso em medicina humana mostrou-se eficiente para a quantificação do cortisol sérico em cutias.
- Não foram observadas diferenças entre os valores de cortisol e de lactato desidrogenase das cutias provenientes do Zoológico Municipal de Curitiba e do Museu de História Natural, o que indica que ambos os grupos estavam sendo criados em similares condições e, possivelmente, ausentes de situações estressantes.
- A cortisolemia, nas cutias estudadas, não apresentou ritmo circadiano no período compreendido entre 8:00 e 16:30 horas.
- A média dos valores de cortisol, para machos e fêmeas, foi de $45,11 \pm 13,35$ $\mu\text{g/dl}$ e $82,25 \pm 58,14$ $\mu\text{g/dl}$, respectivamente. Os valores séricos de cortisol quantificados para as fêmeas jovens foram significativamente maiores do que os encontrados para os machos adultos.

- Adicionalmente, é possível supor que durante o período gestacional de cutias a cortisolemia eleva-se. O valor de cortisol sérico observado em um exemplar de fêmea gestante, com nove meses de idade, foi de 201,48 $\mu\text{g/dl}$.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, R.H.; FREY, P.A.; JENCKS, W.P. *Biochemistry*. Boston : Jones and Bartlett Publishers, 1992. 884 p. p. 458-461.
- ACCO, A.; PACHALY, J.R.; MANGRICH, R.M.V.; MARGARIDO, T.C.C.; BACILA, M. Determinação dos parâmetros de urinálise parcial em cutia (*Dasyprocta azarae*) - relato preliminar. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997a. 57 p. p. 20.
- _____. Dosagem de cortisol sérico de cutias (*Dasyprocta azarae*) pelo método de radioimunoensaio de fase sólida - relato preliminar. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, n. 2 (Supl.), p. 16, nov. 1997b.
- AMARO, K.M.M.; SOUZA, M.S.N. Determinação de proteínas e frações séricas em cutias (*Dasyprocta primnolopha*) mantidas em cativeiro. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias (XV. : 1996 : Campo Grande). *Anais*. Campo Grande : CBC, 1996. 458 p. p. 74.
- ATROSHI, F.; PARANTAINEN, J.; SANKARI, S.; JÄRVINEN, M.; LINDBERG, L.A.; SALONIEMI, H. Changes in inflammation-related blood constituents of mastitic cows. *Veterinary Research*, Paris, v. 27, p. 125-132, 1996.
- AUGUSTO, A.Q.; PACHALY, J.R.; LANGE, R.R. Diagnóstico ultrassonográfico de gestação em cutia (*Dasyprocta azarae*) - relato de caso. In: Jornada de Medicina de Animais Selvagens e de Pequenos Ruminantes do Cone Sul (I. : 1995 : Curitiba). *Anais*. Curitiba, 1995. 16 p. p. 10.
- AZZIZ, R.; RAFI, A.; SMITH, B.R.; BRADLEY, E.L.; ZACUR, H.A. On the origin of the elevated 17-hydroxiprogesterone levels after adrenal stimulation in hyperandrogenism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 431-436, 1990.
- BEATTY, E.M.; DOXEY, D.L. Lactate dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme levels in the tissues and serum of normal lambs. *Research in Veterinary Science*, London, v. 35, p. 325-330, 1983.
- BENOLIEL, J.Q.; McCORKLE, R.; GEORGIADOU, F.; DENTON, T.; SPITZER, A. Measuring of stress in clinical nursing. *Cancer Nursing*, New York, v. 13, n. 4, p. 221-228, 1990.
- BENTLEY, P.J. *Comparative vertebrate endocrinology*. 2. ed. New York : Cambridge University Press, 1982. 483 p. p. 399-400.
- BIRD, I.M.; MASON, J.I.; RAINEY, W.E. Protein kinase A, protein kinase C, and Ca⁺²-related expression of 21-hydroxylase cytochrome P450 in H295R human adrenocortical cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 83, n. 5, p. 1592-1597, 1998.

- BLOOM, F.E. Neurotransmission and the central nervous system. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9. ed. New York : McGraw Division, 1996. 1905 p. p. 326-327.
- BOOTH, N.H. Anestésicos intravenosos e outros parenterais; Analgésicos não narcóticos. In: BOOTH, N.H.; McDONALD, L.E. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 6. ed. Rio de Janeiro : Editora Guanabara Koogan, 1992. 997 p. p. 201-210, 279-285.
- BRASIL. Ministério Público do Estado do Paraná, Ministério Público do Estado de Mato Grosso do Sul & Universidade da Flórida. *Proteção de direitos ambientais e sociais* : manual do cidadão. (Curitiba, PR) 80 p. p. 1-5, 16-17, maio 1998.
- BRADER, G.C.; PUGH, D.M. *Veterinary applied pharmacology and therapeutics*. 3. ed. Philadelphia : Lea & Fibeger, 1977. 5536 p. p. 121-130.
- BREAZILE, J.E. Physiologic basis and consequences of distress in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 191, n. 10, p. 1212-1215, Nov. 15, 1987.
- BROWN, J.L.; WASSER, S.K.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measuring noninvasively in feces. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 51, p. 776-786, 1994.
- BROWN, J.L.; WILDT, D. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. *International Zoo Yearbook*, London, v. 35, p. 173-191, 1997.
- BUCKINGHAM, J.C. Stress and the neuroendocrine-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *British Journal of Pharmacology*, Basingstone, v. 118, p. 1-19, 1996.
- CABRERA, A.; YEPES, J. *Mamíferos sud americanos* : historia natural. tomo II. Buenos Aires : Editora Ediar, 1960. 160 p. p. 44-48.
- CARLSTEAD, K.; BROWN, J.L.; STRAWN, W. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, v. 38, p. 143-158, 1993.
- CARROL, G.L.; MATTHEWS, N.S.; HARTSFIELD, S.M.; SLATER, M.R.; CHAMPNEY, T.H.; ERICKSON, S.W. The effect of detomidine and its antagonism with tolazoline on stress-related hormones, metabolites, physiologic responses, and behavior in awake ponies. *Veterinary Surgery*, Hagerstown, v. 26, p. 69-77, 1997.
- CASSEL, J. Psychosocial processes and "stress": theoretical formulation. In: KANE, R.L. *The behaviour science and preventive medicine*. Maryland : DHEW Publication, 1974. vol. 4. 261 p. p. 53-61.

- CASTRO, A.; DHINDSA, D.S.; HOVERSLAND, A.S.; MALKUS, H.; RISENTHIEL, C.; METCALFE, J. Serum biochemistry values in normal pygmy goats. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 38, n. 12, p. 2085-2087, 1977.
- CLARK, J.H.; SCHRADER, W.T.; O'MALLEY, B.W. Mecanismos de ação hormonal de esteróides. In: FOSTER, D.W. *Tratado de endocrinologia*. vol. 1. 7. ed. São Paulo : Editora Manole, 1981. 1017 p. p. 75-92.
- CLARK, J.D.; OLFERT, E.D. Rodents (Rodentia). In: FOWLER, M.E. *Zoo & wild animal medicine*. 2. ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986. 1127 p. p. 728-737.
- COOK, C.J. Basal and stress response cortisol levels and stress avoidance learning in sheep (*Ovis ovis*). *New Zealand Veterinary Journal*, Wellington, v. 44, p. 162-163, 1996.
- COOK, N.J.; SCHAEFER, A.L.; LEPAGE, P.; MORGAN-JONES, S. Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 76, p. 329-335, 1996.
- COOPER, C.; EVANS, A.C.O.; COOK, S.; RAWLINGS, N.C. Cortisol, progesterona and β -endorphin response to stress in calves. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 95, n. 2, p. 197-201, 1995.
- CUI, K.H. The effects of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Human Reproduction*, Oxford, v. 11, n. 3, p. 568-573, Mar. 1996.
- DARLINGTON, T.K.; STAKNIS, D.; GEKAKIS, N.; STEEVES, T.D.L.; WEITZ, C.J.; TAKAHASHI, J.S.; KAY, S.A. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, Washington, v. 280, p. 1599-1602, Jun. 5, 1998.
- DEUTSCH, L.A. & PUGLIA, L.R.R. *Os animais silvestres*. Rio de Janeiro : Editora Globo, 191 p. p. 52-60, 1988.
- DHABHAR, F.S.; McEWEN, B.S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 156, n. 7, p. 2608-2615, Apr. 1, 1996.
- DINAN, T.G. Serotonin and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Science*, Tarrytown, v. 58, n. 20, p. 1683-1694, 1996.
- DINIZ, L.S. Imobilização química em animais silvestres. In: SPINOSA, H.S.; GÓERNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996. 545 p. p. 153-163.
- Di RIO, R.; BARBÉRIO, J.C.; PRADAL, M.G.; MENEZES, A.M.S. *Procedimentos hormonais*. 3. ed. São Paulo : CPD CRIESP, 1994. 315 p. p. 82-91.

- DOXEY, D.L. *Veterinary clinical pathology*. London : Baillière Tindall, 1971. 356 p. p. 77-79.
- DUBOST, G. Ecology and social life of the red acouchy, *Myoprocta exilis*; comparison with the orange-rumped agouti, *Dasyprocta leporina*. *Journal of Zoology (London)*, Oxford, v. 214, p. 107-123, 1988.
- DUKES, H.H.; SWENSON, M.J. *Fisiologia de los animales domesticos* : funciones de integracion y reproduccion. tomo II. Madrid : Aguilar AS Ediciones, 1978. 1864 p. p. 1552-1583.
- DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. *Patologia clínica veterinária*. Rio de Janeiro : Editora Guanabara Koogan, 1982. 217 p. p. 124-126.
- DUNN, K.J.; HERRTAGE, M.E. Hypocortisolemia in a Labrador retriever. *Journal of Small Animal Practice*, London, v. 39, p. 90-93, 1998.
- EKKEL, S.D.; SAVENIJE, B.; SCHOUTEN, W.G.P.; TIETEN, M.J.M. Health, welfare and productivity of pigs housed under specific-stress-free conditions in comparison with two-site systems. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 74, n. 9, p. 2084, 1996.
- EMMONS, L.H. FEER, F. *Neotropical rainforest mammals* : a field guide. Chicago : University of Chicago, 1990. 281 p. p. 203-212.
- ESPLUGUES, J.V.; BARRACHINA, M.S.; BELTRÁN, B.; CALATAYUD, S.; WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S. Inhibition of gastric acid secretion by stress: a protective reflex mediated by cerebral nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 93, p. 14839-14844, Dec. 1996.
- ESTIVARIZ, F.E.; LOWRY, P.J.; JACKSON, S. Control of adrenal growth. In: JAMES, V.H.T. *The adrenal gland* : comprehensive endocrinology. 2. ed. New York : Library of Congress, 1992. 513 p. p. 55-57.
- FAO; UNESCO. *A estratégia global da biodiversidade* : diretrizes de ação para estudar, salvar e usar de maneira sustentável e justa a riqueza biótica da terra. Rio de Janeiro : World Resources Institute, 1992. 232 p. p. 7-9, 132-135.
- FARIAS, E.L.P.; LIEGEL, S.R.; PACHALY, J.R.; LANGE, R.R. Contribuição ao estudo da veia pudenda externa na cutia (*Dasyprocta azarae*). Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997. 57 p. p. 25.
- _____. FAUNA para consumo. *ISTO É*, São Paulo, p. 46-47, 04 abr., 1984.
- FERREIRA, F.M.; PACHALY, J.R.; CIFFONI, E.M.G. Valores para pressão intra-ocular em cutias (*Dasyprocta azarae*) anestesiadas pela associação cloridrato de

- xilazina, cloridrato de ketamina e sulfato de atropina. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997. 57 p. p. 23.
- FITZPATRICK, F.L. *Our animal resources* : animals and their economics importance. New York : Holt, Rinehart and Winston Inc., 1963. 128 p. p. 114-125.
- FORGET, P.M. Seed removal and seed fate in *Gustavia superba* (Lecythidaceae). *Biotropica*, Lawrence, v. 24, n. 3, p. 408-414, 1992.
- FOWLER, M.E. Stress. In: _____. *Zoo & wild animal medicine*. 2. ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1986. 1127 p. p. 34-35.
- FRANCI, O.; AMICI, A.; MARGARIT, R.; MERENDINO, N.; PICCOLELLA, E. Influence of thermal and dietary stress on immune response of rabbits. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 74, n. 7, p. 1523-1529, 1996.
- GALZIGNA, L.; BURLINA, A. *Enzimologia clinica* : applicazione pratiche - collana di laboratorio 6. II. Padova : Piccin Editore, 1977. 214 p. p. 115-122.
- GANHAO, M.F.; HATTINGH, J.; BRAACK, L.E.O.; RAATH, J.P.; PITTS, N.I. Blood composition of wild animals during immobilization. *South African Journal of Science*, Pretoria, v. 85, p. 281-282, May 1989.
- GANONG, W.F. *Review of medical physiology*. East Norwalk : Appleton & Lange, 1995. 781 p. p. 327-351.
- GEKAKIS, N.; STAKNIS, D.; NGUYEN, H.B.; DAVIS, F.C.; WILSBACHER, L.D.; KING, D.P.; TAKAHASHI, J.S.; WEITZ, C.L. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, Washington, v. 280, p. 1564-1568, Jun. 5, 1998.
- GIRGIS, R.; WINTER, J.S.D. The effects of glucocorticoid replacement therapy on growth, bone mineral density, and bone turnover markers in children with congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 83, n. 12, p. 3926-3929, 1997.
- GODDARD, P.J.; KEAY, G. GRIGOR, P.N. Lactate dehydrogenase quantification and isoenzyme distribution in physiological response to stress in red deer (*Cervus elaphus*). *Research in Veterinary Science*, London, v. 63, p. 119-122, 1997.
- GOELDI, E.A. *Os mamíferos do Brasil*. Rio de Janeiro : Livraria Clássica de A. & C., 1893. 108 p. p. 78-97.
- GOLDBARG, M.; REIS, R.K.; QUEIROZ, P.V.S.; MEDEIROS, C.P.S.; SOUSA, M.S.M. Determinação de lipídios séricos em cutias (*Dasyprocta primnolopha*) da região do semi-árido nordestino. Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. (XV. : 1996 : Campo Grande). *Anais*. Campo Grande : CBC, 1996. 458 p. p. 74.

- GRAHAM, L.H.; GOODROWE, K.L.; REASIDE, J.I.; LIPTRAP, R.M. Non-invasive of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins. *Zoo Biology*, New York, v. 14, p. 223-237, 1995.
- GREKIN, R. A supra-renal. In: MAZZAFERRI, E.L. *Endocrinologia*. Rio de Janeiro : Editora Guanabara Koogan, 1986. 3. ed. 471 p. p. 198-204.
- GUIMARÃES, D.A. *Algumas características reprodutivas da cutia fêmea *Dasyprocta prymnolopha* (Wagler, 1831) criada em cativeiro*. Belém, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi.
- GUIMARÃES, D.A.; VALE, W.G.; MOREIRA, D.; ESTÁCIO, A.; SOUZA, J.S. Puberdade e atividade ovariana no período pós-parto em cotia (*Dasyprocta sp.*). In: Congresso Brasileiro de Zoologia e XII Congresso Latino-americano de Zoologia. (XIX. : 1992 : Belém). *Resumos*. Belém: 1992. p. 157.
- HANLON, A.J.; RHIND, S.M.; REID, H.W.; BURRELLS, C.; LAWRENCE, A.B. Effects of repeated changes in group composition on immune response, behaviour, adrenal activity and liveweight gain in farmed red deer yearlings. *Applied Animal Behavior Science*, Amsterdam, v. 44, p. 57-64, 1995.
- HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. Anestésicos. In: _____. *Farmacologia ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 1998. 478 p. p. 117.
- HELLGREN, E.C. LOCHMILLER, R.L.; AMOSS, M.S.; GRANT, W.E. Endocrine and metabolic responses of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) to immobilization with ketamine hydrochloride. *Journal of Wildlife Diseases*, Lawrence, v. 21, n. 4, p. 417-425, 1985.
- HINES, M.T.; SCHOTT, H.C., II; BAYLY, W.M.; LEROUX, A.J. Exercise and immunity: a review with emphasis on the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Philadelphia, v. 10, n. 5, p. 280-289, 1996.
- HONACKI, J.H.; KINMAN, K.E.; KOEPPL, J.W. Agoutidae. In: _____. *Mammals species of the world*. Lawrence : Allen Press and the Association of Systemic Collections, 1982. 694 p. p. 575.
- HUERKAMP, M.J. Anesthesia and postoperative management of rabbits and pocket pets. In: KIRKS, R.W.; BONAGURA, J.D. *Kirks's current veterinary therapy : small animal practice*. XII. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1995. 1520 p. p. 1322-1327.
- HUIZENGA, N.A.T.M.; KOPER, J.W.; DE LANGE, P.; POLS, H.P.; STOLK, R. GROBBEE, D.E.; DE JONG, F.H.; LAMBERTS, S.W.J. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to a low dose

- of dexamethasone in elderly individuals. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 83, n. 1, p. 47-54, 1998.
- JAHOR, F.; WYKES, L.J.; REEDS, P.J.; HENRY, J.F.; DEL ROSARIO, M.P.; FRAZER, M.E. Protein-deficient pigs cannot maintain reduced glutathione homeostasis when subjected to the stress of inflammation. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 125, p. 1462-1472, 1995.
- JANSSENS, C.J.J.G.; HELMOND, F.A.; WIEGANT, V.M. The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on time of day. *Domestic Animal Endocrinology*, New York, v. 12, p. 167-177, 1995.
- JOHNSTON, S.D.; MATHER, E.C. Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 39, n. 11, p. 1766-1770, 1978.
- _____. Feline plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 40, n. 2, p. 190-192, 1979.
- KAYE, A.M. The ontogeny of estrogen receptor. In: LITWACK, G. *Biochemistry actions of hormones*. vol V. New York : Academic Press, 1978. 466 p. p. 149-195.
- KAWABATA, A.; HATA, T. Attenuation by prolonged nitric oxide synthase inhibition of the enhancement of fibrinolysis caused by environmental stress in the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 119, p. 346-350, 1996.
- KIM, J.J.; FOY, M.R.; THOMPSON, R.F. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 93, n. 10, p. 4750-4753, May 14, 1996.
- KIRKPATRICK, J.F.; WIESNER, L.; BAKER, C.B.; ANGLE, M. Comparative biochemistry and physiology 57 A, 179. 1977. In: MORTON, D.J., *et al.* Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Veterinary Record*, London, v. 136, p. 60 - 63, Jan. 21, 1995.
- KIRSCHBAUM, C.; WOLF, O.T.; MAY, M.; WIPPICH, W.; HELLHAMMER, D.H. Stress- and treatment-induced elevations of cortisol levels associated with declarative memory in healthy adults. *Life Science*, Tarrytown, v. 58, n. 17, p. 1475-1483, 1996.
- LANGE, R.R. *Criação e relocação de cutias *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823 (*Dasyproctidae*, *Mammalia*) em área verde urbana, Curitiba - PR*. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado Zoologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- LAY, D.C., Jr; FRIEND, T.H.; RANDEL, R.D.; JENKINS, O.C.; NEUENDORFF, D.A.; KAPP, G.M.; BUSHONG, D.M. Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 74, n. 8, p. 1806-1811, 1996.
- LIDDLE, G.W. The adrenal cortex. In: WILLIAMS, R.H. *Textbook of endocrinology*. 5. ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1974. 1138 p. p. 233-249.
- LOCHMILLER, R.L.; GRANT, W.E. Serum chemistry of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Journal of Wildlife Diseases*, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 134-140, 1984.
- LOCHMILLER, R.L.; HELLGREN, E.C.; GRANT, W.E. Influence of moderate nutritional stress during gestation on reproduction of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Journal of Zoology (London)*, Oxford, v. 211, p. 321-328, 1987.
- _____. Reproductive responses to nutritional stress in adult female collared peccaries. *Journal of Wildlife Management*, Bethesda, v. 50, n. 2, p. 295-300, 1986.
- MANGINI, P.R.; ACCO, A.; MARGARIDO, T.C.C.; PACHALY, J.R. Valores séricos de cortisol em fêmeas de queixada (*Tayassu pecari*) - dados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997. 57 p. p. 24.
- MANGRICH, R.M.V.; ACCO, A.; PACHALY, J.R.; LANGE, R.R.; MARGARIDO, T.C.C. Comparação dos parâmetros bioquímicos e físicos da urina de dois grupos de cutia (*Dasyprocta azarae*). *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, n. 2 (supl.), p. 62, 1997.
- MARCOS, S.; GALBÁN, J.; ALONSO, C.; CASTILLO, J.R. Intrinsic molecular fluorescence of lactate deshydrogenase: an analytical alternative for enzymatic determination of pyruvato. *Analyst*, Londres, v. 122, p. 355-359, Apr. 1997.
- McDONALD, I.R.; THAN, K.A.; EVANS, B. Glucocorticoids in the blood plasma of the platypus *Ornithoryncus anatinus*. *Journal of Endocrinology*, Bristol, v. 118, p. 407-415, 1988.
- McLEOD, P.J.; MOGER, W.H.; RYON, J. GADBOIS, S.; FENTRESS, J.C. The relation between urinary cortisol levels and social behaviour in captive timber wolves. *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa, v. 74, p. 209-216, 1996.
- MERICQ, M.V.; CUTLER, G.B., JR. High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 83, n. 2, p. 682-684, 1998.
- MERRIT JR., D.A. Preliminary observations on reproduction in the Central American agouti, *Dasyprocta punctata*. *Zoo Biology*, New York, v. 2, p. 127-131, 1983.

- MIKULECKY, M.; KREZE, A.; PUTZ, Z.; MORAVCIK, M. Daily variation of serum cortisol, 17-hydroxyprogesterone and five androgens in healthy women. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 28, p. 485-490, 1995.
- MILNE, E.M.; DOXEY, D.L. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the tissues and sera of clinically normal dogs. *Research in Veterinary Science*, London, v. 43, p. 222-224, 1987.
- MINTON, J.E.; APPLE, J.K.; PARSONS, K.M.; BLECHA, F. Stress-associated concentration of plasma cortisol cannot account for reduced lymphocyte function and changes in serum enzymes in lambs exposed to restraint and isolation stress. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 73, p. 812-817, 1995.
- MIRA, M.T. *Radioimunoensaio*. Seminário proferido ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, Curitiba, 08 maio, 1998.
- MIZOCK, B.A. Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *American Journal of Medicine*, Belle Mead, v. 98, n. 1, p. 75-84, 1995.
- MOBERG, G.P. Problems in defining stress and distress in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 191, n. 10, p. 1207-1211, Nov. 15, 1987.
- MOE, R.O.; BAKKEN, M. Effects of handling and physical restraint on rectal temperature, cortisol, glucose and leucocyte counts in the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vanlose, v. 39, p. 29-39, 1997.
- _____. Effects of repeated blood sampling on plasma concentration of cortisol and testosterone and on leucocyte number in silver fox vixens (*Vulpes vulpes*). *Acta Agriculturae Scandinavica - Section A Animal Science*, Oslo, v. 46, p. 111-116, 1996.
- MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MARGARIDO, T.C.C.; PACHALY, J.R.; MANGINI, P.R.; FERREIRA, F.M. Comportamento zoofágico inato de *Dasyprocta azarae* (Rodentia, *Dasyproctidae*). In: Simpósio sobre Ciências Médicas e Biológicas (II. : 1995 : Curitiba). *Resumos de comunicações*. Curitiba : 1995.
- MOOJEN, J. *Os roedores do Brasil*. Rio de Janeiro : Instituto Nacional do Livro, 1952. 214 p. p. 109-113.
- MORTON, D.J.; ANDERSON, E.; FOGGIN, C.M.; KOCK, M.D.; TIRAN, E.P. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Veterinary Record*, London, v. 136, p. 60-63, Jan. 21, 1995.

- MOSS, D.W.; HENDERSON, A.R. Enzymes. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1994. 2326 p. p.812-825.
- MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T.V. *Técnicas de laboratório*. São Paulo : Editora Atheneu, 1997. 511 p. p. 115-116.
- MOYER, T.P.; PIPPENGER, C.E. Therapeutics drug monitoring. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1994. 2326 p. p. 1104.
- MUNKSGAARD, L.; SIMONSEN, H.B. Behaviour and pituitary adrenal-axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 74, n. 4, p. 769-778, Apr. 1996.
- NEHAR, D.; MAUDIT, C.; BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Tumor necrosis factor- α -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinology*, Baltimore, v. 138, n. 5, p. 1964-1971, 1997.
- NEW, M.I.; DUPONT, B.; GRUMBACK, K.; LEVINE, L.S. Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In: STAMBURRY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. *The metabolic basis of inherited disease*. 5. ed. New York : McGraw-Hill Book Company, 1983. 2032p. p. 973-976.
- NWE, T.M.; HORI, E.; MANDA, M.; WATANABE, S. Significance of catecholamines and cortisol levels in blood during transportation stress in goats. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 20, p. 129-135, 1996.
- PACHALY, J.R. Abordagem racional do problema da fuga de grandes carnívoros e primatas em zoológicos e circos. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 17, n. 98, p. 5-8, jul./ago. 1997.
- PACHALY, J.R.; BRITO, H.F.V. Emprego de cloridrato de detomidina, em associação a cloridrato de ketamina e sulfato de atropina, na contenção de cutias (*Dasyprocta azarae*), com base em extrapolação alométrica. In: Jornada de Medicina de Animais Selvagens e de Pequenos Ruminantes do Cone Sul (I. : 1995 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1995. 16 p. p. 1.
- PACHALY, J.R.; LANGE, R.R.; FARIAS, E.L.P.; LIEGEL, S.R. Punção venosa em cutias (*Dasyprocta* spp.) e cotiaras (*Myoprocta* spp.). In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997c. 57 p. p. 25.
- PACHALY, J.R.; VILANI, R.G.D'O.C.; BRITO, H.F.V.; LANGE, R.R.; MARGARIDO, T.C.C.; KLEMZ, C. Efeitos adversos do azaperone em cutias (*D. azarae*).In:

Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997a. 57 p. p. 21.

_____. Efeitos adversos da associação de azaperone e cloridrato de xilazina em *Dasyprocta azarae* - relato de caso. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997b. 57 p. p. 22.

PACHALY, J.R.; WERNER, P.R.; SCHIMANSKI, J.C.; CIFFONI, E.M.G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 13, n. 74, p. 47-52, jul./ago. 1993.

PERRY, C.; PERETZ, H.; BEM-TAL, O.; ELDOR, A. Highly elevated lactate dehydrogenase level in a healthy individual: a case of macro-LDH. *Journal of Hematology*, v. 55, p. 39-40, 1997.

PETERSON, M.E.; KEMPPAINEN, R.J.; ORTH, D.N. Dose-response relation between plasma concentrations of corticotropin and cortisol after administration of incremental doses of cosyntropin for corticotropin stimulation testing in cats. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 54, n. 2, p. 300-304, Feb. 1993.

PIAZZA, P.V.; Le-MOAL, M.L. Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Palo Alto, v. 36, p. 359-378, 1996.

POPOVIC, A.; PLÉCAS, B.; UGRESIC, N.; GLAVASKI, A. Altered gonadal hormone level and constant light-induced stress interfere with the response of the adrenal medulla to oxytocin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 29, p. 273-280, 1996.

PUDNEY, J.; SWEET, P.R.; VINSON, G.P.; WHITEHOUSE, B.J. Morphological correlates of hormone secretion in the rat adrenal cortex and the role of filopodia. *The Anatomical Record*, New York, v. 201, p. 537-551, 1981.

RAMSAY, D.S.; LEWIS, M. The effects of birth conditions on infants' cortisol response to stress. *Pediatrics*, Grove Village, v. 95, n. 4, p. 546-549, 4 Apr. 1995.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Pharmacology* : International Student Edition. 3. ed. New York : Churchill Livingstone, 1995. 855 p. p. 546.

RAO, A.R.; ROSE, M.K. Effects of chronic stressors and anti-stressors on plasma glucose in mice. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v. 72, p. 139-142, Feb. 1995.

- REDFORD, K.H.; EISENBERG, J.F. *Mammals of the neotropics* - the southern cone (Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay). vol. 2. Chicago : The University of Chicago Press, 1992. 430 p. p. 346-347.
- ROELFSEMA, R.; PINCUS, S.N.; VELDHUIS, J.D. Patients with Cushing's disease secrete adrenocorticotropin and cortisol jointly more asynchronously than healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, n. 2, p. 688-692, 1998.
- RODRIGUEZ, J.M.; VAUGHAN, C. Notas sobre la ecologia de la guatuza (*Dasyprocta punctata* Gray) en el bosque seco tropical de Costa Rica. *Brenesia*, San José, n. 24, p. 353-360, 1985.
- ROITMAN, I. Stress ou estresse. *Mednews*, v. 13, ano VI, p. 19-26, mar. 1989.
- ROOZEN, A.W.M.; TSUMA, V.T.; MAGNUSSON, U. Effects of short-term restraint stress on plasma concentrations of catecholamines, β -endorphin and cortisol in gilts. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 56, n. 9, p. 1225-1227, Sep. 1995.
- ROOZENDAAL, B. *Modulação da memória por hormônios do estresse*. Palestra proferida no Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Curitiba, 02 set., 1998.
- SAEED, A.; AFZAL, M.; AKHTAR, S. Effect of storage on some constituents of camel serum. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, v. 72, n. 6, p. 212-215, Jun. 1995.
- SALTZ, D.; WHITE, G.C.; BARTMANN, R.M. Assessing animal condition, nutrition, and stress from urine in snow. *Wildlife Society Bulletin*, East Melbourne, v. 23, n. 4, p. 694-704, 1995.
- SAPOLSKY, R.M. Why stress is bad for your brain. *Science*, Washington, v. 273, p. 749-745, Aug. 9, 1996.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, London, v. 138, p. 32, Jul. 4, 1936.
- _____. *Stress* : a tensão da vida. São Paulo : IBRASA, 1959. 396 p.
- _____. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of Clinical Endocrinology*, v. 6, n. 2, p. 117-230, Feb. 1946.
- SLAYDEN, S.M.; CRABBE, L.; BAE, S.; POTTER, H.D.; AZZIZ, R.; PARKER, C.R. The effects of 17 β -estradiol on adrenocortical sensitivity, responsiveness, and steroidogenesis in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 83, n. 2, p. 519-524, 1998.

- SMITH, N.J.H. Utilization of game along Brazil's transamazon highway. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 6, n. 4, p. 455-466, 1976.
- SMITH, R.F.; DOBSON, H. Effect of preslaughter experience on behavior, plasma cortisol and muscle pH in farmed red deer. *Veterinary Record*, London, v. 126, p. 155-158, Feb. 17, 1990.
- SMYTHE, N. Seed survival in the palm *Astrocaryum standleyanum*: evidence for dependence upon its seed dispersers. *Biotropica*, Lawrence, v. 21, n. 1, p. 50-56, 1989.
- _____. The natural history of the Central American agouti (*Dasyprocta punctata*). *Smithsonian Contributions to Zoology*, Ljubljana, v. 257, p. 1-52, 1978.
- SONODA, M.C.; GASPARINI, R.L.; CATÃO-DIAS, J.L. Miopatia da captura em cervos do pantanal (*Blastocerus dichotomus*). In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias (XV. : 1996 : Campo Grande). *Anais*. Campo Grande : CBC, 1996. 458 p. p. 81.
- SØRENSEN, B.; WEBER, R.E. Effects of oxygenation and the stress hormones adrenaline and cortisol on the viscosity of blood from the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, Cambridge, v. 198, p. 953-959, 1995.
- SOUZA, M.S.N. Avaliação da função renal de cutias (*Dasyprocta primnolopha*) mantidas em cativeiro. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias (XV. : 1996 : Campo Grande). *Anais*. Campo Grande : CBC, 1996. 458 p. p. 68.
- SOUZA, M.S.N.; AMARO, K.M.N. REIS, P.F.C.C.; ORIÁ, R.B. Determinação da concentração de ácido úrico em cutias (*Dasyprocta primnolopha*) mantidas em cativeiro. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias (XV. : 1996 : Campo Grande). *Anais*. Campo Grande : CBC, 1996. 458 p. p. 73.
- SPRAKER, T. Stress and capture myopathy in artiodactylids. In FOWLER, M.E. *Zoo & wild animal medicine*. 3. ed. Philadelphia : W. B. Saunders, 1993, 617 p. p. 481-487.
- TAYLOR, P.M. Stress response in ponies during halothane or isofluthane anesthesia after induction with thiopentone or xylazine/ketamine. *J. Vet. Anaesth.* 18: 8 - 14, 1991. In: CARROL, G.L. *et al.* The effect of detomidine and its antagonism with tolazoline on stress-related hormones, metabolites, physiologic responses, and behaviour in awake ponies. *Veterinary Surgery*, Hagerstown, v. 26, p. 69-77, 1997.
- THOMPSON, D.L.; GARZA, F.; MITCHELL, P.S.; ST. GEORGE, R.L. Effects of short-term stress, xylazine tranquilization and anesthetization with xylazine plus ketamine on plasma concentration of cortisol, luteinizing hormone, follicle stimulation hormone and prolactin in ovariectomized pony mares. *Theriogenology*, New York, v. 30, n. 5, p. 937-946, Nov. 1988.

- THUN, R.; KAUFMANN, C.; BINDER, H.; DÖBELI, M.; KÜNDIG, H.; SCHEURMANN, T. The influence of stress on reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 31, p. 571-574, 1996.
- TOLEDO, L.R. Cutia. *Globo Rural*, Rio de Janeiro, v. 116, p. 75-77, jun. 1995.
- TORPY, D.J. Sexual dimorphism of the human stress-response may be to estradiol-mediated stimulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone synthesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, n. 3, p. 982, 1997.
- TRAINER, P.J.; WOODS, R.J.; KORBONITS, M.; POPOVIC, V.; STEWART, P.M.; LOWRY, P.J.; GROSSMAN, A.B. The pathophysiology of circulating corticotropin-releasing hormone-binding protein levels in the human. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, n. 5, p. 1611-1614, 1998.
- TYÖPPÖNEN, J.; JOKSLAHTI, T.; LINDBERG, P. Activities of some enzymes in the tissues of the blue fox (*Alopex lagopus*). *Research in Veterinary Science*, London, v. 33, p. 295-297, 1982.
- VERZÁR, F. The nature of the adrenal cortical secretion. In: YOFFEY, J.M. *The suprarenal cortex*. London : Butterworths Scientific Publications, 1953. 232 p. p. 39-41.
- VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxon, 116C, v. 1, p. 89-95, 1997.
- VILANI, R.G.D'O.C.; PACHALY, J.R.; CIFFONI, E.M.G. Valores de oximetria em cutias (*Dasyprocta azarae*) anestesiadas pela associação cloridrato de xilazina, cloridrato de ketamina e sulfato de atropina - relato preliminar. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (XIX. : 1997 : Curitiba). *Anais*. Curitiba : 1997. 57 p. p. 23.
- VON RICHTER, W. The utilization and management of wild animals - a form of land use in marginal areas of Africa. *Animal Research and Development*, Tiibingen, v. 10, p. 93-103, 1979.
- YOUNG, D.S.; BERMES, E.W. Specimen collection and processing; sources of biological variation. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1994. 2326 p. p. 58-83.
- WEISS, D. Hyperglycemia during physical stress. *American Journal of Medicine*, Belle Mead, v. 100, p. 374, 1996.

- WETTERBERG, G.B.; BRITO, W.L.S.; FERREIRA, M.; ARAÚJO, V.C. Espécies da fauna amazônica potencialmente preferidas para consumo nos restaurantes de Manaus. *Brasil Florestal*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 25, p. 59-68, 1976.
- WHITLEY, R.J.; MEIKLE, W.A.; WATTS, N.B. Biogenic amines; Adrenocortical steroids In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. ed. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1994. 2326 p. p. 1739-1744, 1796-1839.
- WILLEMSE, T.; VROOM, M.W.; MOL, J.A.; RIJNBERK, A. Changes in plasma cortisol, corticotropin and α -melanocyte-stimulating hormone concentrations in cats before and after physical restraint and intradermal testing. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 1, p. 69-72, Jan. 1993.
- WILSON, B.A.; SHANNON, M.T.; STANG, C.L. *Nurses drug guide*. Stamford : Appleton & Lange, 1997. 1523 p. p. 103-108.
- WIXSON, S.K.; WHITE, W.J.; HUGHES, H.C.; LANG, C.M.; MARSHALL, W.K. A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rat. *Laboratory Animal Science*, Cordova, v. 37, n. 6, p. 726-730, 1987.
- WOODS, C.A. In: Edited by WILSON, D.E.; REEDER, D.M. *Mammals species of the world*: a taxonomic and geographic reference. 2. ed. Washington : Smithsonian Institution Press, 1993. 1206 p. p. 771-806.
- ZHAN, Y.; YASUDA, J.; TOO, K. Reference data on the anatomy and serum biochemistry of silver fox. *Japanese journal of veterinary research*, Kitaku, v. 39, p. 39-50, 1991.
- _____. Reference data on the anatomy, hematology and biochemistry of 9 month-old silver foxes. *Japanese journal of veterinary research*, Kitaku, v. 45, n. 1, p. 13-19, 1997.
- ZUCKERMAN, S. The adrenal-genital relationship. In: YOFFEY, J.M. *The suprarenal cortex*. London : Butterworths Scientific Publications, 1953. 232 p. p. 69-80.