

KATHERINNE MARIA SPERCOSKI

**MONITORAMENTO A LONGO PRAZO DA EXCREÇÃO DE CORTICÓIDES FECAIS EM
LOBOS-GUARÁS (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) DE CATIVEIRO E VIDA LIVRE:
UMA CONTRIBUIÇÃO PARA O MANEJO E A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia. Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosana Nogueira de Moraes

CURITIBA

2007

A Deus, por ter criado a Vida, por ter me dado à oportunidade de viver e de ter a melhor mãe, pai e irmão do Mundo, e os melhores amigos do Universo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por absolutamente tudo, pela vida, por todas as oportunidades que me ofereceu e oferece, por toda ajuda no mestrado e na redação desta dissertação.

À minha família, melhor do mundo, que amo, amo, amo demais. Que me deu todas as condições emocionais e financeiras para que eu pudesse chegar onde cheguei. Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida, Obrigado por existirem!!!

À minha orientadora, Prof. Dra. Rosana, que me aceitou, me ensinou, acreditou no meu trabalho e nos meus esforços, por todo tempo em que estamos juntas, desde muito antes do mestrado. Muito obrigada por tudo Teacher!

Ao programa de Pós-graduação, pela oportunidade e pelo carinho com que todos os professores sempre me trataram.

À Marlene, secretária do programa de Pós-graduação, por todo carinho, por todos os favores e por toda gentileza prestada durante esses dois anos de mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto Smithsonian pelo financiamento do projeto, por toda ajuda no suporte técnico e no treinamento da técnica de dosagem.

Ao Instituto para Conservação dos Carnívoros Neotropicais, pela oportunidade de participar do Projeto Lobo-guará, por toda ajuda logística e financeira prestada.

Aos Zoológicos de Americana e de Ilha Solteira e ao Conservadouro Conservacionista da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), pela participação no projeto, pelo apoio técnico, por todo o carinho com que me receberam e por toda paciência que tiveram ao longo do período de estudo.

À professora Dra. Helena C. Silva de Assis (UFPR), pelo ajuda e empréstimo do leitor de ELISA.

Ao setor de imunogenética do Hospital da Clínicas, UFPR, pela ajuda no auxílio das leituras de cintilação.

Aos amigos do laboratório de metabolismo celular e ao professor Dr. Luiz Cláudio, por toda ajuda, paciência e carinho com que sempre me trataram.

À grande amiga Nucharin Songsasen, por absolutamente tudo, por ser essa pessoa “so cute” que você é, por todo carinho, toda ajuda, toda paciência e compreensão nas minhas faltas. Obrigada por tudo Nuch, sou muito feliz por ter te conhecido e ter você como minha amiga.

Aos amigos do Instituto Pró-Carnívoros, Ronaldo, Rogério, Rose, Flávio, Juliana, Viviane, por toda ajuda e por todo carinho.

Novamente ao Ronaldo, por ter me oferecido à oportunidade de trabalhar neste projeto, por toda a orientação profissional, por ter sido meu “co-orientador” não oficial. Obrigada por tudo!

Novamente ao Rogério, por acima de tudo ser essa pessoa linda que você é, em todos os sentidos. Ro, obrigada por toda ajuda, por toda orientação, pelas análises de GPS, pelos puxões de orelha, mas principalmente pela amizade e carinho com que você sempre me tratou.

Aos grandes amigos e pesquisadores de campo da Serra da Canastra, Fernanda, Jean e Joares. Eu só tenho a agradecer a todos vocês, meus amigos e colegas profissionais que sempre me receberam com todo carinho e amizade. Obrigada pela ajuda no projeto, pela coleta de amostras fecais e pelas boas risadas.

Novamente a amiga Fernanda, Fer querida obrigada por você existir na minha vida, obrigada pelos bailes da terceira idade que íamos quando eu estava na Canastra.

Novamente ao amigo Jean, você me ensinou muitas coisas, mas a principal delas foi a forma como devemos tratar todas as pessoas do mundo, sempre com carinho, amor e amizade, mesmo por aquelas que nem conhecemos direito. Obrigada Jê por tudo, por todos os ensinamentos e por sermos grandes amigos. Você mora num cantinho bem especial do meu coração.

Aos grandes colegas e amigos de laboratório Angelinha, Andrei e Grazi, por tudo que vocês representam pra mim, por toda a ajuda, que não foi pouca. Amigos, quero que vocês saibam que este trabalho só existe por que vocês estavam do meu lado, me ajudando em todos os sentidos.

Ao melhor namorado do mundo, que eu amo muito, obrigada por aparecer na minha vida (e por ter me desencilhado!!! Ahahah), por ser esse super companheiro que

você é, por toda a paciência que tem comigo e por ser essa pessoa maravilhosa que você é. Te amo.

Aos MELHORES amigos do Universo: Deni, Tutu, Paps, Linda e Otto. Não há no mundo palavras que possam descrever o que vocês pra mim. Não posso escrever mais porque eu vou chorar....AMO VOCÊS!

Ao grande professor de combat e amigo Rafael. Rafa, obrigada por ter sempre uma música legal de may thay pra me alegrar, você é muito especial para mim.

Aos amigos do LFCO que estiveram sempre presentes, me ajudaram e apoiaram em todos os momentos.

À professora Dra. Carolina Freire, por sua grande ajuda e paciência. Por todos os ensinamentos diretos ou indiretos (por meio dos avisos no LFCO), pela oportunidade de cuidar do Genebaldo Napoleão, por todo carinho e amizade.

Ao grande amigo Dido Dombrowski, por tudo que você é e representa pra mim, mesmo distante estaremos sempre juntos. Obrigado por tudo Di.

A todos os meus amigos, que direta ou indiretamente me ajudaram, me apoiaram. Amo todos vocês.

Aos animaizinhos do meu coração: Elzinha linda, Chica, Max, Carinho, meus peixitos, Genebaldo, Antônio (*in memorian*), Luna Lovegood, Tico Mico e Ming Ling.

Aos lobos-guarás do projeto, que estiveram, mesmo sem querer, fazendo parte da minha vida e nos ajudando a trabalhar pela conservação da vida selvagem que ainda resta no planeta.

A Espiritualidade que sempre me assistiu, mesmo quando eu não os conhecia conscientemente: Obrigada a todos os meus Guardiões do meu coração (Pai João, Dona Olinda, Sra Eli, Sr. Ashtar, Dona Padilha, Sr. Marabo, Sr Hemisarê, Sr. Selmi e tantos outros que eu amo, de forma muito especial). Obrigada por existirem.

A todos vocês, amigos recentes e não tão recentes, quero agradecer por serem parte da importante de mim, por todos os momentos de união, por me ajudarem a ser quem eu sou. Vocês são todos maravilhosos, amo muito, muito, muito todos vocês.

OBRIGADA POR EXISTIREM!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Considerações gerais	14
1.2. Aspectos sobre a filogenia e biologia do lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i> , Illiger, 1811)	17
1.3. Situação atual da espécie	21
1.4. Parque Nacional da Serra da Canastra – MG	21
1.5. Estresse <i>versus</i> alostasia	24
1.6. Mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse e respostas alostáticas ..	26
1.7. Atividade adrenocortical <i>versus</i> função reprodutiva	28
1.8. Dosagem e quantificação de glicocorticóides e seus metabólitos	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Animais e coleta de amostras fecais	32
3.1.1 Animais de cativeiro	32
3.1.2 Animais de vida livre	33
3.2 Extração e dosagem	35
3.3 Análise estatística	38
4. RESULTADOS	41
4.1. Extração e dosagem	41
4.2 Metabólitos de corticosteróides fecais (MCF)	42
4.2.1 Animais de vida livre x animais de cativeiro	42
4.2.2. Animais de cativeiro	43
4.2.3. Animais de vida livre	48
5. DISCUSSÃO	51
5.1 Animais de vida livre x animais de cativeiro	51

5.2 Animais de cativeiro	52
5.2.1 Perfis da concentração de MCF individual e por casal	53
5.2.2 Resposta adrenocortical nos diferentes momentos reprodutivos	56
5.3 População de vida livre	58
5.3.1 Perfil sazonal da atividade adrenocortical	58
5.3.2 Pressão antrópica	61
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESPÉCIME DE LOBO-GUARÁ (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) ADULTO, NA ÁREA DE CERRADO, MINAS GERAIS, 2003.....	17
FIGURA 2	MAPA ESQUEMÁTICO DE DISTRIBUIÇÃO DO LOBO-GUARÁ NA AMÉRICA LATINA, CURITIBA, 2007.....	18
FIGURA 3	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS, 2007.....	23
FIGURA 4	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE AMOSTRAS FECAIS DE LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE NAS REGIÕES DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA (PNSC), SÃO ROQUE DE MINAS – MG, 2004 A 2006.....	34
FIGURA 5	GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO HORMONAL EM RELAÇÃO AO PERCENTUAL DE LIGAÇÃO (%L) PARA AS CURVAS PADRAO E DE VALIDAÇÃO PARA MCF DE LOBOS-GUARÁS (Cbr), MOSTRANDO PARALELISMO ENTRE ELAS. CURTIBA – PR, 2007.....	41
FIGURA 6	CONCENTRAÇÕES BASAIS DE METABÓLITOS DE CORTICOSTERÓIDES FECAIS (ng/g de fezes) (MÉDIA ± EPM) EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE E CATIVEIRO, DURANTE OS PERÍODOS DE ESTAÇÃO REPRODUTIVA DE 2004 A 2006. CURITIBA – PR, 2007.....	42
FIGURA 7	CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS ± EPM) EM CASAS DE LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO QUE NÃO SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.....	44

FIGURA 8	CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS ± EPM) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO QUE SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.....	45
FIGURA 9	PERFIS DE MCF (ng/g de fezes) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS QUE NÃO SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.....	46
FIGURA 10	PERFIS DE MCF (ng/g de fezes) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS QUE SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.....	47
FIGURA 11	CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS ± EPM) AO LONGO DO ANO EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE. CURITIBA – PR, 2007.....	49
FIGURA 12	CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS ± EPM) EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE, EXPOSTOS A PRESSÃO ANTRÓPICA. CURITIBA – PR, 2007.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	OBSERVAÇÃO DE COMPORTAMENTO SEXUAL (monta = M; tentativa de monta = TM), NÚMERO DE FILHOTES NASCIDOS, CUIDADO PARENTAL, TAXA DE MORTALIDADE (%) E CAUSAS DE MORTE EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO. CURITIBA – PR, 2007.....	43
TABELA 2	MÉDIAS (\pm EPM) DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) INDIVIDUAIS E POR CASAL E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO TOTAL INDIVIDUAL E POR CASAL EM LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO. CURITIBA – PR, 2007.....	44
TABELA 3	MÉDIA (\pm EPM) DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) EM MACHOS E FÊMEAS DE LOBOS-GUARÁS DE CASAIS DE CATIVEIRO QUE SE REPRODUZIRAM NOS PERÍODOS GESTACIONAL (G), ANTES DO PARTO (AP) E POS PARTO (PP). CURITIBA – PR, 2007.....	48
TABELA 4	MÉDIAS (\pm EPM) DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE POR ESTAÇÕES DO ANO E NOS DIFERENTES NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO À PRESSÃO ANTRÓPICA. CURITIBA – PR, 2007.....	49

MONITORAMENTO A LONGO PRAZO DA EXCREÇÃO DE CORTICÓIDES FECAIS EM LOBOS-GUARÁS (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) DE CATIVEIRO E VIDA LIVRE: UMA CONTRIBUIÇÃO PARA O MANEJO E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o maior canídeo da América do Sul tem na redução e fragmentação de seu habitat natural a ameaça mais significativa para a espécie, já que ocupa um bioma, o cerrado, considerado um dos mais ameaçados do planeta. Estratégias de conservação têm sido implementadas na tentativa de assegurar a sobrevivência desta espécie. Entretanto, aspectos importantes de sua biologia, como por exemplo questões relativas à reprodução, ainda são pouco conhecidos. Estudos em cativeiro mostram baixa eficiência reprodutiva, a qual pode estar relacionada ao aumento da atividade adrenocortical frente ao estresse crônico. Da mesma forma, animais de vida livre podem ter a reprodução afetada em condições de estresse, já que altos níveis de glicocorticóides são associados com comprometimento da função gonadal em muitas espécies. Entretanto, dados sobre a atividade adrenocortical em lobos-guarás são escassos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar de forma não invasiva, a atividade adrenocortical de lobos-guarás de cativeiro e vida livre visando: 1) definir o perfil anual de atividade adrenocortical de animais de vida livre; 2) verificar possíveis diferenças entre animais de vida livre e cativeiro; 3) relacionar a atividade adrenocortical com as funções reprodutivas; e 4) verificar o possível efeito da proximidade com atividades humanas sobre a atividade adrenocortical em animais livres. Para tanto, foram coletadas amostras fecais de 07 casais cativos de lobos-guarás (Zoológicos de Americana e Ilha Solteira -SP- e Criadouro Conservacionista da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração – MG) e de animais de vida livre provenientes do Parque Nacional da Serra da Canastra - MG, no período de Maio/2004 a Agosto/2006. Os esteróides fecais foram extraídos em etanol 90% e quantificados pelo método de ELISA, utilizando-se um anticorpo contra cortisol, validado para os extratos fecais. Os valores médios (\pm EPM) para as concentrações basais de metabólitos de glicocorticóides fecais (MCF) (ng/g de fezes úmidas) foram maiores ($p < 0,05$) nos lobos-guarás cativos ($95,66 \pm 3,70$; $n=203$) quando comparados aos animais de vida livre ($54,56 \pm 3,54$; $n=82$). Três dos casais cativos tiveram filhotes, mas a taxa de sobrevivência dos filhotes foi baixa, confirmando uma baixa eficiência reprodutiva. As concentrações basais de MCF aumentaram nas fêmeas durante a gestação e lactação, bem como nos machos após o nascimento dos filhotes, sugerindo envolvimento no cuidado parental. Nos animais de vida livre observou-se perfil sazonal na atividade adrenocortical, com aumento significativo no valor médio na concentração basal de MCF do verão ($49,48 \pm 5,75$) para a primavera ($96,45 \pm 11,26$). Esse aumento na atividade adrenocortical pode estar associado ao aumento das demandas metabólicas da lactação e cuidado parental, já que na primavera ocorre o maior número de nascimentos em vida livre. As análises de pressão antrópica mostram aumento na concentração basal de MCF nos animais de vida livre mais expostos ao contato com humanos. O presente estudo constitui o primeiro relato de monitoramento da atividade adrenocortical, por meios não invasivos, de lobos-guarás, tanto em cativeiro como em vida livre, tendo obtido informações importantes para o manejo adequado da espécie.

Palavras-chave: lobo-guará, atividade adrenocortical, metabólitos de corticosteróides fecais, vida livre, pressão antrópica.

LONG TERM MONITORING OF FECAL CORTICOID METABOLITES IN CAPTIVE AND FREE-RANGING MANED WOLVES (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811): A CONTRIBUTION TO THE SPECIES MANAGEMENT AND CONSERVATION.

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the largest canid of South America, is a threatened species endemic to, one of the most threatened ecosystem on earth, the cerrado. The reduction and fragmentation of its natural habitat are the most significant threats for the species.. Effective conservation efforts to assure the survival of this species involve multidisciplinary approaches, however, important aspects of its biology, ecology, epidemiology, genetic, and reproduction are still not clarified. Studies in captivity demonstrated that the low reproductive efficiency of maned wolves might be related to increased adrenocortical activity in response to chronic stressful conditions. Stress would also be affecting reproductive success in free-living populations, since high glucocorticoids levels are known to affect the gonadal function in many species. However, for maned wolves, even basic information on its pattern of adrenocortical activity is scarce. Thus, the present study the excretion rate of fecal corticoid metabolites (FCM) was used to monitor the adrenocortical function in captive and free-ranging maned wolves aiming to verify: 1) the annual profile of free-ranging animals; 2) similarities and differences between captive and free-ranging animals; 3) the relationship between adrenocortical activity and reproductive function; and 4) the influence of proximity to human activities on adrenocortical function. Fecal samples were collected from 07 captive pairs (Americana Zoo-SP, Ilha Solteira Zoo-SP, and Brazilian Company of Metallurgy and Mining – CBMM- Conservationist Center -MG) and from free-ranging maned wolves living at the Serra da Canastra National Park (SCNP), Minas Gerais, Brazil, from May/2004 to August/2006. Fecal steroids were extracted in 90% ethanol and FGM were quantified by a cortisol enzyme-immunoassay validated for the maned wolves' fecal extracts. Mean basal values (\pm SEM) for FCM (ng/g of wet feces) were higher ($p < 0,05$) in captive animals (95.66 ± 3.7 ; $n=203$) in comparison to the free-ranging population (54.56 ± 3.54 ; $n=82$). Although the breeding success was low for the captive couples, three pairs had pups. Basal FCM values were higher during pregnancy and lactation in females. The presence of offspring also increased basal FCM in males, suggesting that males are also involved in parental care. In the free-ranging population a seasonal profile was found, with a significant increase on mean basal FCM from summer (49.48 ± 5.75) to spring (96.45 ± 11.26). This pattern of FCM excretion may be related to the increase on metabolic demands of lactation and parental care, since spring is the season were most of the pups are born. Also, animals closer to the areas of human activities have shown a significant increase on basal FCM. This is the first study on adrenocortical activity monitoring by means of fecal corticoids either in captive or in free-living maned wolves. Results herein obtained may be crucial for the establishment of conservation plan for this charismatic species.

Key words: maned wolf, adrenal activity, fecal corticoid metabolites, free-ranging, human disturbance

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A diversidade biológica no planeta vem sofrendo, de forma contínua e acelerada, ondas de extinções sem precedentes. Atividades antrópicas que resultam em fragmentação e poluição dos habitats naturais e ações mais diretas de exploração sobre as populações selvagens, como caça e tráfico de animais selvagens, têm resultado em grandes e rápidas alterações ambientais, as quais podem dificultar a adaptação de certas espécies, colocando em cheque sua viabilidade e encaminhando-as ao processo de extinção (VALLADARES-PÁDUA *et al.*, 2004; JAVOROUSKI, 2003).

Grande parte da destruição de comunidades biológicas ocorreu durante os últimos 150 anos, quando a população humana aumentou de um bilhão de habitantes, em 1850, para seis bilhões, em 1998. Estima-se que aproximadamente 85 espécies de mamíferos (2,1%) e 113 espécies de aves (1,3%) tornaram-se extintas desde o ano 1600 (PRIMACK e RODRIGUES, 2001). Em 2002, a World Conservation Union (IUCN) identificou 76 taxons de carnívoros ameaçados de extinção, sendo que quatro foram extintos desde a metade do século XIX (YOUNG *et al.*, 2004). Em 2006 a taxa de espécies ameaçadas, para família *Canidae*, foi de 25% - 9 espécies do total de 36 existentes no grupo, sendo uma delas o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), classificado como potencialmente ameaçado de extinção (NT – “near to threatened”) (IUCN, 2007).

São grandes os desafios encontrados quando se quer garantir a sobrevivência de uma espécie ameaçada, sendo necessário em primeiro lugar garantir que esta possua pelo menos uma população mínima viável (VALLADARES-PÁDUA *et al.*, 2004). Algumas espécies, ainda não tecnicamente extintas, possuem poucos exemplares vivos e podem ser consideradas ecologicamente extintas, pois não exercem mais, de forma significativa, um papel na organização da comunidade em que habita (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

Quando essa população mínima viável para a espécie não é alcançada de forma natural, faz-se necessário o uso de estratégias conservacionistas, com ações integradas entre o manejo de populações *in situ* (vida livre) e *ex situ* (cativas), visando a redução das ameaças sobre a espécie e a recuperação de sua viabilidade, com

patamares genéticos, demográficos e ecológicos mínimos e compatíveis para sua perpetuação (VALLADARES-PÁDUA *et al.*, 2004).

O manejo reprodutivo em cativeiro de espécies ameaçadas é uma importante ferramenta conservacionista, amplamente debatida e, em certas situações, fundamental para que este processo de extinção e conseqüente perda da diversidade biológica sejam controlados e, em alguns casos, até mesmo revertidos. Exemplos de espécies quase extintas na natureza e que foram salvas mediante programas de reprodução e manejo em cativeiro, incluem o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), o bisão europeu (*Bison bonasus*) e o condor da Califórnia (*Gymnogyps californianus*) (ISIS, 2007).

Adicionalmente, este manejo em cativeiro tem gerado importantes informações sobre a singular biologia de algumas espécies ameaçadas. Em carnívoros, por exemplo, destacam-se os estudos com felídeos selvagens (YOUNG *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 2001). Entretanto, para outras espécies do grupo, em especial para o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) há limitada informação sobre sua biologia reprodutiva (SONGSASEN *et al.*, 2006). Até 1998 dados reprodutivos sobre lobos-guarás, principalmente para populações de vida livre, eram escassos e os estudos de cativeiro eram mais voltados para áreas de comportamento e clínica médica veterinária (VELLOSO *et al.*, 1998).

As populações de cativeiro de lobos-guarás não são “auto-sustentáveis” (SONGSASEN *et al.*, 2006; PRIMACK e RODRIGUES, 2001), e os estudos indicam baixas taxas de concepção (prenhez) e altas taxas de mortalidade dos filhotes, o que resulta em baixa eficiência reprodutiva. Os estudos de censo feitos para populações cativas de lobos-guarás, através do International Studbook for Maned Wolves (ISMW) indicam que, durante o período de 1980 a 1998, 55,74% dos filhotes nascidos morreram com menos de um ano de idade. A causa primária têm sido reportada como “desconhecida”, entretanto acredita-se que a incompetência parental possa ser a causa real (MAIA e GOUVEIA, 2002).

Estudos com fêmeas de lobos-guarás que conceberam, mas perderam seus filhotes logo após o nascimento demonstram reduzidas concentrações de progestágenos, durante todo o período de prenhez, quando comparadas com fêmeas

que conceberam, mas não perderam seus filhotes após o nascimento. Especula-se que talvez essa baixa eficiência reprodutiva observada em lobos-guarás pode estar relacionada com o aumento da resposta adrenal frente ao estresse crônico causado pelo manejo em cativeiro (SONGSASSEN *et al.*, 2006).

De forma similar, as populações de vida livre podem ter sua eficiência reprodutiva reduzida em condições de estresse, principalmente nas áreas onde ocorre contato com atividades antrópicas, como é o caso do Parque Nacional da Serra da Canastra, habitat natural desta espécie, no Estado de Minas Gerais (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

A condição de estresse pode alterar a função gonadal em muitas espécies, pois a secreção aumentada de glicocorticóides afeta a síntese e secreção de gonadotrofinas, podendo, além de causar alterações no ciclo reprodutivo normal, causar distúrbios de implantação e desenvolvimento fetal, diminuindo assim o sucesso reprodutivo (RIVIER e RIVEST, 1991). Os indivíduos mantidos em cativeiro sofrem estímulos estressores ocasionados por alterações em seus hábitos, tais como proximidade forçada em relação as suas presas e ou predadores, superpopulação, dietas inadequadas, falta de privacidade, formação de grupos sociais impostos e grande proximidade com humanos (MORGAN e TROMBORG, 2007; JAVOROUSKI, 2003). Em outros carnívoros, como pequenos felídeos, os baixos níveis reprodutivos estão relacionados a fatores estressantes de cativeiro (JAVOROUSKI, 2003), contudo para lobos-guarás ainda faltam estudos que comprovem a real condição de estresse e indiquem que estas condições, em cativeiro ou áreas de vida livre próximas e sob a influência de atividades antrópicas, interferem significativamente ou não em sua eficiência reprodutiva.

A quantificação de hormônios adrenais, através de métodos não invasivos, vem sendo utilizada para investigar a atividade adrenocortical em varias espécies animais incluindo carnívoros, primatas, lagomorfos, cervídeos, bovídeos e aves (YOUNG *et al.*, 2004) e pode assim avaliar o grau de estresse do indivíduo ou de um grupo. Em conjunto com outras informações, como por exemplo análise de hormônios gonadais e dados comportamentais, essa quantificação de corticosteroides pode ajudar a elucidar as possíveis causas da baixa eficiência reprodutiva (JAVOROUSKI, 2003).

1.2. Aspectos sobre a filogenia e biologia do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811).

A ordem *Carnívora* é formada por 7 famílias, 92 gêneros e 240 espécies de ocorrência mundial (NOWAK, 1991). O lobo-guará, dentro da Ordem *Carnívora*, está inserido na família *Canidae*, que engloba 16 gêneros e 36 espécies, sendo uma única espécie pertencente ao gênero *Chrysocyon*, não havendo ainda subespécies reconhecidas (SHELDON, 1992).

O lobo-guará é o maior canídeo sul-americano, medindo entre 95 e 115 cm de comprimento (mais 38 a 50 cm de cauda) e pesando entre 20 e 30 kg (RODRIGUES, 2002). Sua aparência física difere significativamente da de outros canídeos, principalmente devido às pernas longas e magras. Possui orelhas grandes, pêlos longos de coloração laranja–avermelhado na maior parte do corpo, crina negra no dorso, focinho, patas dianteiras e mais da metade distal das patas traseiras de coloração negra, (SHELDON, 1992; RODRIGUES, 2002) (figura 1).



FIGURA 1 – ESPÉCIME DE LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*) ADULTO, NA ÁREA DE CERRADO, MINAS GERAIS, 2003.

Fonte: Imagem cedida pelo Instituto Pró-Carnívoros.

A área de ocorrência desta espécie são os campos abertos e cerrados da América do Sul, desde o centro-sul do Estado do Maranhão até o Uruguai e do extremo leste do Peru até o Estado do Espírito Santo (PRÓ CARNÍVOROS, 2003) (figura 2).

Os lobos-guarás têm comportamento solitário, formando casais apenas na época da estação reprodutiva. Apresentam características de monogamia facultativa e permanecem com o mesmo par por muito tempo. O casal compartilha a mesma área de vida, porém passam muito pouco tempo juntos. Na natureza, os indivíduos do mesmo casal nunca foram observados descansando juntos e, raramente, caminham ou caçam juntos, confirmando a existência predominantemente solitária da espécie (DIETZ, 1984). O macho, entretanto, participa nas atividades de cuidado parental, embora ainda não se tenha confirmação direta desse comportamento na natureza (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).



FIGURA 2 – MAPA ESQUEMÁTICO DE DISTRIBUIÇÃO DO LOBO-GUARÁ NA AMÉRICA LATINA, CURITIBA, 2007.

Fonte: Imagem retirada de: Plano de manejo: biologia comportamental e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no cerrado de Minas Gerais – MG. Proposta apresentada ao Fundo Nacional do Meio Ambiente – FNMA. 2003 pelo Instituto Pró-Carnívoros.

A espécie é territorialista, as áreas de vida são fixas e em geral não são ocupadas por outros lobos que não o casal. Na maioria dos casos as limitações das áreas são lugares fisicamente identificáveis como rochas ou estradas, sendo a demarcação feita com urina e fezes, de forma geral. Os machos demarcam inicialmente suas áreas e as fêmeas não são, inicialmente, observadas nas áreas dos machos, sugerindo um sistema onde o macho determina sua área antes da formação do casal. Novas adições no território podem ser feitas pelo casal, em períodos de estação reprodutiva (DIETZ, 1984). Tanto pares de machos quanto pares de fêmeas já foram observados em confronto físico direto, demonstrando a natureza territorialista da espécie.

A área de vida de lobos-guarás varia de 25 e 75 km², um tamanho consideravelmente grande e que em conjunto com a natureza territorialista da espécie, não permite densidades populacionais altas (RODRIGUES, 2002).

A espécie é monoéstrica anual, sendo o pico de estação reprodutiva de abril a junho. A gestação é em média de 65 dias, com a maioria dos nascimentos ocorrendo de maio a setembro, durante a estação seca. O número de filhotes varia, na natureza, de dois a quatro filhotes, os quais permanecem na área de vida da mãe durante aproximadamente um ano, quando começam a dispersar. Em animais cativos o desmame completo ocorre ao redor de 15 semanas, os filhotes começam a ingerir sólidos regurgitados pelos pais depois de quatro semanas de idade. A maturidade sexual ocorre por volta de um ano, mas normalmente não se reproduzem até o segundo ano. Em cativeiro os lobos-guarás podem viver até 16 anos, mas informações precisas em situação natural são escassas (RODDEN *et al.*, 1996).

A dieta de lobos-guarás é considerada onívora, sendo constituída basicamente de frutos e pequenos vertebrados, em proporção aproximada de 50% para cada categoria. A proporção dos itens da dieta varia conforme a localidade, assim como as espécies consumidas. A maioria dos estudos indica os frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) como a categoria alimentar mais freqüente. A lobeira é particularmente importante por estar disponível o ano todo, garantindo suprimento de frutos na estação seca (inverno), quando a maioria das outras espécies não está com frutos (RODRIGUES, 2002). Os animais consumidos por lobos-guarás são na maioria de

pequeno a médio porte, como pequenos mamíferos (roedores, lagoformos e marsupiais), répteis, aves, peixes e anfíbios (PRÓ-CARNÍVOROS, 2003).

A ameaça mais significativa para esta espécie é a redução e fragmentação de habitat (SONGSASEN *et al.*, 2006; VELOSO *et al.*, 1998). O lobo-guará habita em especial o bioma do cerrado, um dos mais ameaçados do mundo (MYERS *et al.*, 2000) que nas três últimas décadas teve drástica redução, principalmente pela conversão de áreas naturais em pastos e áreas para cultivo de grãos (SILVEIRA e JÁCOMO, 2003). Atualmente, apenas cerca de 20% da área do cerrado encontra-se preservada, o que torna este bioma um dos mais ameaçados do mundo (RODRIGUES, 2002). Essa diminuição do ambiente natural da espécie e a divisão do habitat remanescente em fragmentos menores e isolados afetam gravemente o lobo-guará, pela sua necessidade de grandes áreas de vida, tornando-se assim uma espécie muito vulnerável ao processo de fragmentação (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

A consequência mais evidente da fragmentação de habitats é o isolamento das populações de vida livre e consequente perda da variabilidade genética das subpopulações isoladas, ocorrendo aumento da taxa de endocruzamento. Ainda que algumas espécies possam conviver com uma baixa taxa de diversidade genética sem grandes problemas, os efeitos da perda de heterozigosidade em algumas populações podem apresentar consequências como a redução da taxa de sobrevivência peri-natal e do sucesso reprodutivo (PRO-CARNÍVOROS, 2003).

Não há informações oficiais do tamanho da população brasileira de lobos-guarás e mesmo estimativas locais são escassas. Estudos na região da Estação Ecológica de Águas Emendadas (DF) estimam que dez indivíduos utilizam uma região de aproximadamente 104 km² (RODRIGUES, 2002).

1.3. Situação atual da espécie

O lobo-guará está listado entre as espécies ameaçadas de extinção no Brasil, na categoria Vulnerável (MMA, 2003). Na classificação da World Conservation Union (IUCN) encontra-se na categoria próximo de ameaçado (NT – “near to threatened”) (IUCN, 2007) e na classificação do Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) está listado no apêndice 2. O apêndice 2 não proíbe o comércio internacional das espécies ali listadas, como ocorre com as espécies listadas no apêndice 1, entretanto esse comércio é estritamente controlado, numa tentativa de impedir que as mesmas possam vir a se tornar ameaçadas de extinção e assim passar ao apêndice 1 (CITES, 2007).

A ameaça mais significativa para lobos-guarás, como citado anteriormente, é a fragmentação de habitat, porém outras fontes de ameaças, como atropelamentos, caça e interação com cães domésticos, também acabam comprometendo, em menor escala, a situação da espécie (RODRIGUES, 2002).

O lobo-guará é encontrado em quase todas as Unidades de Conservação (UC) do bioma do cerrado, mas populações viáveis, considerando no mínimo 500 animais, são estimadas em apenas três UCs: Parque Nacional do Araguaia - TO, Complexo Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba – Estação Ecológica da Serra Geral do Tocantins - PI e Parque Estadual do Mirador – MA. Assim, no momento tem-se certeza de apenas poucas áreas, isoladas, capazes de manter populações viáveis de lobos-guarás (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

1.4. Parque Nacional da Serra da Canastra – MG

O Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) está localizado na região sudoeste do Estado de Minas Gerais - MG (entre 20°00' – 23°00' S e 46°15' - 47°00' W), possuindo área total de 2.000 km², (dos quais apenas 715 km² vêm sendo reconhecidos e manejados como Unidade de Conservação UC) (figura 3). A topografia da região é caracterizada pela presença de duas serras: a Serra da Canastra e a Serra das Sete Voltas, com um vale entre elas – o Vale dos Cândidos. A maior área dentro do

PNSC está localizada sobre a Serra da Canastra, que forma um platô com elevação média de 1.300 m (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

O PNSC foi criado em 1972 e devido à pressão dos fazendeiros locais a área foi determinada em 715 km², apesar do decreto de criação estabelecer 2.000 km² de área protegida. Atualmente o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), através de revisão do plano de manejo, em 2002, tem considerado a possibilidade de integrar os restantes 1.300 km² à área do PNSC (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

O parque situa-se numa região de predomínio do bioma do cerrado e numa área de alto crescimento econômico e desenvolvimento agropecuário. A atividade econômica primária na região é a pecuária leiteira e a atividade agrícola de subsistência, com raras áreas maiores de monocultura de café e de milho. Adicionalmente, grandes áreas de reflorestamento com pinus (*Pinus spp.*) margeiam a área oeste da Serra da Canastra.

Embora a agricultura e a pecuária sejam as principais atividades humanas na região, recentemente a atividade turística aumentou de forma desordenada, tanto dentro quanto fora das limitações do PNSC (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

Desta forma, o PNSC está sujeito à alta pressão antrópica, ou seja, o ecossistema local sofre importantes impactos devido as atividades humanas na região, incluindo o fluxo de moradores e de animais domésticos na região de entorno e a presença de turistas dentro da área do parque (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

O parque apresenta grande diversidade de mamíferos, com aproximadamente 40 espécies, excluindo-se pequenos mamíferos. A fauna de carnívoros é representada por 15 espécies (PAULA, 2002) e o local é considerado um importante santuário para conservação do lobo-guará. Não há informações sobre o tamanho da população local de lobos-guarás e uma estimativa grosseira calcula que cerca de 70 indivíduos podem habitar na área de proteção efetiva do parque (PRÓ CARNÍVOROS, 2003).

UNIDADES DE CONSERVAÇÃO
FEDERAIS DO BRASIL

Parque Nacional da Serra da Canastra

- Localização no Brasil -

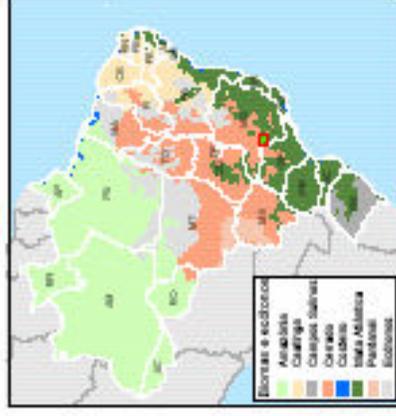
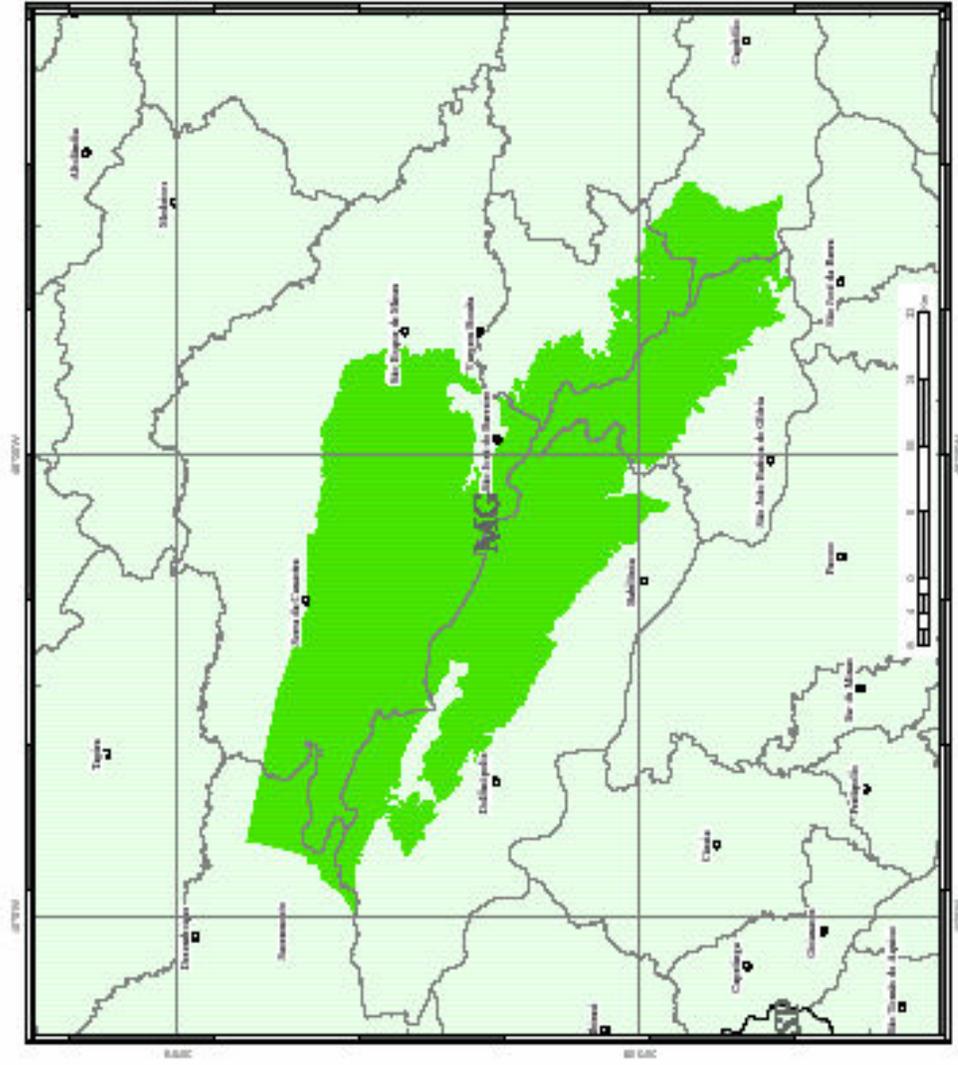


FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS, 2007.
 Fonte: página oficial do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (www.ibama.gov.br).

1.5. Estresse *versus* alostasia

A condição de estresse tem sido, nos últimos anos, amplamente discutida e utilizada para definir o grau de qualidade de vida dos animais, tanto de espécies domésticas como de selvagens. Entretanto, questões importantes como a própria definição de estresse ainda permanecem indefinidas (MOSTL e PALME, 2002).

O termo estresse (do Inglês “stress”) foi usado inicialmente na física para traduzir o grau de deformidade de um material quando submetido a um esforço ou tensão. Hans Selye (1907 – 1982) foi o primeiro pesquisador que utilizou este termo na medicina e biologia, para traduzir o esforço de adaptação do organismo frente a mudanças consideradas ameaçadoras ao seu bem estar ou à sua vida. Desde então, o termo estresse tornou-se popular e, apesar de muitas pesquisas científicas nesta área, desviou-se da sua definição inicial. Atualmente, a palavra estresse tem tantos sentidos que não há um conceito claro sobre o termo (KORTE *et al.*, 2007).

De forma geral, a palavra tem sido associada com eventos negativos e suas conseqüências são conhecidas como “resposta ao estresse”. Uma série de eventos neuro-endócrinos estão envolvidos com esta resposta orgânica. Dentre os hormônios envolvidos, os mais utilizados como indicadores de estresse são os glicocorticóides de origem adrenal (MILLSPAUGH e WASHBURN, 2004). Entretanto, os glicocorticóides são liberados pelo organismo não apenas em resposta ao estresse, mas também em situações de ajustes fisiológicos às diferentes exigências biológicas que ocorrem durante o ciclo de vida, como por exemplo, crescimento, gestação e lactação, alterações estas conhecidas como estados de alostasia (KORTE *et al.*, 2007; LANDYS *et al.*, 2006).

A alostasia é um conceito fisiológico recente que pode ser definido como o processo de aquisição de estabilidade das características internas do corpo (“milieu intérieur”) pela mudança no seu estado fisiológico. A alostasia envolve mecanismos que modificam uma variável fisiológica controlada como, por exemplo, a concentração plasmática de solutos, a partir da previsão de que será necessário um novo patamar para enfrentar futuras condições ambientais ou internas (KORTE *et al.*, 2007). Por exemplo, algumas espécies de anfíbios e répteis acumulam substâncias crioprotetoras para aumentar a osmolaridade de seus fluidos corporais, e assim reduzir o acúmulo de gelo extracelular durante o inverno. Esta situação contradiz o conceito fisiológico de homeostasia, segundo o qual as variáveis internas

críticas do organismo, como concentração plasmática de solutos, devem ser mantidas constantes, oscilando ao redor de um determinado ponto fixo (LANDYS *et al.*, 2006).

As condições ambientais e os diferentes períodos do ciclo de vida dos animais não são estáticos, e, desta forma, os animais devem ajustar seus sistemas internos de acordo com mudanças no ambiente externo ou nas próprias demandas internas. Como as variáveis internas do organismo podem ser modificadas em diferentes níveis, de acordo com os requerimentos das modificações do meio (externo ou interno), o conceito de alostase implica na existência de mais de um estado interno estável (LANDYS *et al.*, 2006; KORTE *et al.*, 2007).

Aparentemente o conceito de alostase não parece diferir do conceito de “aclimatação”, entretanto nos processos de aclimatação, os ajustes fisiológicos ocorrem devido a mudanças no ambiente externo. Enquanto que os processos alostáticos podem ocorrer tanto devido a mudanças externas quanto internas, e, além disso, a alostase habilita o organismo a antecipar a nova resposta fisiológica necessária para futura demanda, por exemplo, migração e hibernação (LANDYS *et al.*, 2006).

Os principais mediadores dos mecanismos de alostasia são os hormônios glicocorticóides, que como dito anteriormente, também são os mediadores da resposta ao estresse. Devido ao fato de os mesmos hormônios estarem envolvidos nesses dois tipos distintos de resposta, com frequência as alterações alostáticas têm sido consideradas em conjunto com fatores estressantes e não têm sido distinguidas das alterações relacionadas às situações imprevisíveis e ameaçadoras, como por exemplo predação, perda de hierarquia social, destruição do habitat (LANDYS *et al.*, 2006).

No presente trabalho o termo estresse, quando utilizado, estará se referindo a eventos considerados ameaçadores ao bem estar ou à vida, ao mesmo tempo que resposta ao estresse referir-se-á aos esforços fisiológicos de adaptação do organismo a estes eventos, conforme definido inicialmente por Hans Selye. Por outro lado, os termos alostasia e/ou resposta alostática serão utilizados quando o intuito for se referir às alterações fisiológicas do organismo ocorridas devido a modificações normais do ciclo de vida.

1.6. Mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse e respostas alostáticas

As glândulas adrenais são órgãos complexos e multifuncionais e que, juntamente com o sistema nervoso autonômico, têm papel-chave nos processos fisiológicos de adaptação a mudanças (YOUNG *et al.*, 2004).

A glândula apresenta duas partes estrutural e funcionalmente bem distintas: o córtex, onde são produzidos e secretados hormônios esteroidais importantes, como glico e mineralocorticóides; e a medula, responsável pela síntese e secreção dos hormônios catecolaminérgicos. Entretanto, células do córtex podem estar presentes na medula, ao mesmo tempo que células medulares podem estar presentes no córtex, permitindo a influência direta de uma região glandular sobre a outra. Essa relação íntima entre o córtex e a medula da adrenal é similar à relação anátomo-funcional entre o sistema nervoso adrenérgico e o eixo hipotálamo–hipófise–adrenal (HHA) (BERNE *et al.*, 2004).

Nos mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse, o estímulo estressor é percebido por diversas áreas do sistema nervoso central, que ativam tanto neurônios adrenérgicos, que secretam adrenalina e noradrenalina; quanto neurônios hipotalâmicos, que secretam os hormônios corticotrófico (CRH) e antidiurético (ADH). A ativação destes neurônios é mutuamente reforçada, pois a noradrenalina aumenta a liberação de CRH, enquanto este, por sua vez, eleva a descarga de noradrenalina (MOSTL e PALME, 2002; BERNE *et al.*, 2004; GUYTON, 2002).

A liberação dos hormônios hipotalâmicos CRH e ADH estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior, o qual, por sua vez, estimula a síntese e secreção de glicocorticóides adrenais, elevando seus níveis plasmáticos. Ao mesmo tempo, o estímulo adrenérgico direto sobre a medula provoca a elevação dos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina. Juntos, os sistemas elevam a produção de glicose e priorizam a utilização deste substrato para o sistema nervoso, disponibilizando outros substratos metabólicos para os demais tecidos (BERNE *et al.*, 2004).

Esta etapa inicial da resposta ao estresse pode ser chamada de reação de alarme, onde todas as respostas corporais entram em estado de prontidão geral, sem envolvimento específico ou exclusivo de um órgão em particular (GUYTON, 2002).

Se o estímulo estressor continua por períodos mais longos, sobrevém uma segunda etapa chamada fase de resistência, que se caracteriza pela hiperatividade da glândula adrenal. A adrenalina e o CRH produzem um estado geral de vigilância, atenção focalizada e ativação de comportamento defensivo e/ou agressivo. O CRH inibe a liberação do hormônio do crescimento e de gonadotropinas, podendo inibir a atividade sexual, ao mesmo tempo que os altos níveis plasmáticos de cortisol podem suprimir a ovulação (BERNE *et al.*, 2004; RIVIER e RIVEST, 1991). Neste estágio, o organismo começa a ajustar-se aos estímulos, e entra num processo de adaptação para poder suportar a condição por mais tempo (FOWLER, 1986).

Caso os estímulos continuem, tornando-se crônicos e repetitivos, as respostas metabólicas adversas, devido à contínua estimulação adrenocortical, tornam-se mais evidentes, podendo ocasionar modificações físicas ou psicológicas como fraqueza, perda de peso, tendências anti-sociais, etc. (FOWLER, 1986). O organismo entra em estado de exaustão, com queda da capacidade adaptativa e falha nos mecanismos de ajuste e redução das reservas de energia.

Esse estado de exaustão está relacionado com a própria regulação do eixo HHA, cuja principal forma de regulação se dá por meio da retroalimentação negativa. A ativação do eixo aumenta a síntese e secreção de glicocorticóides, que por sua vez, inibem a secreção de CRH hipotalâmico e ACTH hipofisário, diminuindo a atividade do eixo. Os efeitos da retroalimentação negativa, pelos glicocorticóides, na liberação de ACTH também podem ser indiretamente moduladas por meio de informações neurais de outras áreas do sistema nervoso central para os neurônios do CRH no hipotálamo. Além disso, os glicocorticóides ativam o gene que codifica o hormônio natriurético atrial (ANH), que também inibe a liberação basal de CRH e ACTH. A própria regulação na tradução, transcrição e exposição dos receptores de glicocorticóides pode ser modulada na exposição a concentrações elevadas destas substâncias (fenômeno de “down regulation”). Os principais tipos de receptores assim modulados são os receptores genômicos de baixa afinidade (BERNE *et al.*, 2004).

Dessa forma, a ação supressiva dos glicocorticóides pode perdurar mesmo após cessar a exposição a estas moléculas. A hipersecreção crônica de glicocorticóides leva a atrofia funcional do eixo HHA e a sua recuperação completa, após a retirada da influencia supressiva, pode levar até um ano, durante esse tempo

a resposta normal da glândula adrenal ao estresse não pode ser assegurada (BERNE *et al.*, 2004).

Com relação aos mecanismos fisiológicos envolvidos nas respostas alostáticas, sabe-se que os glicocorticóides são os mediadores deste tipo de alteração, ainda que os mecanismos exatos destas substâncias sejam até o momento desconhecidos (ROMERO, 2002). Acredita-se que as modificações comportamentais e fisiológicas mediadas pelos glicocorticóides sejam concentração-dependentes, podendo, por meio da oscilação na concentração hormonal, sinalizar para o organismo uma demanda futura. Ainda, seus efeitos podem ser determinados pela ligação a diferentes tipos de receptores (LANDYS *et al.*, 2006). Existem evidências de pelo menos três tipos de receptores para glicocorticóides, dois receptores genômicos já caracterizados, de alta (receptores MR) e baixa afinidade (receptores GR); e um receptor de superfície, também de baixa afinidade, ainda não caracterizado. Estudos *in vitro* sugerem que, em níveis basais, os glicocorticóides ligam-se predominantemente a receptores MR e que a elevação dos níveis basais nas respostas alostáticas faria com que os receptores GR e de superfície também fossem ocupados. Estudos com cortisol radiomarcado mostraram que os receptores de superfície estão localizados em diversas áreas cerebrais, como amígdala, área pré-ótica e hipotálamo (BREUNER e ORCHINIK, 2000). Desta forma, as diferentes ações dos glicocorticóides seriam consequência do tipo de receptor no qual estas substâncias estão ligadas (LANDYS *et al.*, 2006).

1.7. Atividade adrenocortical *versus* função reprodutiva

A função gonadal é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG). Neurônios hipotalâmicos secretam, de forma pulsátil, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que estimula a síntese e liberação de gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), as quais estimulam a síntese e secreção de esteróides gonadais (progestinas, estrógenos e testosterona). Uma série de fatores hormonais e neurais modulam a secreção pulsátil de GnRH, entre eles os glicocorticóides, e, assim, modulam direta ou indiretamente a função reprodutiva do organismo.

A liberação basal de glicocorticóides, como já mencionado, varia de acordo com os estados alostáticos dos diferentes momentos da reprodução, entretanto esse aumento normal associado aos diferentes ciclos de vida não são suficientes para ocasionar, por si só, a modulação negativa do eixo HHG.

Entretanto, nas condições de estresse, a hiperestimulação do eixo HHA pode diminuir a atividade do eixo HHG e a função gonadal pode ser alterada. Como citado anteriormente, concentrações elevadas de CRH inibem a liberação de gonadotropinas, podendo inibir a atividade sexual, ao mesmo tempo em que os altos níveis plasmáticos de glicocorticóides podem modular negativamente a secreção de GnRH, podendo suprimir a ovulação devido a diminuição da síntese e liberação de LH, ocasionando infertilidade temporária, uma das mais importantes alterações ovarianas induzidas pelo estresse (BERNE *et al.*, 2004; RIVIER e RIVEST, 1991).

Na exposição prolongada aos glicocorticóides, os efeitos do estradiol em seus tecidos-alvo são reduzidos, provavelmente em consequência de uma menor concentração de receptores para estradiol (RABIN *et al.*, 1990).

1.8. Dosagem e quantificação de glicocorticóides e seus metabólitos

Como citado anteriormente, as glândulas adrenais têm papel chave nos processos fisiológicos de adaptação às mudanças, principalmente por estarem envolvidas tanto no eixo HHA, quanto no sistema nervoso adrenérgico. Desta forma, a quantificação dos hormônios adrenais pode ser utilizada para avaliar a atividade adrenocortical de indivíduos (YOUNG *et al.*, 2004; MOSTL e PALME, 2002).

A concentração de glicocorticóides, ou de seus metabólitos, pode ser medida em diversos fluidos corporais ou excreções, como sangue, urina, fezes e saliva. Apesar de muito utilizada, a dosagem de glicocorticóides no sangue pode apresentar resultados de difícil interpretação biológica, pois além das variações de glicocorticóides ao longo do dia, devido a ritmicidade de liberação de ACTH (ciclo circadiano), a colheita de sangue, em si, requer confinamento e contenção do animal, condições estas que podem interferir nos resultados por serem potencialmente estressantes (MOSTL e PALME, 2002). Estudos metabólicos com infusão de hormônios radio-marcados em carnívoros indicam que a maior parte dos metabólitos de hormônios esteroidais é excretada nas fezes (TERIO *et al.*, 1999;

VELLOSO *et al.*, 1998), sendo, desta forma, possível utilizar a análise de metabólitos hormonais fecais como uma ferramenta não invasiva para monitoramento da atividade de algumas glândulas endócrinas, como adrenais e gônadas (TOUMA e PALME, 2005).

As técnicas de monitoramento endócrino não invasivo tem sido estabelecidas para um grande número de espécies e têm sido utilizadas para avaliar o bem estar animal (YOUNG *et al.*, 2004). A análise de metabólitos de glicocorticóides, fecais ou urinários, permite o monitoramento da função adrencortical a longo prazo, dispensando procedimentos estressantes na colheita. Além disso, dependendo do tempo de trânsito intestinal e frequência da coleta de amostras, os dados fecais representam a atividade secretora da glândula de forma geral e não apenas episódios isolados ao longo do ritmo circadiano (GRAHAM e BROWN, 1996).

Experimentos não invasivos para dosagem de metabólitos de hormônios esteroidais, principalmente utilizando material fecal, já foram realizados em muitas espécies de carnívoros selvagens como, por exemplo, lobos-guarás (SONGSASEN *et al.*, 2006; VELLOSO *et al.*, 1998); cheetahs – *Acinonyx jubatus* (TERIO *et al.*, 2004), felinos sulamericanos como jaguatirica, gato-maracajá e gato-do-mato-pequeno – *Leopardus pardalis*, *Leopardus wieii*, *Leopardus tigrinus* (MORAIS, 1999); onça pintada e pumas - *Panthera onça*, *Puma concolor* (MORATO *et al.*, 2004; JAVOROUSKI, 2002), lobo cinzento – *Canis lupus* (YOUNG *et al.*, 2004); raposas – *Alopex lagopus* (SANSON *et al.*, 2005), entre outras espécies.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O presente estudo teve como proposta avaliar e comparar a atividade adrenocortical de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) de cativeiro e vida livre, através da quantificação de metabólitos de glicocorticóides fecais, comprovando ou não a possível condição de estresse nos animais cativos.

Objetivos específicos:

- 1) Analisar os perfis individuais de atividade adrenocortical nos animais de cativeiro;
- 2) Verificar possíveis diferenças no perfil da atividade adrenocortical de machos e fêmeas nos diferentes estágios reprodutivos.
- 3) Verificar a existência ou não de padrão sazonal na atividade adrenocortical na população de vida livre.
- 4) Verificar possíveis diferenças na resposta adrenocortical de machos e fêmeas de vida livre frente aos procedimentos de captura.
- 5) Verificar o efeito de diferentes níveis de pressão antrópica na atividade adrenocortical de animais de vida livre.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e coleta de amostras fecais

3.1.1 Animais de cativeiro

Para o presente estudo foram utilizados 13 animais adultos da espécie *Chrysocyon brachyurus*, lobo-guará (7 machos e 6 fêmeas), pertencentes ao acervo dos zoológicos de Americana – SP (casal 1); Ilha Solteira – SP (casal 2) e Criadouro Conservacionista da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração, CBMM - MG (casais 3 a 7, considerando que a fêmea do casal 6 foi colocada com outro macho na estação seguinte para formar o casal 7).

Os animais apresentavam idade entre dois e oito anos no início do experimento e foram mantidos em recintos com área de 512m² (Zoológico de Americana); 540m² (Zoológico de Ilha Solteira) e 2000 – 5000m² (CBMM), cercados com tela de 2,5m de altura, piso de terra e/ou gramado, contendo ainda área de manobra, área de maternidade (Zoológico de Americana), lago e toca (CBMM).

Todos os animais estiveram expostos à visitação pública e o manejo geral foi feito de acordo com a rotina de cada instituição. Os animais foram eventualmente capturados para manejo profilático como desverminação (exceto casal 2) e vacinação (exceto casal 1). O protocolo de desverminação utilizou praziquantel, pamoato de pirantel, febantel (Drontal® Plus; Bayer) no casal 1 e ivermectina injetável nos demais casais, nas doses recomendadas. A vacina utilizada foi Duramune Max 5-CvK/4L Fort Dodge e Antirábica TecPar no casal 2 e Eurican CHPLR nos demais casais.

O protocolo de alimentação utilizada para todos os animais seguiu as orientações do plano de manejo para lobos-guarás (PESSUTTI, 2000), com uma dieta constituída de cerca de 50% de frutas e 50% de proteína de origem animal como ratos de biotério, ração comercial para cães, seca ou em latas e com suplementação vitamínica e mineral.

Os animais de cada casal foram mantidos juntos durante todo o ano, com exceção da fêmea 6, que na estação reprodutiva de 2005, foi colocada com outro macho (macho 7). Todos foram monitorados para coleta de amostras de fezes e observações comportamentais durante as estações reprodutivas (março a junho) dos anos de 2004 e 2005.

A coleta das amostras fecais foi feita uma a três vezes por semana/animal (uma vez por semana para casais que não reproduziram e até três vezes por semana para casais que reproduziram). Na ocorrência de nascimentos, o período de coleta se estendeu até dois meses após o parto.

As amostras foram coletadas nos mesmos dias das observações comportamentais, diretamente do piso do recinto, sendo, a seguir, envasadas em sacos plásticos com fecho hermético e identificadas com: data, identificação do animal (nome e número do studbook) e instituição de origem. Para a identificação das amostras fecais entre os indivíduos do mesmo casal utilizou-se da adição de corante alimentício no alimento fornecido ao macho.

Após a coleta, as amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até o envio, sob refrigeração, para o Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba - PR. Ao chegar no laboratório, as amostras foram novamente congeladas e mantidas a -20°C até o momento da extração e dosagem.

As observações comportamentais seguiram protocolo de etograma estabelecido pela American Zoo and Aquarium Association's Maned Wolf Species Survival Plan (RODDEN e KLEIMAN, 1988). As variáveis observadas foram: o grau de atividade (ativo, inativo, social ou solitário) e eventos sociais como incitamento, marcação de território, comportamento amigável, sexual ou agonístico. Ainda foram registradas a temperatura ambiente e condições climáticas (nublado, chuvoso ou ensolarado). Entretanto, para os objetivos propostos no presente estudo, os dados comportamentais foram considerados apenas de forma qualitativa, ou seja, ocorrência ou não de comportamento sexual, nascimento de filhotes e cuidado parental.

3.1.2 Animais de vida livre

As amostras de fezes da população de vida livre foram provenientes da Unidade de Conservação Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) e regiões de entorno, Estado de Minas Gerais – Brasil.

As coletas foram feitas de maio de 2004 a julho de 2006 por pesquisadores do Instituto para Conservação dos Carnívoros Neotropicais (PRÓ-CARNÍVOROS), estabelecidos na base de pesquisa do Projeto Lobo-Guará, na

cidade de São Roque de Minas - MG. As amostras foram coletadas no período diurno, durante as atividades de campo do projeto, principalmente ao longo da estrada principal do PNSC. A identificação da amostra como sendo proveniente da espécie *Chrysocyon brachyurus* foi feita pela análise do tamanho do bolo fecal, sua coloração típica e presença de sementes de lobeira (*Solanun lycocarpum*).

As amostras foram coletadas diretamente do substrato (estrada, solo, rochas, etc.), envasadas em sacos plásticos com fecho hermético e identificadas com data da coleta e número da localização geográfica do local, pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS). Não foi possível a identificação dos animais e o período de tempo estimado de exposição das amostras ao ambiente foi de, no máximo, um dia. A localização geográfica das amostras fecais foi feita pelo Instituto PRÓ-CARNÍVOROS, com o auxílio do programa ArcView GIS, versão 3.2. (figura 4).

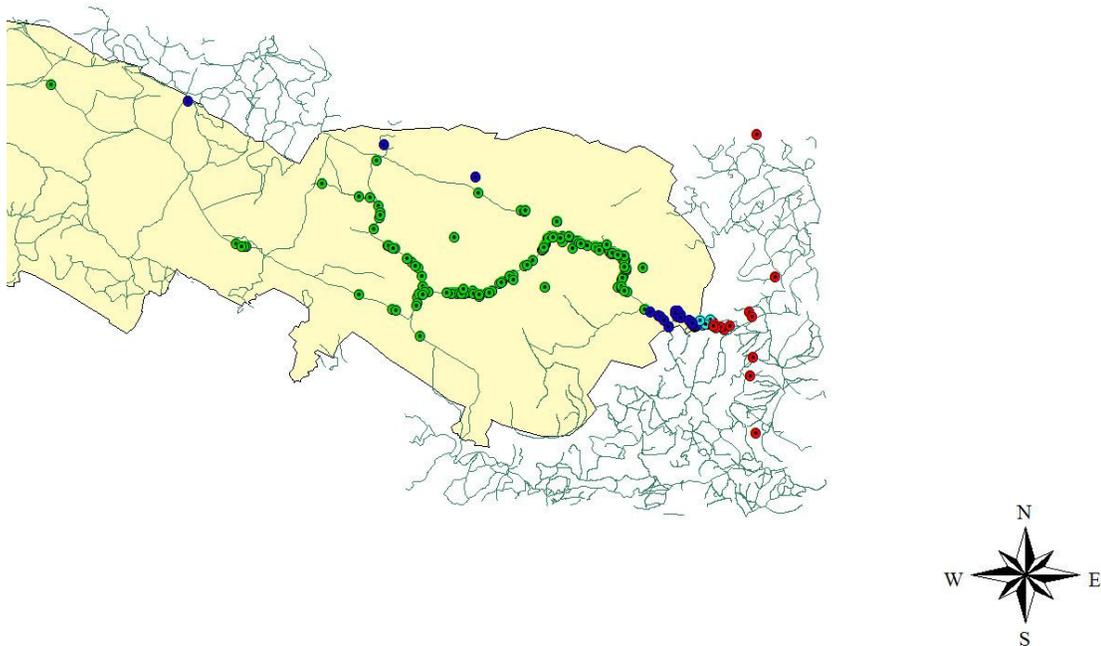


FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE AMOSTRAS FECAIS DE LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE NAS REGIÕES DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DA CANASTRA (PNSC), SÃO ROQUE DE MINAS – MG, 2004 A 2006.

NOTA: * em verde amostras de fezes consideradas provenientes de animais da região interna do PNSC;
* em azul escuro e azul claro amostras de fezes consideradas provenientes de animais da região de entorno do PNSC;
* em vermelho amostras de fezes provenientes de animais da região externa do PNSC.

Como parte dos estudos do Projeto Lobo-Guará, alguns animais foram submetidos aos procedimentos de captura e/ou recaptura e a coleta de amostras fecais, nestas situações, havendo amostra fecal, a mesma era coletada diretamente da armadilha onde o animal ficava preso. O envase e a identificação foram feitos da mesma maneira que para amostras encontradas ao longo da estrada, adicionando-se a identificação dos animais. Os lobos-guarás capturados e/ou recapturados permaneceram presos nas armadilhas por períodos que variavam de 0 a 15 horas e, desta forma, o tempo de exposição das amostras às condições ambientais também teve a mesma variação.

O armazenamento e transporte das amostras de fezes da população de vida livre para o Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Curitiba –PR, foi feita da mesma forma que para as populações de cativeiro.

3.2 Extração e dosagem

Todos os reagentes utilizados no presente estudo, exceto quando especificados, foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, e as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (Sistema Puritech – Permutation, E.J. Krieger & Cia Ltda).

Os procedimentos utilizados para extração dos metabólitos de corticosteróides fecais (MCF) foram feitos conforme descritos por BROWN *et al.* (2004). Resumidamente, a extração consistiu em pesar aproximadamente 0,5 g de fezes úmidas (\pm 0,05 g) em tubo de ensaio de vidro, adicionando-se 4,5 ml de etanol absoluto (99,3%) e 0,5 ml de água destilada. Após essa etapa, para monitorar a eficiência do processo de extração, foram adicionados 100 μ l de solução de ^3H -hidrocortisona (19000 – 25000 cpm; Perkin-Elmer Life Sciences) e, a seguir, os tubos foram tampados e agitados por turbilhamento, com pulsos de 1-2 segundos, durante 30 minutos em agitador de multi pulso (Multi-Pulse Vortexer, modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®). Em seguida, os tubos foram centrifugados (1000 g/15 min) e o extrato sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno (12X75mm) com tampa, devidamente identificado. Uma alíquota de 50 μ l de cada extrato foi combinada com 2 ml de coquetel de cintilação (Ecolume™ liquid scintillation – ICN

Biomedicals) em flaconetes plásticos com tampa, devidamente identificados, agitada manualmente e acondicionada em 4°C até o momento da leitura (leitor de cintilação, Beckman modelo LS380). O restante do extrato foi diluído 1:1 com solução diluidora para enzima imunoenensaio – ELISA (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; pH ajustado para 7,00) e mantidos congelados (-20°C) até o momento da dosagem. Os resultados da leitura de cintilação para cada tubo foram utilizados para o cálculo da eficiência da extração para cada amostra, como percentual em relação à radioatividade adicionada no início do processo de extração.

A dosagem dos MCF foi feita por meio do método de enzima imunoenensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) conforme descritos por BROWN *et al.* (2004). Antes de iniciar os ensaios, foi necessária a validação do método para MCF de lobos-guarás, ou seja, verificar a existência de similaridade imunogênica entre o antígeno utilizado como padrão no ensaio e o antígeno a ser dosado na amostra. O anticorpo utilizado nos imunoenensaios foi produzido contra a forma plasmática (não metabolizada) do cortisol humano e , portanto, a sua capacidade de detectar as formas metabolizadas do hormônio presentes em extratos fecais deve ser investigada para a espécie em estudo (TOUMA e PALME, 2005).

Um dos métodos de validação é o ensaio de paralelismo, o qual verifica a similaridade imunogênica e determina, ao mesmo tempo, qual a diluição mais apropriada das amostras para a dosagem. Para tanto, uma mistura (“pool”) de 240 extratos fecais dos animais de vida livre a serem testadas, foram diluídas 1:1 (extrato: solução de diluição de ELISA) de forma seriada, por doze vezes, até se chegar à diluição final de 1:2048. A curva da concentração em relação ao percentual de ligação, assim obtida, é chamada curva de validação da amostra. Se esta curva for paralela à curva padrão do ensaio isto é interpretado como similaridade imunogênica entre os dois antígenos e o método de dosagem pode ser utilizado. Entretanto, se a curva de validação das amostras não for paralela, não existe similaridade (ou a similaridade é baixa) e o método não pode ser utilizado (BROWN *et al.*, 2004).

Para a realização dos ensaios, microplacas (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp) foram cobertas com 50µl de anticorpo anti-cortisol (Polyclonal R4866; Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) diluído 1:8500 e acondicionada a 4°C, por pelo menos 12 horas.

A curva padrão foi preparada a partir de cortisol na concentração de 20000pg/ml, considerada o padrão mais alto, diluída 1:1 com solução de ensaio de ELISA (NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; NaCl ; BSA; pH ajustado para 7,00) oito vezes até chegar em uma concentração de 78pg/ml, considerada o padrão mais baixo.

O hormônio conjugado cortisol-HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) foi diluído 1:20000 e mantido em 4°C até o momento do ensaio.

A solução do substrato enzimático foi preparada imediatamente antes de sua adição na microplaca e consistia de H_2O_2 a 0,5M; ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; pH ajustado para 4,00).

A microplaca já coberta com anticorpos foi lavada por cinco vezes com solução de lavagem de ELISA (NaCl ; Tween 20) e o excesso de solução foi retirado batendo-se a placa em papel toalha. Após a lavagem foram pipetados 50 μl das soluções dos padrões, em triplicata; 50 μl das soluções dos controles e das amostras, em duplicatas e 50 μl da solução do marcado enzimático cortisol – HRP em todos os poços, exceto nos poços considerados como branco.

A microplaca foi incubada durante uma hora, em temperatura ambiente, sem agitação. Todo o processo de pipetagem levou, em média, 6 minutos, não ultrapassando 10 minutos. Após a incubação, a microplaca foi lavada novamente e foram adicionados 100 μl da solução do substrato enzimático em cada poço, exceto nos poços considerados como branco.

A microplaca foi agitada em agitador Multi-Pulse Vortexer (modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®), sem pulso e em 300 rpm até que os poços considerados como zeros chegassem em densidade óptica (OD) de 1,0, quando era feita a leitura da absorbância em 405 nm, no leitor de microplaca TECAN.

A sensibilidade dos ensaios foi de 78pg/ml. Para determinar o grau de erro associado aos procedimentos técnicos da dosagem calculou-se o coeficiente de variação (CV). O CV intra-ensaio, feito individualmente para cada amostra, e o CV inter-ensaios, utilizando-se dos valores médios das duplicatas das amostras controles, obtidos em cada ensaio.

Os resultados obtidos foram calculados e corrigidos para o índice de eficiência de extração e expressos em ng/g de fezes.

3.3 Análise estatística

Foram calculados os valores médios (\pm Erro Padrão da Média) para os níveis basais de MCF, após a exclusão dos valores que excederem a média ± 2 DP, os quais serão considerados picos (SONGASSASEN *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 1996). O cálculo de nível basal foi feito para cada indivíduo e para cada grupo a ser analisado.

a) Animais de vida livre X animais de cativeiro

Foram calculados as concentrações basais para os grupos animais de vida livre e animais de cativeiro. Para o grupo animais de vida livre foram utilizadas apenas as amostras coletadas dentro do período de estação reprodutiva. A comparação dos grupos foi feita utilizando-se de teste t student não pareado, como os grupos falharam no teste de normalidade, executou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney.

b) Animais de cativeiro

O nível basal foi calculado para cada indivíduo e para cada casal. A comparação das médias dos níveis basais de MFC entre animais do mesmo casal foi feita utilizando-se de teste t student não pareado, como os grupos falharam no teste de normalidade, executou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para comparação das médias dos níveis basais de MCF entre os casais foi utilizado o teste ANOVA de uma via (One Way ANOVA), como os grupos falharam na normalidade foi executado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance, seguido por teste de comparação múltipla de Dunn's (Dunn's Method Multiple Comparison Procedures).

c) Diferentes momentos do estado reprodutivo

Para análise das possíveis diferenças no perfil da resposta adrenocortical nos diferentes estágios reprodutivos, as amostras foram divididas em: antes do nascimento dos filhotes e após o nascimento dos filhotes para os machos; e

gestação e pós-parto para as fêmeas. A análise do período antes da gestação para as fêmeas não foi feita devido à falta de amostras fecais. O cálculo do nível basal foi feito para cada grupo. Utilizou-se de teste t student não pareado, como os grupos falharam no teste de normalidade, foi executado o teste não paramétrico de Mann Whitney.

d) Amostras fecais encontradas dentro das armadilhas de captura X amostras fecais encontradas fora das armadilhas

Foram calculados os níveis basais para cada grupo e a comparação das médias das concentrações basais foi analisada pelo teste t de student, não pareado. Como os grupos falharam no teste de normalidade, foi executado o teste não paramétrico de Mann Whitney.

e) Análise de sazonalidade

Para a análise de sazonalidade, as amostras fecais dos animais de vida livre foram separadas por data nas quatro estações do ano e o cálculo do nível basal foi feito para cada grupo. Foram então comparadas as médias das concentrações basais das estações entre si. Os grupos falharam no teste de normalidade e a análise foi executada utilizando-se do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance, seguido por teste de comparação múltipla de Dunn's (Dunn's Method Multiple Comparison Procedures).

f) Exposição à pressão antrópica

Para as análises de exposição à pressão antrópica as amostras fecais dos animais de vida livre foram organizadas de modo a formar três grupos: 1) amostras encontradas na área interna do PNSC, sendo estas consideradas provenientes de animais menos expostos a pressão antrópica; 2) amostras encontradas na área de entorno do PNSC, sendo estas consideradas provenientes de animais medianamente expostos e 3) amostras encontradas na área externa ao PNSC, sendo estas consideradas provenientes de animais mais expostos. O critério utilizado para definir a região de entorno foi de 2,5 km para dentro e para fora da limitação geográfica do PNSC. O cálculo do nível basal foi feito para cada grupo. A comparação entre as médias foi feita utilizando-se do teste ANOVA de uma via (One

Way ANOVA), como os grupos falharam no teste de normalidade foi executado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance, seguida por teste de comparação múltipla de Dunn's (Dunn's Method Multiple Comparison Procedures).

Todas as análises e gráficos foram feitos utilizando o programa Statistica for Windows, versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Extração e dosagem

Foram extraídas e dosadas para metabólitos de corticosteróides fecais 353 amostras de fezes de lobos-guarás de cativeiro e 267 amostras de animais de vida livre. A eficiência do processo de extração foi monitorada para cada amostra e as médias (\pm EPM) obtidas para esta variável nas amostras de vida livre e cativeiro foram, respectivamente, $85,48 \pm 0,42$ % e $87,46 \pm 0,35$ %, com coeficientes de variação para cada grupo de 7,98 e 7,63%, respectivamente.

O ensaio de validação (paralelismo) demonstrou similaridade imunogênica entre os MCF de lobos-guarás e o cortisol utilizado como padrão (figura 5) e o fator de diluição ideal para as dosagens dos extratos fecais foi determinado como sendo 1:8, já que foi a diluição que mais se aproximou do ponto central da curva padrão (~50% de ligação).

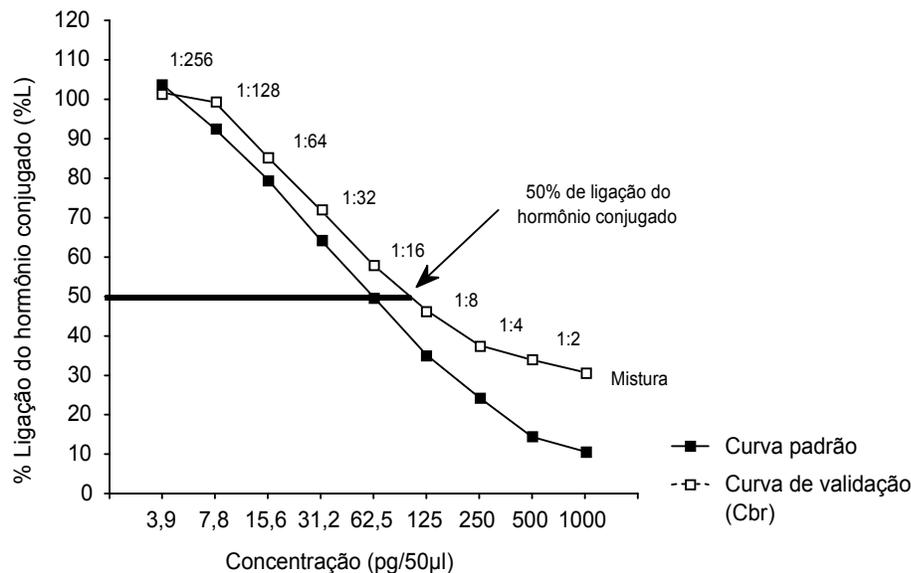


FIGURA 5 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO HORMONAL EM RELAÇÃO AO PERCENTUAL DE LIGAÇÃO (%L) PARA AS CURVAS PADRAO E DE VALIDAÇÃO PARA MCF DE LOBOS-GUARÁS (Cbr), MOSTRANDO PARALELISMO ENTRE ELAS. O PERCENTUAL DE LIGAÇÃO DO HORMÔNIO CONJUGADO (%L) SE REFERE AO PERCENTUAL DE HORMÔNIO CONJUGADO (CORTISOL-HRP) LIGADA AOS ANTICORPOS E É INVERSAMENTE PROPORCIONAL A CONCENTRAÇÃO DO HORMÔNIO A SER QUANTIFICADO. CURITIBA – PR, 2007.

Definida a diluição e considerando-se que os extratos utilizados para fazer a mistura já estavam diluídos 1:1, a diluição final de todos os extratos foi de 1:16. Extratos com concentração acima ou abaixo dos valores limites da curva padrão foram dosados novamente em diferentes diluições, as quais variaram desde 1:1 até 1:32.

Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaios foram de 2,75% e 15,87%, respectivamente.

4.2 Metabólitos de corticosteróides fecais (MCF)

4.2.1 Animais de vida livre x animais de cativeiro

Foram comparados os valores basais de MCF entre os animais de vida livre (n=141) e os animais de cativeiro (n=320). As médias basais (\pm EPM) de MCF (ng/g de fezes) encontradas, respectivamente, para os dois grupos foram de $54,56 \pm 3,54$ e $95,66 \pm 3,70$. Houve diferença ($p < 0,001$) entre os grupos analisados, com os animais de cativeiro apresentando maiores níveis basais de MCF que os animais de vida livre (figura 6).

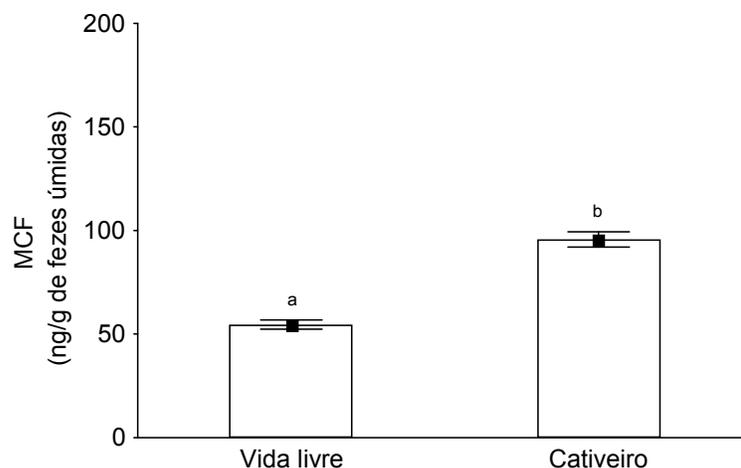


FIGURA 6 – CONCENTRAÇÕES BASAIS DE METABÓLITOS DE CORTICOSTERÓIDES FCAIS (ng/g de fezes; MÉDIA \pm EPM) EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE E CATIVEIRO, DURANTE OS PERÍODOS DE ESTAÇÃO REPRODUTIVA DE 2004 A 2006. CURITIBA – PR, 2007. NOTA: a,b – diferenças entre os grupos ($p < 0,001$).

4.2.2. Animais de cativeiro

Para facilitar a visualização dos dados, os mesmos estão apresentados na ordem: casais que não se reproduziram e casais que se reproduziram.

Os resultados das análises de comportamento sexual (observação de monta e/ou tentativa de monta), número de filhotes nascidos, ocorrência de cuidados parentais, taxa de mortalidade e causas da morte de filhotes estão resumidos na tabela 1. A ausência de comportamento sexual não significa que os animais não apresentaram este tipo de comportamento fora dos períodos de observação.

TABELA 1 – OBSERVAÇÃO DE COMPORTAMENTO SEXUAL (monta = M; tentativa de monta = TM), NÚMERO DE FILHOTES NASCIDOS, CUIDADO PARENTAL, TAXA DE MORTALIDADE (%) E CAUSAS DE MORTE EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO. CURITIBA – PR, 2007.

		Comp. sexual		Nº filhotes	Cuidado parental	Mortalidade (%)	Causa da morte
		M	TM				
Casal 1	Macho 1	-	-	0	-	-	-
	Fêmea 1						
Casal 2	Macho 2	-	-	0	-	-	-
	Fêmea 2						
Casal 3	Macho 3	-	-	0	-	-	-
	Fêmea 3						
Casal 5	Macho 5	-	-	0	-	-	-
	Fêmea 5						
Casal 4	Macho 4	-	-	3	sim ¹	33	pais
	Fêmea 4						
Casal 6	Macho 6	sim	sim	1	sim	100	desconhecida
	Fêmea 6						
Casal 7	Macho 7	sim	sim	2	sim	50	desconhecida
	Fêmea 6						

¹o casal matou um dos filhotes, entretanto apresentou cuidados parentais com os outros dois filhotes.

Foram comparadas as médias das concentrações basais de MCF entre os animais do mesmo casal e as médias dos casais entre si. Os valores médios (\pm EPM) das concentrações basais de MCF (ng/g de fezes) individuais e por casal são apresentados na tabela 2 e figuras 7 e 8. O valor do coeficiente de variação total observado nas amostras individuais e por casal estão apresentadas na tabela 2.

Os perfis individuais nas concentrações diárias de MCF (ng/g de fezes) para todos os casais estão apresentados nas figuras 9 e 10.

TABELA 2 – MÉDIAS (\pm EPM) DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) INDIVIDUAIS E POR CASAL E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE VARIAÇÃO TOTAL INDIVIDUAL E POR CASAL EM LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO. CURITIBA – PR, 2007.

		Média individual ⁽¹⁾	CV ⁽²⁾ (%)	Média por casal ⁽³⁾	CV (%)
Casal 1	Macho 1	121,47 \pm 25,06	104,30	66,93 \pm 8,16 ^a	105,82
	Fêmea 1	63,78 \pm 10,17	108,87		
Casal 2	Macho 2	90,78 \pm 10,44 *	95,24	59,57 \pm 5,22 ^a	116,34
	Fêmea 2	53,65 \pm 6,89	54,51		
Casal 3	Macho 3	85,70 \pm 8,85 *	92,96	149,93 \pm 15,05 ^{bc}	67,66
	Fêmea 3	212,29 \pm 21,58	45,00		
Casal 5	Macho 5	166,33 \pm 18,97 *	63,98	265,86 \pm 25,49 ^c	74,84
	Fêmea 5	337,05 \pm 29,97	66,90		
Casal 4	Macho 4	72,72 \pm 8,28 *	107,18	90,93 \pm 8,91 ^a	93,71
	Fêmea 4	162,71 \pm 20,23	83,64		
Casal 6	Macho 6	154,75 \pm 17,21	100,32	160,83 \pm 10,17 ^{bc}	89,08
	Fêmea 6	161,08 \pm 11,79	82,13		
Casal 7	Macho 7	125,84 \pm 13,45	79,43	105,47 \pm 8,38 ^{ab}	83,58
	Fêmea 6	176,85 \pm 21,07	85,47		

¹ os asteriscos indicam diferença entre o macho e a fêmea de cada casal ($p < 0,05$).

² o coeficiente de variação foi calculado utilizando todos os valores (basais e de pico) de MCF.

³ letras diferentes indicam diferenças entre os casais ($p < 0,05$).

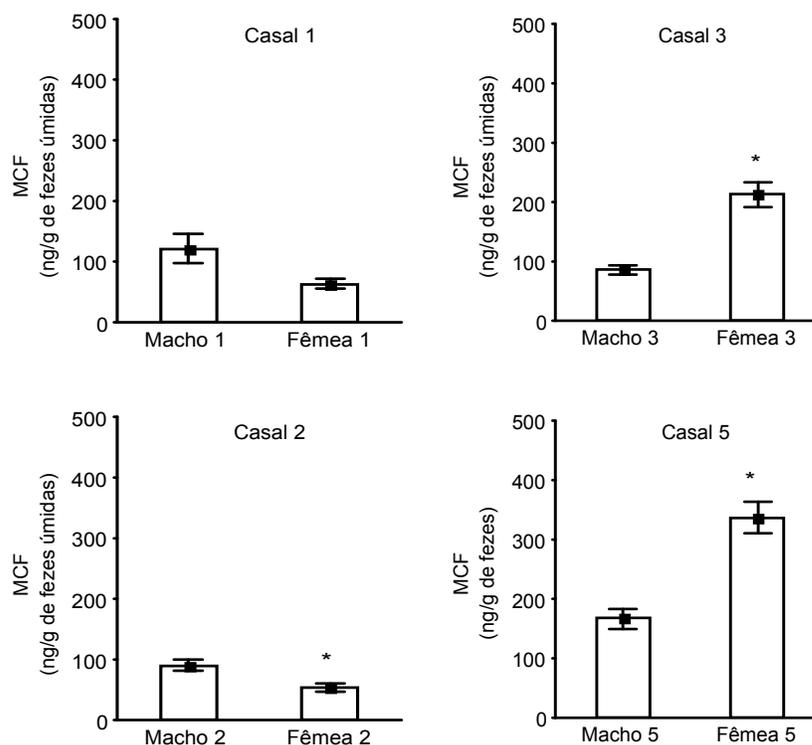


FIGURA 7 – CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS \pm EPM) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO QUE NÃO SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.

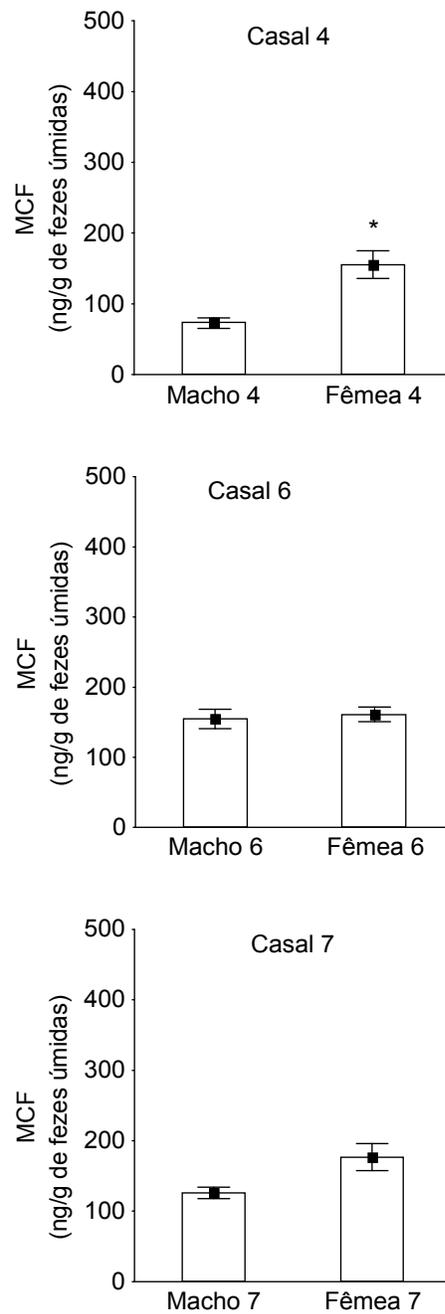


FIGURA 8 – CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS ± EPM) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS DE CATIVEIRO QUE SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.

■ Machos
 ▲ Fêmeas

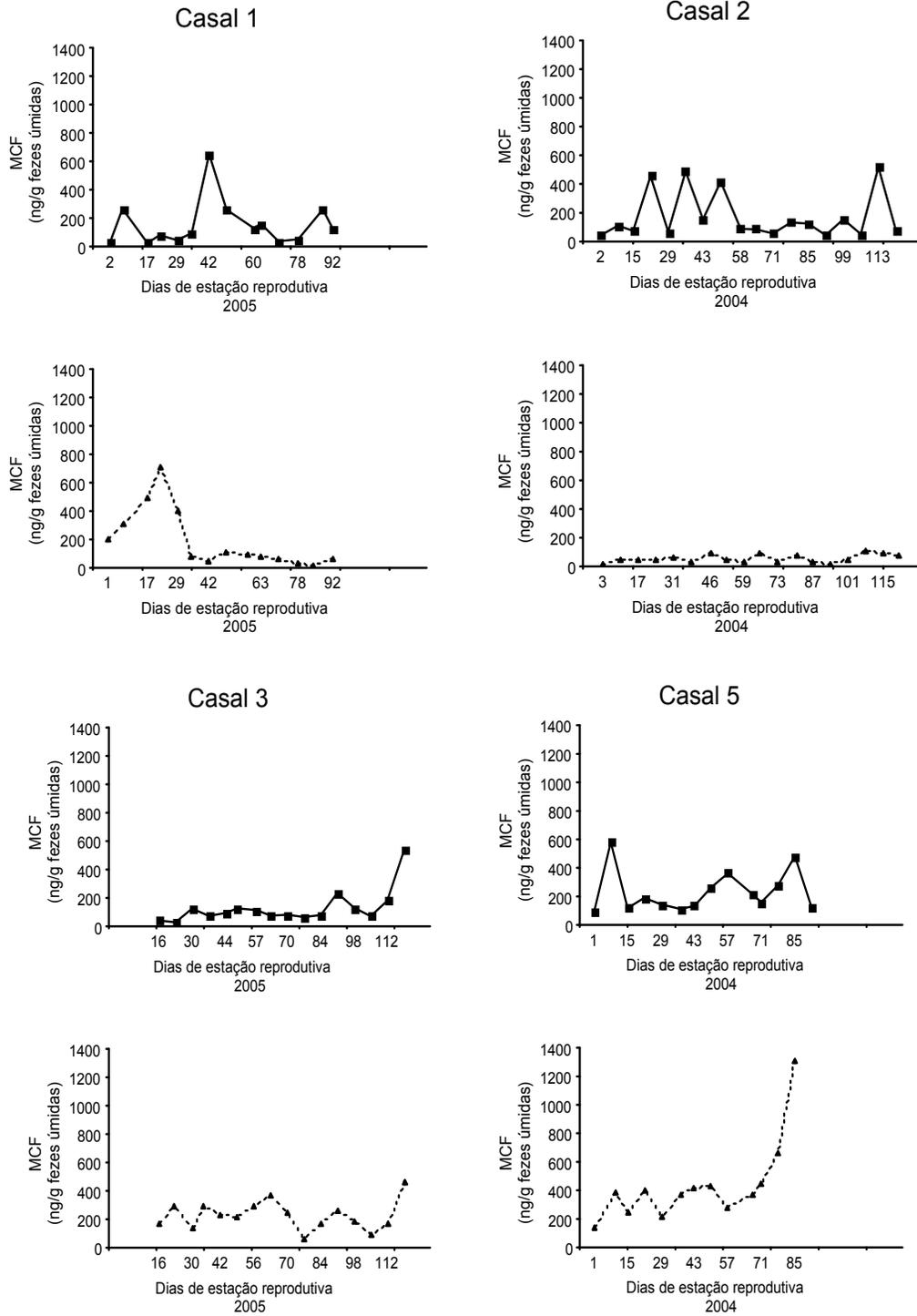


FIGURA 9 – PERFIS DE MCF (ng/g de fezes) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS QUE NÃO SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.

■ Machos
 ▲ Fêmeas

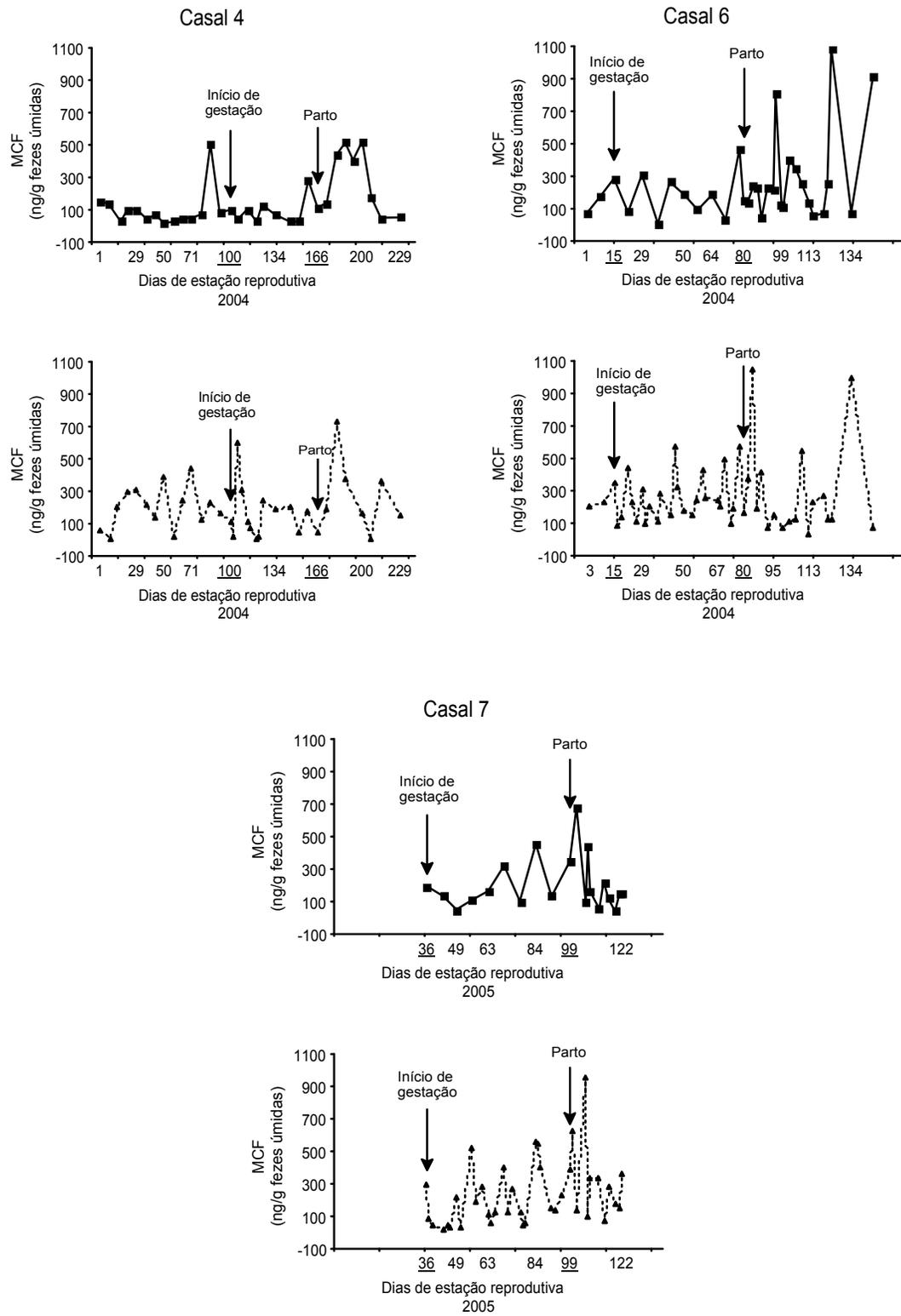


FIGURA 10 – PERFIS DE MCF (ng/g de fezes) EM CASAIS DE LOBOS-GUARÁS QUE SE REPRODUZIRAM. CURITIBA – PR, 2007.

As comparações das médias das concentrações basais de MCF em relação aos diferentes momentos do ciclo reprodutivo, para machos e para fêmeas, estão apresentadas na tabela 3. Houve diferenças ($p=0,002$) entre os períodos antes do nascimento dos filhotes e pós nascimento dos filhotes para os machos. Não foram observadas diferenças ($p=0,057$) entre os períodos de gestação e pós parto para as fêmeas.

TABELA 3 – MÉDIA (\pm EPM) DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) EM MACHOS E FÊMEAS DE LOBOS-GUARÁS DE CASAIS DE CATIVEIRO QUE SE REPRODUZIRAM, NOS PERÍODOS GESTACIONAL (G), ANTES DO PARTO (AP) E PÓS PARTO (PP). CURITIBA – PR, 2007.

	MCF (ng/g de fezes)		
	G	AP	PP
Machos	-	88,21 \pm 8,98 ^a	138,13 \pm 13,19 ^b
Fêmeas	149,95 \pm 12,44 ^A	-	194,26 \pm 21,25 ^A

a,b – diferenças entre os grupos ($p=0,002$).

4.2.3. Animais de vida livre

Os valores médios basais encontrados para as concentrações de MCF nos animais de vida livre, nas análises de sazonalidade e de pressão antrópica, estão resumidos na tabela 4. Como não foram observadas diferenças ($p=0,283$) nas concentrações basais de MCF entre as amostras coletadas dentro das armadilhas de captura ($n=71$; n machos=37; n fêmeas=34) e fora das armadilhas ($n=196$), os dados foram agrupados.

As análises por estação do ano mostraram diferenças sazonais ($p<0,001$), sendo que o maior valor médio de concentração basal foi encontrado na primavera, porém não diferindo da estação de outono. Já o verão apresentou o menor valor médio, diferindo apenas da primavera (figura 11).

TABELA 4 – MÉDIAS (\pm EPM) DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE POR ESTAÇÕES DO ANO E NOS DIFERENTES NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO A PRESSÃO ANTRÓPICA. CURITIBA – PR, 2007.

		Média
Estações	Verão (n=52)	43,04 \pm 5,75 ^a
	Outono (n=102)	55,44 \pm 3,98 ^a
	Inverno (n=81)	64,00 \pm 5,71 ^{ab}
	Primavera (n=32)	96,45 \pm 11,26 ^b
Localização	Área interna (n=186)	51,14 \pm 2,80 ^A
	Área de entorno (n=54)	114,91 \pm 11,70 ^B
	Área externa (n=27)	153,69 \pm 22,27 ^B

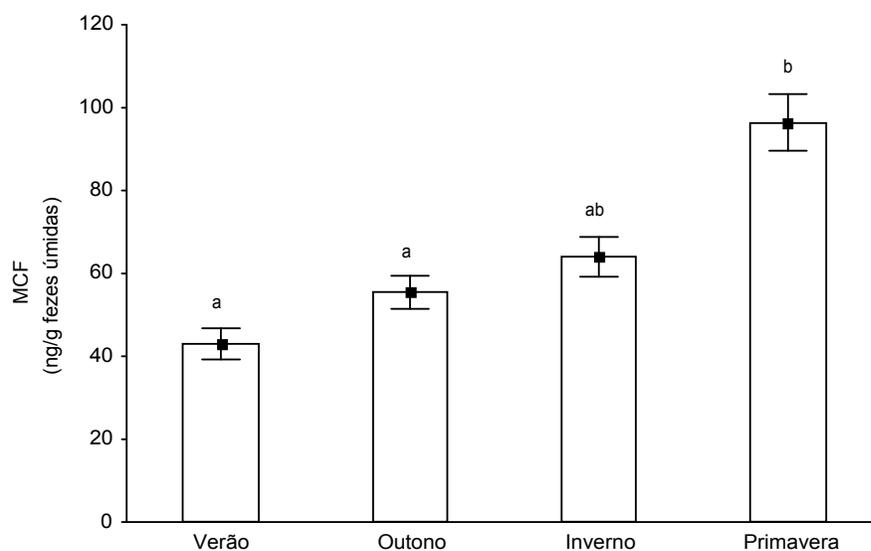


FIGURA 11 – CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS \pm EPM) AO LONGO DO ANO EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE. CURITIBA – PR, 2007.
NOTA: a,b - diferenças significativas ($p < 0,001$)

Nas análises de exposição à pressão antrópica foram observadas diferenças ($p < 0,001$) nas médias das concentrações basais de MCF entre os grupos das áreas interna e externa ao PNSC. O grupo da área de entorno não apresentou diferenças quando comparado com o grupo da área externa, mas apresentou diferenças ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo da área interna (figura 12).

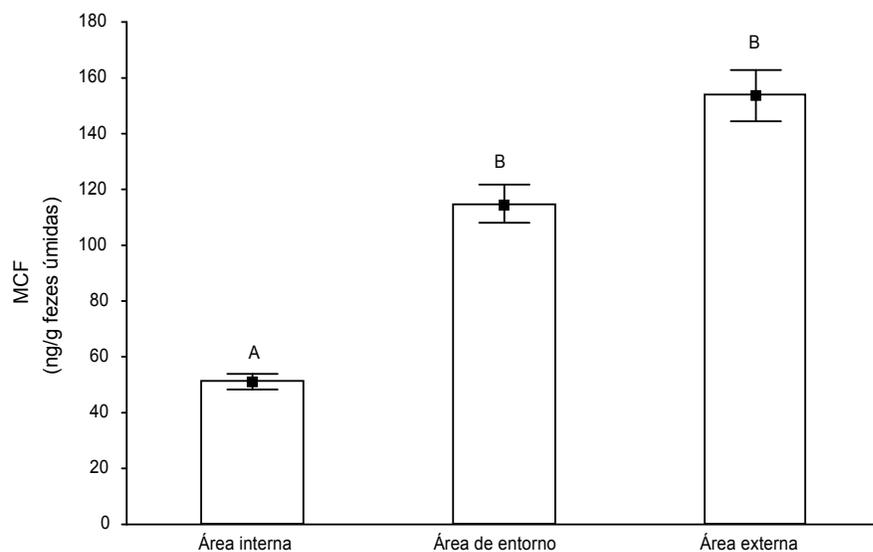


FIGURA 12 – CONCENTRAÇÕES BASAIS DE MCF (ng/g de fezes) (MÉDIAS ± EPM) EM LOBOS-GUARÁS DE VIDA LIVRE, EXPOSTOS À PRESSÃO ANTRÓPICA. CURITIBA – PR, 2007. NOTA: a,b – diferenças significativas ($p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Animais de vida livre x animais de cativeiro

A comparação das médias das concentrações basais de MCF entre os animais de cativeiro e vida livre mostrou que, durante o período de estação reprodutiva, lobos-guarás cativos apresentam maiores concentrações basais que lobos-guarás de vida livre, evidenciando assim maior atividade adrenocortical nos animais de cativeiro. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com guepardos (*Acinonyx jubatus*), onde também observou-se nos animais cativos maior concentração basal de corticóides fecais (TERIO *et al.*, 2004). Estudos com outras espécies selvagens, como por exemplo, rinocerontes pretos (*Diceros bicornis*), também mostram que animais cativos apresentam elevações persistentes nas concentrações de glicocorticóides (MUNSON *et al.*, 1998).

Como citado anteriormente (ver Introdução), lobos-guarás são canídeos solitários, territorialistas, que se unem em casais no período de estação reprodutiva e que necessitam de grandes áreas de vida (RODRIGUES, 2002; DIETZ, 1984), condições estas que não ocorrem no cativeiro. De forma geral, os lobos-guarás são mantidos em grupos de dois ou mais animais, geralmente em casais, durante o ano todo, sendo que a formação dos grupos é imposta e os animais são obrigados a viver em reduzida e confinada área de vida. O manual de manejo do lobo-guará, produzido pelo programa do Plano de Sobrevivência do Lobo-Guará (Maned Wolf Species Survival Plan – MWSSP) em 1987 e revisado em 1995, recomenda uma área mínima para recintos abertos de 1.012m² (1/4 de acre), que possua, a disposição dos animais, locais fechados para esconderijo e toca (FLETCHALL *et al.*, 1995). Considerando que a mínima área de vida livre reportada para lobos-guarás foi de 25km² (DIETZ, 1984; RODRIGUES, 2002), este espaço de recinto recomendado representa, aproximadamente, 4% da área de vida natural desta espécie.

Outro fator importante a ser observado é o fato de que os lobos-guarás são muito sensíveis à aproximação humana tendo, como reação natural, a procura de possíveis esconderijos e a fuga (DIETZ, 1984; VELLOSO *et al.*, 1998). Todos os casais de lobos-guarás participantes estiveram expostos à visita pública. Em vida livre, a resposta de lobos à aproximação humana (de 2 a 3 metros), inclui

arqueamento dorsal, pilo-ereção, vocalização e tentativa de fuga (DIETZ, 1984), sugerindo respostas neuro-endócrinas clássicas ao estresse. Guepardos mantidos em cativeiro, porém não expostos ao público, apresentam uma tendência a produzir menores concentrações basais de corticóides fecais quando comparados com indivíduos expostos à visitação (TERIO *et al.*, 2004). Desta forma, os animais cativos enfrentam diferentes situações e condições, das quais eles não têm controle e não podem escapar, sendo possivelmente estes alguns dos fatores de impacto para o aumento na concentração basal de MCF nas populações cativas de lobos-guarás.

5.2 Animais de cativeiro

O presente estudo analisou sete casais de lobos-guarás cativos, sendo que apenas três tiveram filhotes. Apesar de ter ocorrido nascimentos, esses casais não podem ser classificados como casais com sucesso reprodutivo, pois os resultados observados para taxa de mortalidade de filhotes e causa da morte dos filhotes são muito similares aos reportados na literatura e que caracterizam baixa eficiência reprodutiva da espécie (SONGSASEN *et al.*, 2006). Além disso, o número médio de filhotes por ninhada observado no presente estudo - dois filhotes - ficou abaixo da média reportada pelo International Studbook for Maned Wolves (ISMW) e da média encontrada em vida livre - três filhotes por ninhada (MAIA e GOUVEIA, 2002; DIETZ, 1984).

A taxa de mortalidade média observada foi de 50%, sendo que duas causas de morte dos filhotes foram reportadas como desconhecidas e uma como o filhote tendo sido morto pelos pais, ainda que o mesmo casal tenha apresentado cuidados parentais com outros dois filhotes da mesma ninhada. Segundo os registros do ISMW a causa primária da mortalidade dos filhotes também tem sido reportada como “desconhecida”, entretanto, acredita-se que a incompetência parental possa ser a causa real, principalmente nos primeiros 30 dias de vida do filhote (MAIA e GOUVEIA, 2002). Esses achados confirmam o fato das populações cativas de lobos-guarás não serem “auto-sustentáveis” (SONGSASEN *et al.*, 2006; PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

Muito autores sugerem que a falta de privacidade dos animais, presença de visitantes, técnicos e tratadores podem prejudicar as tentativas da mãe de mover os

filhotes para locais mais seguros, levando-a a negligenciar ou até mesmo matar seus filhotes (MAIA e GOUVEIA, 2002). Os efeitos das condições de estresse e da liberação dos hormônios do eixo HHA no comportamento parental ainda não são bem compreendidos. Estudos em mamíferos mostram que fêmeas expostas a condições estressantes podem tanto inibir quanto aumentar seu “nível” de comportamento maternal (BALES *et al.*, 2006). Em fêmeas de gorilas cativas, altos níveis de cortisol plasmático no pós parto estão associados a baixas taxas de comportamento maternal (BAHR *et al.*, 1998).

5.2.1 Perfis da concentração de MCF individual e por casal

As análises das concentrações de MCF mostram grande variabilidade nos perfis individuais. Outros estudos de monitoramento da atividade adrenocortical de diversas espécies, tanto por métodos não invasivos quanto por dosagem plasmática, também mostram variações consideráveis entre os indivíduos (MAGEE *et al.*, 2006; TERIO *et al.*, 2004; JAVOROUSKI, 2003). Essa variação pode estar associada tanto a fatores biológicos como sexo, idade, condição corporal, estado reprodutivo e dieta, como a fatores ambientais e mesmo a possíveis artefatos da técnica de monitoramento (MILLSPAUGH e WASHBURN, 2004).

A exposição da amostra fecal à fatores ambientais como chuva e calor excessivo pode afetar as concentrações de MCF nas amostras fecais. Em condições controladas, amostras fecais de cervos da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) expostas à simulação de chuva tiveram suas concentrações de MCF aumentadas em relação às amostras fecais não expostas. A exposição do material fecal a chuvas, em temperatura ambiente, proveria um meio de cultivo para o desenvolvimento de agentes microbianos, que poderiam ter convertido bioquimicamente glicocorticóides fecais em metabólitos com relativa afinidade ao anticorpo utilizado na técnica de dosagem (radioimunoensaio de duplo anticorpo, anti-corticosterona). Outros processos bioquímicos, como a clivagem não microbiológica de grupos laterais conjugados na molécula de glicocorticóide ou a liberação de metabólitos de glicocorticóides fecais de micelas lipídicas poderiam também ter contribuído para o aumento nas concentrações de MCF nestas amostras fecais (WASHBURN e MILLSPAUGH, 2003). Por outro lado, a exposição a chuvas

em ambientes não controlados poderia promover a “lavagem” das amostras e desta forma reduzir as concentrações de MCF.

Estudos em guepardos demonstraram que amostras fecais expostas ao calor excessivo apresentam concentrações de MCF mais baixas em relação à amostras não expostas ao calor. Os autores sugerem ser possível a ocorrência de modificações bioquímicas nas regiões imunoreativas das moléculas de MCF ou a própria degradação destes esteróides pela ação do calor (TERIO *et al.*, 2002). Contudo, a exposição ao calor excessivo poderia, por outro lado, desidratar as amostras fecais, concentrando seus componentes e aumentando assim a concentração de MCF.

Outro fator que pode interferir nas concentrações de MCF de uma amostra fecal é a distribuição destas substâncias na massa fecal. Estudos da distribuição de metabólitos de outros esteróides, como progestinas e estrógenos, na massa fecal de guepardo, leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*), leopardo das neves (*Panthera uncia*) e elefante africano (*Loxodonta africana*) indicaram que estas substâncias não estão distribuídas de forma uniforme no bolo fecal, sendo que a porção interna da massa fecal possui concentrações menores que a porção externa. Análises sobre a distribuição de metabólitos de glicocorticóides foram feitas para amostras fecais de cervos da cauda branca, onde foi reportado diferenças nas concentrações de MCF entre subamostras da mesma massa fecal. Desta forma, recomenda-se que as amostras sejam coletadas o mais frescas possível, homogeneizadas e então liofilizadas para posterior pesagem da subamostra (MILLSPAUGH e WASHBURN, 2003). No presente estudo, o tempo de exposição das amostras ao ambiente, para os animais de cativeiro, não foi superior a 24 horas, entretanto não se têm informações sobre o período de tempo médio de exposição ambiental destas amostras, além disso trabalhou-se com amostras fecais úmidas, entretanto antes da pesagem, cada amostra fecal foi devidamente homogeneizada.

Na comparação das concentrações basais de MCF entre os animais do mesmo casal, foram observadas diferenças entre o macho e a fêmea em três casais que não se reproduziram e em um casal que se reproduziu. Essas diferenças observadas indicam que um dos animais do casal possui maior resposta adrenocortical frente às mesmas condições de cativeiro e talvez este fato possa ter influenciado na reprodução dos animais. O único casal, dentre os que se

reproduziram, que apresentou estas diferenças foi o mesmo que matou um dos filhotes da ninhada. Outro fator que poderia estar influenciando esta diferença seria o fato dos pares terem sido formados por imposição e não por escolha dos próprios indivíduos. Em vida livre os animais se escolhem para formação do casal e formam pares monogâmicos facultativos, algumas vezes por mais de uma estação reprodutiva (DIETZ, 1984). Concentrações diferentes de MCF nos animais do mesmo casal podem sugerir que um dos animais não aceita o outro como par.

Observando-se os valores individuais nas concentrações basais de MCF, verifica-se que os casais que não reproduziram possuem maior variação nestes valores, quando comparados com os casais que se reproduziram. Duas fêmeas que não reproduziram, fêmeas 3 e 5, têm valores basais médios mais altos do que fêmeas que gestaram e pariram, indicando, nestes dois animais, possivelmente maior estresse nas condições de cativeiro. Por outro lado, outras duas fêmeas que não reproduziram, fêmeas 1 e 2, têm seus valores basais muito similares aos encontrados para indivíduos de vida livre. Uma destas fêmeas (fêmea 2) apresentou durante toda a estação reprodutiva baixas concentrações de MCF, não apresentando nenhum episódio de pico. Aparentemente, poder-se-ia dizer que para este animal as condições de cativeiro não são estressantes, entretanto poderia estar ocorrendo justamente o contrário. Esta fêmea poderia estar em condições de estresse crônico de cativeiro há muito tempo e, portanto, o próprio sistema de regulação do eixo HHA poderia suprimir a liberação de glicocorticóides. Como citado anteriormente (ver Introdução), a liberação de glicocorticóides regula, por meio de retroalimentação negativa, o eixo HHA, tanto direta quanto indiretamente, reduzindo a síntese e liberação de CRH e ACTH. Além disso, modulam também seus próprios receptores, reduzindo a sensibilidade celular as suas ações. Assim, os efeitos da retroalimentação negativa dos glicocorticóides, na condição de estresse crônico, levariam a atrofia funcional do eixo HHA (BERNE *et al.*, 2004; GUYTON, 2002).

Comparando as concentrações basais médias de MCF entre os casais, observou-se que o casal 5 (não reproduziu) apresentou o maior valor, entretanto não difere dos valores encontrados para os casais 3 (não reproduziu) e 6 (reproduziu). O menor valor foi encontrado para o casal 2 (não reproduziu) e não difere dos valores encontrados para os casais 1 (não reproduziu), 4 e 7 (reproduziram). Desta forma

não é possível fazer nenhuma relação direta entre concentrações basais de MCF e reprodução.

Talvez a comparação das concentrações basais de MCF entre os animais e/ou casais no momento próximo a cópula indique alguma ligação entre níveis de MCF e sucesso ou insucesso reprodutivo. Entretanto, a determinação deste momento nos casais que não reproduziram é mais difícil de se prever. Análises futuras de metabólitos esteroidais sexuais das mesmas amostras serão de fundamental importância para aprofundar estas análises, indicando se os animais que não se reproduziram ciclaram ou não e quando foi a provável data da cópula.

As análises comportamentais utilizadas para o presente estudo não indicam precisamente se os animais dos casais que não reproduziram apresentaram ou não cópula, pois, como citado anteriormente, a não observação do comportamento não exclui a possibilidade de o mesmo ter ocorrido em outros momentos onde não estava ocorrendo a observação comportamental, feita no período da manhã. Isto é provável, já que os lobos-guarás são uma espécie de hábitos crepusculares, concentrando suas atividades no período das 18 às 6 horas (DIETZ, 1984).

5.2.2 Resposta adrenocortical nos diferentes momentos reprodutivos

Para verificar o perfil da resposta adrenocortical nos diferentes momentos do estágio reprodutivo foram comparadas às médias das concentrações basais de MCF entre os períodos pré e pós nascimento de filhotes para os machos, e gestação e pós-parto para as fêmeas. Para os machos, os valores no período pós-natal foram maiores que no pré-natal, indicando aumento da resposta adrenocortical dos mesmos após o nascimento dos filhotes. Na comparação entre gestação e pós-parto nas fêmeas não foi observado diferença, entretanto há uma tendência ($p=0,059$) das concentrações basais de MCF no período pós-parto serem maiores que no de gestação.

O resultado obtido para as fêmeas pode ser explicado devido ao fato de os períodos de gestação e lactação (pós-parto) apresentarem demandas metabólicas muito similares, principalmente depois da segunda metade da gestação, provocando adaptações de caráter alostático nas mesmas. A gestação induz uma série de alterações hormonais e com o aumento da carga metabólica imposta à fêmea prenhe, quase todas as glândulas endócrinas do corpo têm sua atividade

aumentada. Na segunda metade da gestação, os níveis de glicocorticóides plasmáticos elevam-se, principalmente pela estimulação do CRH placentário e, em conjunto com outros hormônios, ajudam a mobilizar substratos energéticos dos tecidos maternos para serem utilizados pelos fetos. Além disso, os glicocorticóides têm papel fundamental no desenvolvimento e amadurecimento das glândulas mamárias (BERNE *et al.*, 2004; GUYTON, 2002).

Após o parto, a fêmea entra em fase de lactação, onde sua demanda metabólica deve aumentar ainda mais. Aminoácidos, glicose e ácidos graxos são mobilizados, tanto da dieta quanto dos tecidos corporais maternos, para a produção de leite nas glândulas mamárias. Assim, o organismo materno modifica seu estado alostático para que ocorra adequada produção de leite. Os glicocorticóides nesta fase não apenas mobilizam as reservas energéticas da mãe, mas provavelmente atuam em áreas do sistema nervoso central para, em conjunto com outros hormônios como a prolactina, desencadear comportamentos de cuidado parental (KORTE *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2006; SOCKMAN *et al.*, 2004).

Com relação ao resultado obtido para os machos, o aumento na média das concentrações basais de MCF após o nascimento dos filhotes pode estar associado a real participação do macho no auxílio aos cuidados com os filhotes. Embora não exista confirmação direta de que machos de lobos-guarás na natureza apresentem comportamento de cuidado parental, já foram observados, em cativeiro, machos freqüentemente regurgitando alimento aos filhotes e apresentando cuidado parental. Em vida livre foram observados filhotes acompanhados por dois lobos-guarás adultos e em outra ocasião uma fêmea com filhotes foi vista, várias vezes, acompanhada por um macho (RODRIGUES, 2002; DIETZ, 1984).

Estudos com aves e peixes mostram que ocorre aumento nas concentrações de glicocorticóides no macho durante os estágios iniciais de cuidado parental, em ambos os casos cuidados com os ovos. Além disso, especula-se que esse aumento nos níveis de glicocorticóides plasmáticos possa, assim como possivelmente aconteça com a fêmea, modular no sistema nervoso central a transição de comportamento sexual para comportamento parental no macho (MAGEE *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2006).

Desta forma, após o nascimento dos filhotes, os pais enfrentam diferentes condições fisiológicas e comportamentais devido ao cuidado que deve ser

dispensado aos filhotes. Os animais têm reduzido tempo de forrageamento e aumento de comportamentos agonísticos associados com a defesa dos filhotes, condições estas que implicam na maior liberação de glicocorticóides, para mobilização de reservas energéticas no suporte aos custos da lactação e cuidado parental (MAGEE *et al.*, 2006; BERNE *et al.*, 2004; GUYTON, 2002).

5.3 População de vida livre

5.3.1 Perfil sazonal da atividade adrenocortical

Para verificar possível perfil de sazonalidade na atividade adrenocortical de lobos-guarás de vida livre, foram comparadas as concentrações de MCF entre as quatro estações do ano. Foi observado que lobos-guarás apresentam um perfil sazonal na excreção de MCF, com aumento progressivo nas concentrações basais a partir do verão até a primavera, quando foi observado o maior valor médio de concentração basal.

Sabe-se que algumas espécies selvagens podem modular sazonalmente a liberação de glicocorticóides, com a maioria das espécies estudadas de répteis, anfíbios e aves apresentando maiores concentrações durante a estação reprodutiva. Entretanto em mamíferos não há um consenso sobre qual estação estes animais podem apresentar esta sazonalidade, sendo que algumas espécies apresentam maior liberação de glicocorticóides durante a estação reprodutiva, enquanto que outras apresentam após a estação reprodutiva (ROMERO, 2002).

Este perfil sazonal observado pode ser explicado com base nas mudanças de estado alostático que ocorrem frente as diferentes exigências biológicas durante o ciclo de vida (LANDYS *et al.*, 2006), contudo o que exatamente induz a estas mudanças, se o fotoperíodo, condições climáticas, disponibilidade de comida, estação reprodutiva ou o grupo de todas estas variáveis ainda não é conhecido (ROMERO, 2002).

Os lobos-guarás analisados no presente trabalho habitam zonas subtropicais, com estações úmida e seca bem definidas (DIETZ, 1984). A estação seca ocorre de junho a agosto, com temperaturas médias de 18°C, pouca incidência de chuvas e duração média do dia, período claro, de aproximadamente 10 horas. Na

estação chuvosa – dezembro a fevereiro – as temperaturas são um pouco mais elevadas, com médias de aproximadamente 22°C, há maior incidência de chuvas e aumento da duração média do dia, para aproximadamente 13 horas (DIETZ, 1984).

Apesar desta região apresentar estes dois momentos bem definidos, não ocorrem grandes variações nas condições ambientais, como as observadas em zonas temperadas e boreais. Esta informação é importante, visto que, alguns estudos com mamíferos que apresentam sazonalidade na liberação de glicocorticóides reportam a existência de uma relação negativa entre temperatura ambiental mínima (aproximadamente -3°C a 10°C) e níveis de MCF (HUBER *et al.*, 2003). Uma explicação muito simples para este fato é a de que as baixas temperaturas afetam a disponibilidade de comida e, conseqüentemente, ingestão de alimento. Em algumas espécies de mamíferos, esta diminuição na ingestão de alimentos está associada a elevados níveis de glicocorticóides (TSUMA *et al.*, 1996; SALTZ e WHITE, 1991).

Com relação a disponibilidade de alimentos, como citado anteriormente (ver Introdução), a dieta de lobos-guarás é considerada onívora, sendo que a maioria dos estudos indicam a fruta da lobeira (*Solanun lycocarpum*) como o item alimentar mais freqüentemente consumido (MOTTA-JÚNIOR *et al.*, 1996; DIETZ, 1984). Especificamente para os lobos-guarás da região do PNSC, a lobeira é o mais importante item alimentar, em termos de volume e ocorrência nas fezes (DIETZ, 1984). Com exceção da lobeira, o número de espécies de frutas disponíveis consumidas pelo lobo-guará é maior durante a estação chuvosa quando comparado com a estação seca, por outro lado, durante a estação seca ocorre maior abundância de pequenos mamíferos. Desta forma, os três mais importantes itens da dieta de lobos-guarás são: a lobeira, pequenos mamíferos e outras frutas. A lobeira está disponível e é consumida ao longo de todo o ano, enquanto que pequenos mamíferos ocorrem mais durante a estação seca e as outras espécies de frutas estão mais disponíveis na estação chuvosa (DIETZ, 1984).

Assim sendo, o lobo-guará é uma espécie generalista, alternando o consumo de seus itens alimentares de acordo com a disponibilidade dos mesmos e desta forma, aparentemente, não ocorre falta de alimento ao longo do ano, o que poderia de alguma forma, como descrito anteriormente, contribuir para este padrão sazonal de sua atividade adrenocortical.

Analisando os diferentes períodos do ciclo de vida dos lobos-guarás, observa-se que, como citado anteriormente (ver Introdução), esta espécie é monoéstrica estacional, com período de estação reprodutiva bem definido, que inicia no outono (RODRIGUES, 2002; DIETZ, 1984). Assim, o outono é o período de acasalamento e as fêmeas que conceberam entram em gestação aproximadamente até o inverno. Aumentos progressivos nas concentrações basais de MCF associados ao início da estação reprodutiva poderiam ser esperados e, deveriam ser maiores a partir do início da gestação nas fêmeas como decorrência do aumento na demanda metabólica da gestação (BERNE *et al.*, 2004; GUYTON, 2002) e estresse do parto, com pico de nascimento dos filhotes no inverno (RODRIGUES, 2002; RODDEN *et al.*, 1996; DIETZ, 1984). O perfil obtido no presente estudo demonstra exatamente esta tendência de aumento, com os valores de verão sendo os mais baixos e ocorrendo aumentos gradativos após o início do outono.

Na primavera observou-se o maior valor médio das concentrações basais de MCF, momento este que coincide com o período de lactação e cuidado parental, sendo esta a fase de maior dependência dos filhotes. Outros estudos com lobos-guarás cativos mostram que os filhotes começam a ingerir sólido regurgitado pelos pais apenas após quatro semanas de vida e o desmame completo ocorre ao redor de 15 semanas de vida (PRO-CARNÍVOROS, 2003).

Como já mencionado, os animais devem ajustar seus sistemas internos de acordo com mudanças no ambiente externo ou nas próprias demandas internas, pois as condições ambientais e os diferentes períodos do ciclo de vida não são estáticos (LANDYS *et al.*, 2006). Desta forma, como os principais mediadores dos mecanismos de alostasia são os glicocorticóides, a sazonalidade da atividade adrenocortical esta intimamente relacionada com a alteração destes estados fisiológicos.

Os resultados de sazonalidade obtidos para animais de vida livre são similares aos observados nos animais cativos que se reproduziram, neste mesmo estudo, onde ocorre aumento da atividade adrenocortical no período pós-parto.

O menor valor nas concentrações basais de MCF observados no verão pode estar associado ao fato de nesta fase os filhotes já estarem menos dependentes dos pais e também pela não ocorrência de atividade reprodutiva. Outro fator que pode estar relacionado com a menor média das concentrações basais no

verão é a exposição das amostras fecais a chuvas, como já explicado anteriormente. Como as amostras não estavam mantidas em condições controladas, as chuvas poderiam ter “lavado” as amostras fecais antes da coleta, reduzindo assim suas concentrações de MCF.

Aparentemente o padrão sazonal da atividade adrenocortical observado em lobos-guarás está mais relacionado com as mudanças em seu ciclo de vida do que com alterações nas condições ambientais, como mudanças climáticas ou disponibilidade de alimento.

5.3.2 Pressão antrópica

Nas análises de pressão antrópica observou-se que as concentrações basais de MCF dos animais localizados dentro dos limites geográficos do PNSC foram menores que as dos animais localizados na região de entorno e fora das limitações. Não foram observadas diferenças nas concentrações basais entre os animais de entorno e fora dos limites do PNSC, sugerindo que os animais mais expostos ao contato com humanos têm sua atividade adrenocortical aumentada.

Estudos de pressão antrópica em populações de vida livre de veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) também mostram que ocorre aumento nas concentrações de glicocorticóides fecais nos animais mais expostos ao contato com o homem, sugerindo que o distúrbio humano representa um fator de estresse crônico nesta espécie (PEREIRA *et al*, 2006).

Os animais de vida livre de lobos-guarás da Serra da Canastra estão localizados, como citado anteriormente (ver Introdução), em região de grande crescimento e desenvolvimento econômico agropecuário. As áreas vizinhas ao PNSC abrigam fazendas pequenas (100 hectares ou menos), onde a alteração de habitat é evidente. Muitos lobos-guarás utilizam estas regiões como áreas de vida e isso ocorre principalmente devido a sua característica de dieta. Seu principal item alimentar é a lobeira, que está presente em abundância nas pastagens e outras áreas de uso humano, sendo este um dos fatores que possibilita o uso destas áreas por lobos-guarás. Apesar desta flexibilidade em ocupar ambientes alterados, esta espécie tem desaparecido de várias regiões onde a vegetação nativa se torna muito

escassa ou inexistente (PRÓ-CARNÍVOROS, 2003; RODRIGUES, 2002; DIETZ, 1984).

Outro fator importante que deve ser levado em consideração é a interação destes lobos-guarás com cães domésticos (*Canis familiaris*). O cão doméstico interage com espécies nativas através de predação, competição por recursos já limitados e introdução de doenças. Cachorros costumam agrupar-se em matilhas e nesta situação podem preda animais de grande porte, inclusive lobos-guarás e seus filhotes. Possivelmente estes fatores sejam os responsáveis indiretos no aumento da concentração basal de MCF nos lobos-guarás mais expostos, fazendo com que estes animais possuam concentrações basais muito similares às encontradas no cativeiro (PRÓ-CARNÍVOROS, 2003; RODRIGUES, 2002).

Os resultados obtidos no presente estudo constituem o primeiro relato de monitoramento da atividade adrenocortical, através de métodos não invasivos, de lobos-guarás, tanto em animais de vida livre quanto em animais cativos. De forma geral, procuramos verificar o perfil desta atividade, respondendo a questões fisiológicas importantes que até então não tinham sido elucidadas como, por exemplo, a comprovação da maior liberação de glicocorticóides nos animais cativos e nos animais de vida livre mais expostos a pressão antrópica.

A partir destas respostas é possível traçar caminhos que nos ajudem a entender melhor os problemas que afetam a reprodução desta espécie tão carismática, contribuindo assim para sua perpetuação e conservação.

6. CONCLUSÃO

Considerando as condições experimentais do presente trabalho pode-se concluir que:

1. Lobos-guarás cativos apresentam significativamente maiores concentrações basais de MCF quando comparados com a população de vida livre, indicando que estes animais reagem às condições de cativeiro pelo aumento persistente na atividade adrenocortical, caracterizando provável estresse crônico de cativeiro.
2. Machos de lobos-guarás têm sua atividade adrenocortical aumentada após o nascimento dos filhotes, sugerindo a real participação do macho no cuidado parental.
3. Fêmeas de lobos-guarás apresentam uma tendência ao aumento da atividade adrenocortical no período pós-parto, mostrando maior liberação de glicocorticóides no suporte aos custos da lactação e do cuidado parental.
4. As análises de sazonalidade mostram perfil sazonal na atividade adrenocortical de lobos-guarás ao longo do ano, aumentando gradativamente no outono, com pico na primavera e reduzindo no verão.
5. As análises de pressão antrópica evidenciam o aumento da atividade adrenocortical nos animais de vida livre mais expostos ao contato humano, indicando que estes animais enfrentam estas condições da mesma forma que os animais de cativeiro.
6. As concentrações de MCF em lobos-guarás de vida livre que habitam regiões fora das limitações geográficas do PNSC são similares às encontradas para os animais cativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B. A Fisiologia, 5ª Edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2004, p. 941 – 977.
- BREUNER, C. W.; ORCHINIK, O. Downstream from corticosterone: seasonality of binding globulins, receptors and behavior in the avian stress response. Avian Endocrinology, 1ª Ed, Narosa Publishing House, New Delhi, India, 2000.
- BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 2004.
- CITES Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Internet. Disponível em <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml> acesso em 21/02/2007 às 10:53 hs.
- DIETZ, J. M. Ecology and social organization of maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*. Washington DC: Smithsonian Institution press; 1984.
- FOWLER, M. E. Stress. In: FOWLER, M. E. (Ed) Zoo and Wild Animal Medicine. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 33 – 35.
- GRAHAM, L.H.; BROWN, J.L. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. Zoo Biology, n15, pp 71-82, 1996.
- GUYTON, A C. Tratado de fisiologia médica, 10 Ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 2002, p. 721-731.
- ISIS. International Species Information System, Internet. Disponível em <http://www.isis.org/CMSHOME/> acesso em 13/01/2007 às 16:47 hs.
- IUCN. International World Conservation Union, Internet. Disponível em <http://www.iucnredlist.org/> acesso em 13/01/2007 às 17:32 hs.
- JAVOROUSKI, M.L. Comparação da resposta adrenocortical de fêmeas de felídeos submetidas a anestesia, laparoscopia e manipulação genital. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Veterinária). Universidade Federal do Paraná. 2003.
- KORTE, S. M.; OLIVIER, B.; KOOLHAAS, J. M. A new animal welfare concept based on allostasis. Physiol. Behav. in press, 2007.
- LANDYS, M.M; RAMENOFISKY, M.; WINGWELD, J.C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of

- periodic life processes. *Gen. and Comparative Endocrinology* 148:132 – 149, 2006.
- MAIA, O. B.; GOUVEIA, A. M. G. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (illiger, 1811) in captivity. *Braz. J. Biol.*, v62, 25-32, 2002.
- MAGEE, S. E.; NEFF, B. D.; KNAPP, R. Plasma levels of androgens and cortisol in relation to breeding behavior in parental male bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Hormones and Behavior* 49: 598 – 609, 2006.
- MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements. *General and Comparative Endocrinology* 132: 21–26, 2003.
- MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology* 138: 189 - 199, 2004.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA, 2003 Instrução Normativa Nº 3, de 27 de maio de 2003. *Diário Oficial da União – Seção 1* 101.88-97.
- MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; MORAES, W.; MUCCILOLO, R.G.; LACERDA, O; GOMES, M.L.F; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; BROWN, J.L. Testicular and ovarian function in South American felids assessed by fecal steroid. *Proc. American Association Zoo Veterinarians*. Pp. 561-565, 1996.
- MORAIS, R.N. Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758; *Leopardus wiedii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775): Sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais. São Paulo, 1999. 177 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal .
- MORATO, R. G.; BUENO, M. G.; MALMHEISTER, P.; VERRESCHI, I. T. N.; BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgens metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 1903 – 1907, 2004.
- MOREIRA, N. Aspectos reprodutivos e resposta adrenocortical em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*. Tese (Doutorado em Zoologia). Pós Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 228p., 2001.
- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C.T. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102: 262-302, 2007.
- MOSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 67–74, 2002.

- MOTA, M. T. S.; FRANCI, C. R.; SOUSA, M. B. C. Hormonal changes related to parental and alloparental care in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Hormones and Behavior* 49: 293 – 302, 2006.
- MUNSON, L. KOEHLER, J.W.; WILKINSON, J. E.; MILLER, R. E. Vesicular and ulcerative dermatopathy resembling superficial necrolytic dermatitis in captive black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Veterinary Pathology* 35: 31 -42, 1998.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858., 2000.
- NOWAK, R.M.. Walker's Mammals of the World. 5 Ed., Vols I e II, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1991, 1692p.
- PAULA , R.C. Effects of Human activities on carnivores of the Cerrado ecosystem of Brazil. Proceedings for Defenders of Wildlife Carnivores 2002 conference, 17-20 November, 2002, Monterey-CA, p.175. 2002.
- PESSUTTI, C. Protocolo de manejo do lobo-guará – III Workshop do lobo-guará. Sorocaba: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2000, 63 p.
- PEREIRA, R. J. G.; DUARTE, J. M. B.; NEGRÃO, J. A . Effects of environmental conditions, human activity, reproduction, antler cycle and grouping on fecal glucocorticoids of free-ranging Pampas deer stags (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Hormones and Behavior* 49, 114 – 122, 2006.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. 1 Ed., Londrina-Pr, 2001, 328p.
- PRÓ CARNÍVOROS. Plano de manejo: biologia comportamental e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no cerrado de Minas Gerais – MG. Proposta apresentada ao Fundo Nacional do Meio Ambiente – FNMA. 2003.
- RABIN, D. S.; JOHNSON, E. O.; BRANDON, D. D.; LIAPI, C.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biology of Reproduction* 42: 74 – 80, 1990.
- RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*, v.45, pp.523-532, 1991.

- RODDEN, M. D.; KLEIMAN, D. G. Ethogram for maned wolf behavioral observations. Maned Wolf Species Survival Plan, 1988, unpublished instructions.
- RODDEN, M. D.; SORENSON, L. G.; SHERR, A ; KLEIMAN, D. G. Use of behavioral measures to assess reproductive status in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). Zoo Biology 15: 565 – 585, 1996.
- RODRIGUES, F.H.G. Biologia e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. Tese (Doutorado em Ecologia). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 105p., 2002.
- ROMERO, L. M. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. Gen and Comparative Endocrinology 128: 1 – 24, 2002.
- SANSON, G.; BROWN, J. L.; FARSTAD, W. Non-invasive faecal steroid monitoring of ovarian and adrenal activity in farmed blue fox (*Alopex lagopus*) females during late pregnancy, parturition and lactation onset. Animal Reproduction Science 87: 309 – 319, 2005.
- SHELDON, J.W. Wild dogs, the natural history of non domestic Canidae. 1 Ed., San-Diego – California/USA, Academic Press Inc., 1992, 248p.
- SILVEIRA, L.; JÁCOMO, AT.A Carnivore distribution and abundance patterns along the cerrado-pantanal corridor, southwestern Brazil. In: Anais do I workshop sobre pesquisa e conservação de carnívoros neotropicais. Atibaia- São Paulo, 2003, p. 35-53.
- SOCKMAN, K.W.; SCHWABL, H.; SHARP, P. J. Removing the confound of time in investigating the regulation of serial behaviour: testosterone, prolactin and the transition from sexual to parental activity in male American kestrels. Animal Behavior 67: 1151 – 1161, 2004.
- SONGSASEN, N.; RODDEN, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Theriogenology, v66, pp 1743-1750, 2006.
- TERIO, K. A; CITINO, S.C.; BROWN, J.L.. Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). J. Zoo. Wild. Med. Dec;30(4): 484-91,1999.
- TERIO, K.A; BROWN, J. L.; MORELAND, R.; MUNSON, L. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the Cheetah. Zoo Biology, 21: 215 – 222, 2002.
- TERIO, K. A; MARKER, L.; MUNSON, L. Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function. J. of Wildlife Disease, 40(2), pp 259-266, 2004.

- TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N. Y. Acad Sci* 1046: 54 – 74, 2005.
- VALLADARES-PÁDUA, C. B.; MARTINS, C.S.; RUDRAN, R. Manejo integrado de espécies ameaçadas. In: Cullen, Jr.; Rudran, R; Valladares-Pádua, C.B. Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida selvagem. 1 Ed., Curitiba-Pr, Editora UFPR, 2004, p. 647-65.
- VELLOSO, A L.; WASSER, S.K.; MONFORT, S.L.; DIETZ, J.M. Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *General and comparative endocrinology*. 112, 96 – 107, 1998.
- WASHBURN, B. E.; MILLSPAUGH, J. J. Effects of simulate environmental conditions on glucocorticoid metabolites measurements in white-tailed deer feces. *Genereal and Comparative Endocrinology* 127: 217 – 222, 2002.
- YOUNG, K. M.; WALKER, S. L.; LANTHIER, C.; WADDELL, W. T.; MONFORT, S. L.; BROWN, J. L. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and Comparative Endocrinology* 137: 148–165, 2004.