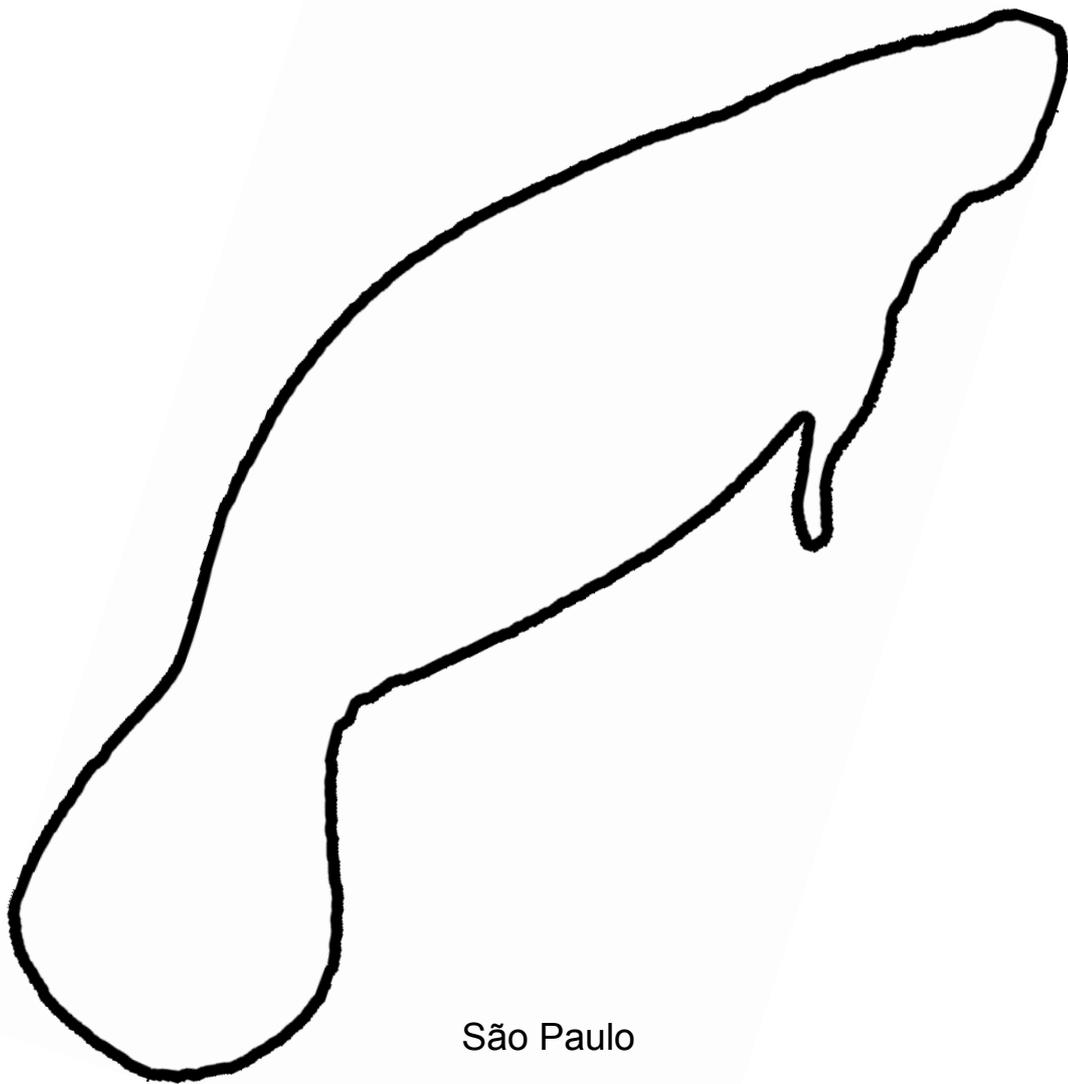


RODRIGO DE SOUZA AMARAL

Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro



São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RODRIGO DE SOUZA AMARAL

Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1961
FMVZ

Amaral, Rodrigo de Souza

Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro / Rodrigo de Souza Amaral. – São Paulo: R. S. Amaral, 2008.
85 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Peixe-boi Amazônico. 2. Radioimuniensaio. 3. Reprodução.
4. Sirênio. 5. Testosterona. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de métodos não invasivos para dosagem de testosterona em peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro", protocolo nº756/2005, utilizando 04 peixes-boi, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Assessment of noninvasive methods for testosterone analysis in captive Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*)", protocol number 756/2005, utilizing 04 Amazonian manatees, under the responsibility of Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 26 de outubro de 2005


Prof.^a Dr.^a Júlia Maria Matêra
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
DEPARTAMENTO DE VIDA SILVESTRE-DEVIS/DIREC / SUPERINTENDÊNCIA DO IBAMA EM
LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO

NÚMERO DA LICENÇA 020-05/CMA/IBAMA	Nº DE REGISTRO NO IBAMA XXXXXXXXXXXXXXXXXX	PERÍODO DE VALIDADE 20/08/05 A 20/08/06	PROCESSO IBAMA Nº 02034.000099/05-84
---------------------------------------	---	--	---

OBJETO: <input type="checkbox"/> CAPTURA/COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO DE ANIMAIS/PLANTAS SILVESTRES <input type="checkbox"/> OUTROS (ESPECIFICAR): CAPTURA PARA COLETA DE SANGUE E TRANSPORTE PARA TRANSLOCAÇÃO.	FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA/CRIOURO CIENTÍFICO <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> EXPOSITOR <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> CRIADOURO CONSERVACIONISTA <input type="checkbox"/> OUTROS (ESPECIFICAR)
---	---

FAVORECIDO - ESPECIFICAÇÃO:
NOME: Cláudio de Alvarenga Oliveira, Rodrigo de Souza Amaral, Fernando César Weber Rosas e Vera M. Ferreira da Silva.
ENDEREÇO: Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia – FMVZ. Departamento de reprodução Animal. Av Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87. Butantã, São Paulo/SP. Cep: 05508-000
RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): Cláudio de Alvarenga Oliveira

TRANSPORTADOR: OS SENHORES PESQUISADORES FAVORECIDOS PELA PRESENTE LICENÇA
MEIO DE TRANSPORTE: MARÍTIMO/TERRESTRE/AÉREO
PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: Litoral nordeste do Brasil

DESTINO: Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia – FMVZ

QUANTIDADE ESPÉCIMES/TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
04 animais	<i>Trichechus inunguis</i>	Peixe-boi amazônico

OBS.: 1 – Esta licença não exige o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01, que versa sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), nos termos da Medida Provisória Nº 2.186-16/2001 e Decreto Nº 3.945/2001.

2- Esta licença não autoriza o uso de material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO Itamaracá/PE 20/07/05	ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA Regis Brito de Lima Centro de Recursos Aquáticos / IBAMA Chefe do C.E.
--	--

- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.
- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:
CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO ESPECIFICADO
CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.
CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;
CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO COMPETENTE LOCAL:
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DOS RECURSOS HÍDRICOS E DA AMAZÔNIA LEGAL
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
 DEPARTAMENTO DE VIDA SILVESTRE-DEVIS/DIREC / SUPERINTENDÊNCIA DO IBAMA EM
LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO

NÚMERO DA LICENÇA
06 - 06/CMA/IBAMA

Nº DE REGISTRO NO IBAMA
XXXXXXXXXXXXXXXXXX

PERÍODO DE VALIDADE
11/10/06 A 11/10/07

PROCESSO IBAMA Nº
02034.000099/2005-09

OBJETO:

- (X) CAPTURA/COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- (X) TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- () COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
- () TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA
- () EXPOSIÇÃO DE ANIMAIS/PLANTAS SILVESTRES
- () OUTROS (ESPECIFICAR):

FAVORECIDO:

- () ZOOLOGICO
- (X) INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA/CRIADOURO CIENTÍFICO
- (X) PESQUISADOR
- () EXPOSITOR
- () CRIADOURO COMERCIAL
- () CRIADOURO CONSERVACIONISTA
- () OUTROS (ESPECIFICAR)

FAVORECIDO - ESPECIFICAÇÃO:

NOME: Cláudio de Alvarenga Oliveira, Rodrigo de Souza Amaral, Fernando César Weber Rosas e Vera M. Ferreira da Silva.

ENDEREÇO: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ. Departamento de Reprodução Animal. Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87. Butantã, São Paulo/SP. CEP.: 05508-000

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): Cláudio de Alvarenga Oliveira

TRANSPORTADOR: OS SENHORES PESQUISADORES FAVORECIDOS PELA PRESENTE LICENÇA

MEIO DE TRANSPORTE: MARÍTIMO/TERRESTRE/AÉREO

PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: Coleta – INPA – Amazonas –AM, Análise – USP – São Paulo –SP.

DESTINO: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ.

QUANTIDADE ESPÉCIMES/TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
04 animais	<i>Trichechus inunguis</i>	Peixe-boi amazônico

OBS.: 1 – **Esta licença não exige o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01, que versa sobre o acesso ao patrimônio genético.** No caso de amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), nos termos da Medida Provisória Nº 2.186-16/2001 e Decreto Nº 3.945/2001.

2- Esta licença não autoriza o uso de material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO
Itajaí/SC 11/10/06

ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA

Julio Gonchorosky
Matrícula 686217
Centro Mamíferos Aquáticos - Sul

- VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.
- ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA :

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO ESPECIFICADO

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO COMPETENTE LOCAL:

- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS

MOD. 09.008 1ª VIA - INTERESSADO 2ª VIA - IBAMA / PROCESSO – ATENÇÃO – A VIA ASSINADA ENCONTRA-SE NO CMA/SUL/ITAJAI

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AMARAL, Rodrigo de Souza

Título: Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Brindo à casa, brindo à vida, meus amores, minha família...”

Mar de Gente

O RAPPÀ

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira**, meu orientador, pela amizade e pela confiança depositada ao me aceitar como seu orientado, realizando meu sonho de ingressar na pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP;

Ao **Dr. Fernando C. W. Rosas**, pela amizade, pela confiança e incentivo na realização deste trabalho, por abrir as portas do Laboratório de Mamíferos Aquáticos – LMA/INPA para mim, e por todas as conversas e ensinamentos passados;

Ao **Prof. Dr. Marcelo A. B. V. Guimarães** pelo incentivo na realização deste trabalho e pelo fornecimento de um dos conjuntos comerciais para dosagem de testosterona, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

À **Dra. Vera M. F. da Silva**, pelo apoio e confiança permitindo a realização deste trabalho;

Ao **Médico Veterinário José Anselmo D’Affonsêca Neto** e aos tratadores **Daniel, Jeová, Marcelo, Nazaré e Raimundo**, por toda a ajuda nas coletas das amostras, e por todas as conversas e risadas;

Aos **peixes-bois do LMA/INPA**, em especial **Tupy e Yanomama**, por me aturarem todos os dias durante o período de coleta;

A todos os **pós-graduandos e funcionários do LMA/INPA**, à **Bernadete** e ao **Javier**, por terem feito o período de coleta mais divertido;

Aos **meus avós e tias**, por sempre me receberem muito bem, sempre fazendo de tudo para me agradar, toda vez que vou a Manaus;

À **Tecnopec Laboratórios**, pelo fornecimento do hormônio Lecirelina, imprescindível para a realização deste trabalho;

À **Médica Veterinária Josiane Almeida Sales** pela ajuda no envio do hormônio Lecirelina. Valeu Josi!!!;

À **Técnica de Laboratório Maria do Socorro Pontes Silva** e os demais técnicos da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas pelas dosagens de creatinina urinária;

À amiga **Dra. Priscila Viau**, grande companheira de laboratório, pela paciência, por todos os ensinamentos passados, por todas as conversas e risadas, e pela disposição em me aturar por mais quatro anos!;

À companheira de mestrado **Renata Marino Romano** pelo fornecimento dos conjuntos comerciais para dosagem de testosterona, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

A todos os **professores do VRA**, pela amizade e pelos conhecimentos passados;

À secretária **Harumi Dói Shiraishi**, por toda ajuda nos trâmites burocráticos e por sentir minha falta quando o corredor do VRA está silencioso;

Aos **funcionários do VRA**, por me ajudarem quando foi preciso, sempre com boa vontade;

Aos **pós-graduandos do VRA**, grandes amigos, pelas conversas no corredor e principalmente pelos churrascos;

A **todos do LDH**, grandes pesquisadores, por todas as discussões científicas, conversas e risadas. Mulheres que levam a reprodução a sério!;

Aos **agregados e visitantes constantes do LDH**, por tornarem o local de trabalho mais descontraído;

À minha **irmã Fabiane**, pela capa deste trabalho, sempre provando que seu diploma serve para alguma coisa!;

Ao **CNPq** pela bolsa de mestrado concedida;

À **Fundação Amaral**, por sempre financiar meus projetos;

Ao **Zé** e à **Ana Paula**, por todo suporte na temporada paulistana;

Ao “**núcleo candango da novela**”, por fazerem me sentir em Brasília mesmo estando em São Paulo;

Aos **FF**, por serem os FF...;

Aos **grandes amigos “sirenólogos”**, por reavivarem em mim a paixão pelos peixes-bois, e por sempre me insentivarem a continuar trilhando este caminho;

A todos os meus **grandes amigos espalhados pelo mundo**, que se mostram muito mais que “simples amigos”, me dando todo o apoio necessário e sempre se esforçam para manter contato;

Aos meus **pais** e minhas **irmãs**, por sempre me apoiarem e permitirem que eu seguisse em busca dos meus sonhos;

Ao **Santo Expedito**, por ouvir as nossas súplicas;

A **Deus**, sempre!

*“O pescador,
Ele sai bem cedinho, ele sai bem cedinho, ele vai
pescar.
O pescador,
Ele ama o rio, ele ama o rio, o rio Amazonas.
E você sabe por quê?
Por que de baixo das águas
Não existe só boto,
Existe também o peixe-boi, o pirarucu e o tambaqui.”*

(Autor desconhecido)

RESUMO

AMARAL, R. S. **Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro.** [Use of different biological matrices on androgens measurement in captive male Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*)]. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade da dosagem de andrógenos em amostras de saliva, secreção lacrimal, urina e fezes de peixe-boi da Amazônia realizando um desafio hormonal. Dois peixes-bois amazônicos adultos machos (A-1 e A-2) foram submetidos a um protocolo de experimentação de doze dias (D-1 a D10). No D0 os animais receberam uma injeção intramuscular de GnRH exógeno. Amostras de saliva, secreção lacrimal, urina e fezes foram coletadas diariamente (entre 08h00 e 09h00) e mantidas a -20°C até o ensaio. As amostras de fezes foram liofilizadas, extraídas com metanol 80% e diluídas em tampão antes do radioimunoensaio (RIE). As amostras de urina sofreram hidrólise ácida e foram diluídas em soro bovino depletado. As amostras de saliva e secreção lacrimal foram dosadas sem etapa de extração, porém, o ensaio foi adaptado para aumentar a sensibilidade do teste. Os ensaios hormonais foram realizados utilizando um conjunto comercial de RIE para testosterona total. Um pico de andrógenos (mediana+2DI) somente foi observado nas amostras de saliva, urina e fezes de ambos os animais. Porém, os picos de andrógenos fecais ocorreram depois (cinco dias) dos picos de andrógenos urinários e salivares. Este intervalo está correlacionado com o longo tempo de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal na espécie. Os picos salivares e urinários ocorreram muito próximos, provavelmente com poucas horas de intervalo. Esses resultados demonstram que as concentrações de andrógenos em amostras de saliva, urina ou fezes refletem consistentemente os eventos fisiológicos e são ferramentas de grande utilidade no monitoramento reprodutivo de peixes-bois da Amazônia.

Palavras-chave: Peixe-boi Amazônico. Radioimuniensaio. Reprodução. Sirênio. Testosterona.

ABSTRACT

AMARAL, R. S. **Use of different biological matrices on androgens measurement in captive male Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*)**. [Uso de diferentes matrizes biológicas na dosagem de andrógenos em peixes-bois da Amazônia machos (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro]. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of this study was to verify the viability of androgens measurement in saliva, lacrimal secretion, urine and fecal samples of Amazonian manatee by carrying out hormonal challenge. Two adult male manatees (A-1 and A-2) were submitted to an experimentation protocol of twelve days (D-1 to D10). On D0 the animals received an intramuscular injection of GnRH-analogue. Salivary, lacrimal, urinary and fecal samples were collected daily (between 08h00 and 09h00) and frozen at -20°C until assayed. Fecal samples were lyophilized, extracted with 80% methanol and diluted in buffer before the radioimmunoassay (RIA). Urine samples underwent acid hydrolysis and diluted in depleted bovine serum. Salivary and lacrimal samples were assayed without extraction step, but, the assay was adapted to improve the sensibility. Hormonal assays were carried out with a commercial testosterone RIA kit. An androgen peak ($>\text{median}+2\text{IQR}$) was observed only in salivary, urinary and fecal samples of both animals. However, the fecal androgens peaks occurred later than urinary and salivary androgens peaks. These intervals are correlated with the long digesta passage time in this species. The salivary and urinary peaks were very close, probably with few hours of interval. These results show that androgens concentrations in saliva, urine or feces samples reflect reliably physiological events and are powerful tool for reproductive monitoring of Amazonian manatees.

Key words: Amazonian manatee. Radioimmunoassay. Reproduction. Sirenian. Testosterone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>).....	24
Figura 2 – Estrutura da molécula de testosterona.....	29
Figura 3 – Figura esquemática das rotas de metabolismo e excreção da testosterona.....	32
Figura 4 – Tanques dos peixes-bois da Amazônia no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMA/INPA.....	42
Figura 5 – Aplicação do análogo de GnRH na região do pedúnculo caudal de um <i>T. inunguis</i>	43
Figura 6 – Coleta de fezes de <i>T. inunguis</i> após drenagem do tanque de cambiamento.....	44
Figura 7 – Coleta de urina de <i>T. inunguis</i> por compressão abdominal na região da vesícula urinária.....	46
Figura 8 – Coleta de saliva de <i>T. inunguis</i> com o auxílio de uma colher de metal.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Representação gráfica da regressão linear entre a matriz salivar de <i>T. inunguis</i> e a curva padrão do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens).....	53
Gráfico 2 –	Representação gráfica da regressão linear entre a matriz urinária de <i>T. inunguis</i> e a curva padrão do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens).....	54
Gráfico 3 –	Representação gráfica da regressão linear entre a matriz fecal de <i>T. inunguis</i> e a curva padrão do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens).....	54
Gráfico 4 –	Mudança na excreção de andrógenos salivares, lacrimais, urinários e fecais em resposta ao desafio hormonal com GnRH em dois peixes-bois da Amazônia machos mantidos em cativeiro (A-1 e A-2).....	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Características dos peixes-bois da Amazônia utilizados neste estudo.....	41
Tabela 1 – Controles de qualidade obtidos nos ensaios hormonais de andrógenos presentes na saliva, secreção lacrimal, urina e fezes de dois peixes-bois amazônicos machos adultos.....	52
Tabela 2 – Resultados da regressão linear para o teste de paralelismo entre as matrizes salivar, urinária e fecal de peixes-bois da Amazônia e a curva do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens).....	53
Tabela 3 – Resultados das dosagens de andrógenos salivares, lacrimais, fecais e urinários, e de creatinina urinária (Cr) de um peixe-boi amazônico macho (A-1) durante o desafio hormonal.....	55
Tabela 4 – Resultados das dosagens de andrógenos salivares, lacrimais, fecais e urinários, e de creatinina urinária (Cr) de um peixe-boi amazônico macho (A-2) durante o desafio hormonal.....	56
Tabela 5 – Análise dos andrógenos salivares, lacrimais, urinários e fecais de dois peixes-bois da Amazônia machos em resposta ao desafio hormonal com GnRH.....	57
Tabela 6 – Resultados do teste de correlação linear de Pearson para as matrizes salivar, lacrimal, urinária e fecal de dois peixes-bois da Amazônia machos (A-1 e A-2) submetidos a um desafio hormonal com GnRH.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-1	Animal – 1
A-2	Animal – 2
cm	Centímetro
Cr	Creatinina
DI	desvio interquartílico
dL	Decilitro
G	Giros
g	Gramma
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
Kg	Quilograma
LH	hormônio luteinizante
M	Molar
m	Metro
m ³	metro cúbico
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µg	microgramma
ng	nanogramma
pg	Picogramma
RIE	radioimunoensaio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA.....	23
2.1.1	Exploração do peixe-boi da Amazônia no Brasil.....	24
2.1.2	Aspectos alimentares e fisiologia digestiva.....	27
2.1.3	Metabolismo.....	27
2.1.4	Aspectos reprodutivos.....	28
2.2	TESTOSTERONA – SÍNTESE, METABOLISMO E EXCREÇÃO.....	29
2.3	UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS NA DOSAGEM HORMONAL.....	33
2.3.1	Utilização de diferentes matrizes biológicas na dosagem hormonal em sirênios.....	36
3	OBJETIVOS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	ANIMAIS.....	41
4.2	DESAFIO HORMONAL.....	43
4.3	COLHEITA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	44
4.3.1	Fezes.....	44
4.3.2	Urina.....	45
4.3.3	Saliva.....	45
4.3.4	Secreção lacrimal.....	45
4.4	ANÁLISE HORMONAL.....	47
4.4.1	Fezes.....	47
4.4.2	Urina.....	48
4.4.3	Saliva.....	48
4.4.4	Secreção lacrimal.....	49
4.4.5	Paralelismo.....	49
4.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	50
5	RESULTADOS	52
5.1	PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS.....	52
5.2	PARALELISMO.....	53

5.3	DESAFIO HORMONAL.....	55
6	DISCUSSÃO.....	61
6.1	DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS SALIVARES.....	61
6.2	DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS LACRIMAIS.....	62
6.3	DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS URINÁRIAS.....	63
6.4	DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS FECAIS.....	64
6.5	COMPARAÇÃO ENTRE AS MATRIZES ANALISADAS.....	65
7	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*, MAMALIA: SIRENIA) é o menor do gênero medindo até três metros de comprimento e pesando no máximo 450kg (AYRES; BEST, 1979; CALDWELL; CALDWELL, 1985). Ocorre na Bacia Amazônica, sendo o único sirênio exclusivamente de água doce (CALDWELL; CALDWELL, 1985). Nos séculos passados, foi intensamente caçado para o comércio de sua carne, gordura e couro (DOMNING, 1982). Atualmente, a espécie é protegida por lei no Brasil, Peru e Colômbia e está classificada como “Vulnerável”, tendo alto risco de extinção na natureza em médio prazo, pela Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2006) e pelo Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA, 2001). Porém, a caça de subsistência ainda persiste com certo grau comercial (ROSAS, 1994).

Alguns estudos sobre os aspectos reprodutivos do peixe-boi amazônico têm sido realizados nas últimas décadas (BEST, 1982b; PIMENTEL, 1998; NASCIMENTO et al., 2002; RODRIGUES, 2002; RODRIGUES et al., 2003; NASCIMENTO, 2004), porém as informações sobre a biologia reprodutiva da espécie continuam escassas.

Trabalhos sobre endocrinologia reprodutiva em animais domésticos normalmente são realizados com amostras sanguíneas. Porém, como alternativa na coleta de sangue, o uso de diferentes matrizes, como fezes, urina ou saliva, tem se mostrado como uma excelente ferramenta no monitoramento endócrino-reprodutivo de animais selvagens, minimizando o estresse causado pela captura e contenção, e possibilitando um acompanhamento endócrino diário dos animais. Entretanto, é de suma importância avaliar se a técnica empregada na dosagem hormonal nessas matrizes é capaz de demonstrar os eventos fisiológicos ocorridos na espécie estudada.

Sendo assim, foi proposto, neste estudo, avaliar a viabilidade da utilização de diferentes matrizes biológicas como ferramentas no monitoramento reprodutivo de peixes-bois da Amazônia machos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi redigida em três principais tópicos, compreendendo: 1 – os aspectos biológicos e históricos do peixe-boi da Amazônia; 2 – a síntese, metabolismo e excreção da testosterona; e 3 – a utilização de diferentes matrizes biológicas na dosagem hormonal.

2.1 O PEIXE-BOI DA AMAZÔNIA

A ordem Sirenia compreende três gêneros recentes, *Trichechus* (peixe-boi), *Dugong* (dugongo) e *Hydrodamalis* (vaca marinha de Steller), sendo este último extinto em 1768 pela caça predatória. O gênero *Trichechus* apresenta três espécies viventes: *Trichechus inunguis* (peixe-boi amazônico), *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano) e *Trichechus manatus* (peixe-boi marinho) (DOMNING; HAYEK, 1986).

Sendo o menor dos sirênios, o peixe-boi amazônico (Figura 1) nasce medindo entre 85-105 cm e pesando entre 10 e 15kg (BEST, 1984), e pode atingir até três metros de comprimento e pesar até 450kg quando adulto (AYRES; BEST, 1979; CALDWELL; CALDWELL, 1985; ROSAS, 1994).

Apresenta uma coloração de pele variando de cinza escuro a preto com a presença de manchas brancas na região ventral, sendo estas características da espécie (HUSAR, 1977; CALDWELL; CALDWELL, 1985). Porém, alguns indivíduos podem não apresentar essas manchas, tendo a região ventral só levemente mais clara que o dorso (ROSAS, 1994). Sua pele tem em média dois centímetros de espessura, apresentando uma camada de tecido adiposo subcutâneo aproximadamente do mesmo tamanho (MENDES, 1958; VERÍSSIMO, 1970).



Figura 1 – Peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*)

Possui pêlos esparsos pelo corpo, os quais especula-se terem a função de sinalizar variações na velocidade e direção das correntes aquáticas (CALDWELL; CALDWELL, 1985; REEP; MARSHALL; STOLL, 2002). Há uma maior concentração de pêlos na região perioral de grande importância no contato entre os indivíduos, na exploração do ambiente e também na manipulação dos alimentos (MARSHALL et al., 2003). As nadadeiras peitorais não apresentam unhas, diferentemente dos outros sirênios (CALDWELL; CALDWELL, 1985).

Sendo o único sirênio exclusivamente de água doce, o *T. inunguis* é endêmico da Bacia Amazônica, ocorrendo desde os rios da Colômbia, Peru e Equador até a ilha de Marajó no estado do Pará (BEST, 1984).

2.1.1 Exploração do peixe-boi da Amazônia no Brasil

A caça do peixe-boi amazônico no Brasil existe desde antes do período de colonização, porém, seus registros são quase inexistentes. Sabe-se que a caça tradicional era realizada pelos índios para o consumo da carne e gordura, sendo estes considerados itens comuns na dieta local, e também para a utilização de seu

couro como escudo (HEATON, 1970) e de seus ossos na fabricação de gaponga (isca na pesca de tambaqui), ponteira de lança e arpão, anzol e no artesanato (PEREIRA, 1944; FERREIRA, 1972).

No final do século XVI a atividade comercial utilizando a carne fresca, a manteiga (a gordura extraída do animal), a mixira (carne frita e conservada na própria gordura do animal) e a carne seca (utilizando as técnicas portuguesas de salga e secagem) já havia começado. Porém, por volta do meio do século XVII houve um crescente aumento na exportação tanto para as grandes capitais (Manaus e Belém) quanto para os países europeus (PEREIRA, 1944). Ferreira (1903) relata que somente em dois anos da década de 1780 o Pesqueiro Real da Villa Franca (próximo a Santarém – PA) produziu o equivalente a mais de 1500 peixes-bois na forma de carne salgada e manteiga.

Com a caça indiscriminada, no ano de 1786 o naturalista Alexandre Rodrigues Ferreira, em um de seus relatos para a Corte Real Portuguesa sobre sua expedição pelo Brasil (FERREIRA, 1903, p. 171), já demonstrava certa preocupação com a conservação da espécie quando relatou:

Sem embargo de tantas utilidades, quantas são as que deste animal se tirão, nenhuma Policia tem até agora a sua pesca. Hum peixe-boy para chegar ao seu devido crescimento deve gastar annos; e em todos elles se harpoão a elto os que aparecem, não se distingue o tempo, em que as femeas andão prenes, porque ou prenes ou não, as perseguem; ellas não parem mais de 1 até 2 filhos por anno, e os filhos tirados do ventre das Mãys assim mortas para nada servem. Não se distingue o tempo da criação, porque antes hé felicidade para o harpoador, surpreender o filho para arpoar a Mãy; não se destingue a idade, porque pequenos, e grandes todos são harpodados. A vista do que nenhum espanto deve causar a sua raridade em alguns Lagos, onde não ha muitos annos, que se observão bastantes.

Porém, essa preocupação não foi levada a diante já que, mesmo assim a caça continuou se intensificando cada vez mais.

Com o passar dos séculos a mixira foi se tornando o principal produto comercial do peixe-boi, provavelmente por ter um maior tempo de conservação (três a quatro meses) e por ser mais apreciada (PEREIRA, 1944; DOMNING, 1982). Durante todo este período, o couro sempre foi sub-aproveitado por causa da

dificuldade na curtição sendo assim, na maioria das vezes, descartado pelos caçadores (FERREIRA, 1903). Porém, por volta de 1934 curtumes no sudeste do Brasil aprimoraram as técnicas de curtição do couro dando um pico na exploração do peixe-boi (MENDES, 1958; DOMNING, 1982). Seu couro, por ser grosso, resistente e durável, era utilizado na confecção de artigos para a indústria como polias, correias de transmissão, mangueiras, juntas, entre outros (PEREIRA, 1944; MENDES, 1958; DOMNING, 1982; BEST, 1984). Durante 20 anos estima-se que entre 80.000 a 140.000 peixes-bois foram mortos nos lagos do estado do Amazonas tendo o couro exportado para todo Brasil, Estados Unidos e países da Europa. Mas no ano de 1954 sua exportação cessou abruptamente por razões não muito claras. Possivelmente o comércio do couro terminou como resultado do aumento do uso de borracha e materiais sintéticos (DOMNING, 1982; BEST, 1984).

Apesar do fim da indústria do couro, o comércio de carne continuou na década de 50, sendo ampliado e tendo como principal produto a carne fresca devido à disponibilidade de refrigeração. A caça se tornou tão intensa nesse novo mercado promissor que voltou a apresentar picos de quase 7.000 animais caçados por ano na década de 60 (tendo isso ocorrido anteriormente no início da década de 40). Porém esse pico teve uma queda contínua no final da década de 60 até chegar ao ano de 1973 (ano em que a caça foi teoricamente banida no Brasil). Este declínio não pode ser justificado pela disponibilidade de substitutos sintéticos como na indústria do couro, podendo assim ser reflexo da diminuição populacional dos animais (DOMNING, 1982).

Desde 1973 o *T. inunguis* está citado no Apêndice I da CITES (como animal ameaçado de extinção). A espécie é protegida no Brasil desde 1967 pela Lei de Proteção à Fauna (nº 5.197, alterada para 7.653 em 1988) e a partir de 1998 pela Lei de Crimes Ambientais (nº 9.605). Atualmente, além do Brasil, a espécie também é protegida por lei na Colômbia e no Peru, e está classificada pela Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2006) e pelo Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA, 2001) como “Vulnerável”, tendo alto risco de extinção na natureza em médio prazo. Entretanto, a caça de subsistência ainda persiste, com certo grau comercial (BEST, 1982a; ROSAS; PIMENTEL, 2001; AGUILAR et al., 2006).

2.1.2 Aspectos alimentares e fisiologia digestiva

Os sirênios são os únicos mamíferos aquáticos estritamente herbívoros, sendo animais monogástricos e apresentando fermentação cecal (BEST, 1981). Os peixes-bois amazônicos passam de seis a oito horas por dia se alimentando sem apresentar um ritmo circadiano aparente, podendo ser observados comendo a qualquer hora do dia ou da noite (PEREIRA, 1944; BEST, 1981). Peixes-bois da Amazônia de vida-livre comem exclusivamente plantas aquáticas e semi-aquáticas, consumindo no mínimo 8% de seu peso vivo por dia com uma eficiência digestiva entre 45-70%, dependendo do teor de fibras e minerais do alimento (BEST, 1981; ROSAS, 1994).

Os sirênios apresentam um longo tempo de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal quando comparado com outros mamíferos (de um a três dias para mamíferos de médio e grande porte), sendo esses tempos somente próximos aos relatados para preguiça-de-três-dedos (*Bradypus tridactylus*) e coala (*Phascolarctos cinereus*) (WARNER, 1981; CORK; WARNER, 1983; FOLEY; ENGELHARDT; CHARLES-DOMINIQUE, 1995). O peixe-boi amazônico apresenta um tempo de passagem entre 5-7 dias (ITAVO; ROSAS; CAVALLANTE, 1996), o peixe-boi da Flórida entre 5-10 dias (LOMOLINO; EWEL, 1984; LARKIN; FOWLER; REEP, 2007) e o dugongo entre 6-7 dias (LANYON; MARSH, 1995), variando de acordo com o teor de fibra dos alimentos ingeridos.

2.1.3 Metabolismo

O peixe-boi amazônico apresenta uma baixa taxa metabólica, por volta de 64% menor do que a de mamíferos terrestres de tamanho similar. Este fator, juntamente com a baixa frequência respiratória e a tolerância a baixos níveis de oxigênio e altos níveis de gás carbônico, são os que provavelmente permitem a espécie realizar mergulhos de até mais de dez minutos de duração (GALLIVAN; BEST, 1980).

Segundo Best (1983), o grande acúmulo de tecido adiposo durante os períodos de maior disponibilidade de alimento (período de enchente e cheia dos rios) e a baixa taxa metabólica são fatores essenciais para a sobrevivência do animal durante as estações de secas prolongadas (época de baixíssima disponibilidade de alimento). A combinação destes dois aspectos poderia fornecer aproximadamente 200 dias de sobrevivência somente utilizando suas reservas de gordura como fonte de energia.

2.1.4 Aspectos reprodutivos

Mesmo com a realização de alguns estudos sobre os aspectos reprodutivos do peixe-boi amazônico nas últimas décadas (BEST, 1982b; PIMENTEL, 1998; NASCIMENTO et al., 2002; RODRIGUES, 2002; RODRIGUES et al., 2003; NASCIMENTO, 2004), as informações sobre a biologia reprodutiva da espécie continuam escassas.

Os testículos do peixe-boi da Amazônia são intra-abdominais e o dimorfismo sexual mais aparente para a espécie é o posicionamento da abertura genital, onde nos machos encontra-se mais próxima da cicatriz umbilical e nas fêmeas, mais próxima ao ânus. Ambos os sexos possuem duas mamas localizadas na inserção ventral das nadadeiras, sendo que as das fêmeas são mais desenvolvidas (MARMONTEL; ODELL; REYNOLDS III, 1992).

De acordo com Best (1982b), o *T. inunguis* apresenta sazonalidade reprodutiva, com os acasalamentos e nascimentos ocorrendo durante o período de enchentes e cheias dos rios, coincidindo com o período de maior disponibilidade de alimento (como relatado anteriormente). O ciclo estral é de aproximadamente 22 dias (NASCIMENTO, 2004), a gestação dura entre 11 a 12 meses (NASCIMENTO et al., 2002) e em cada gestação nasce um filhote (BEST, 1984).

A idade de maturidade sexual é desconhecida, mas acredita-se que seja entre 5 e 10 anos baseado em observações anatômicas feitas por Rodrigues et al. (2003) e em estimativas a partir dos dados para peixes-bois da Flórida (*T. manatus latirostris*) (MARMONTEL; ODELL; REYNOLDS III, 1992; ROSAS, 1994).

2.2 TESTOSTERONA – SÍNTESE, METABOLISMO E EXCREÇÃO

A testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona) (Figura 2) é um hormônio andrógeno tendo, como todo hormônio esteróide, a molécula de colesterol como seu precursor. Nos machos, a testosterona é produzida e secretada pelas células de Leydig nos testículos. Nas fêmeas, pequenas quantidades desse andrógeno são produzidas nas células da teca interna pela conversão de androstenediona e de desidroepiandrosterona (DHEA) a testosterona, sendo essa, importante na síntese de estradiol. A zona reticularis do córtex da adrenal também tem a capacidade de sintetizar alguns andrógenos, como androsterona, 4-androstene-3,17-diona, DHEA e 3 β ,11 β -diidroxi-4-androsten-17-diona, porém não consegue converter estes andrógenos a testosterona por falta da enzima 17-cetoesteróide redutase (NORMAN; LITWACK, 1997).

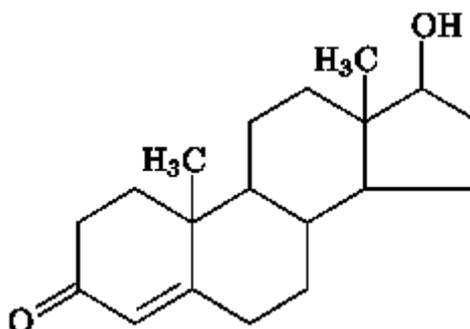


Figura 2 – Estrutura da molécula de testosterona

A síntese de testosterona está diretamente relacionada com a síntese de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas – *gonadotropin releasing hormone*) pelo hipotálamo, o qual irá estimular a liberação de LH (hormônio luteinizante – *luteinizing hormone*) pelo lóbulo anterior da hipófise. O LH, por sua vez, é o responsável pela estimulação da síntese de testosterona nas células de Leydig (NORMAN; LITWACK, 1997).

Parte da testosterona produzida se liga à ABP (proteína de ligação a andrógeno - *androgen binding protein*), produzida nas células de Sertoli, mantendo,

assim, altas concentrações de testosterona nos túbulos seminíferos, fato este, importante na espermatogênese. A outra parte é transportada para a corrente sanguínea para atuação em outras partes do organismo (NORMAN; LITWACK, 1997).

Devido às suas propriedades lipofílicas, as moléculas de andrógenos livres não são altamente solúveis em soluções aquosas como o sangue, podendo assim, passar rapidamente pelas membranas celulares atingindo os órgãos-alvo ou ser metabolizadas pelo fígado ou rim. Dessa forma, grande parte da testosterona presente no sangue (por volta de 91%) está ligada a globulinas ligadoras de hormônios sexuais (SHBG - *sex hormone binding globulin*) possibilitando um maior tempo de circulação do hormônio na corrente sanguínea, o restante está na forma livre (forma considerada biologicamente ativa – aproximadamente 3%) ou ligada à albumina (uma ligação fraca, facilmente dissociada para a disponibilização da testosterona – aproximadamente 6%) (NORRIS, 1997; NOZAKI, 2001).

A atuação dos andrógenos nos machos pode ser dividida em quatro categorias: 1 – promover o desenvolvimento do trato reprodutivo masculino (pênis, testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais, vasos deferentes e glândulas bulbouretrais); 2 – desenvolver os caracteres sexuais secundários masculinos (variando de acordo com cada espécie); 3 – promover um efeito estimulatório ou anabólico no desenvolvimento do corpo (crescimento dos ossos, desenvolvimento muscular, distribuição do tecido adiposo subcutâneo, crescimento de órgãos acessórios); e 4 – atuação no sistema nervoso central (diferenciação de determinadas áreas como hipotálamo e córtex cerebral e desenvolvimento da libido) (NORMAN; LITWACK, 1997).

Os andrógenos também apresentam um papel importante nas glândulas lacrimais, estimulando a secreção de lágrima, bem como, de seus constituintes químicos, como sódio, potássio, proteínas e anticorpos. Estudos demonstram que animais castrados apresentam uma redução no tamanho das glândulas lacrimais e em suas funções secretórias, sendo estas, reestabelecidas após a suplementação com andrógenos (SULLIVAN; BLOCH; ALLANSMITH, 1984; AZZAROLO et al., 1997; MATHERS et al., 1998).

Os esteróides circulantes no sangue passam pelas células acinares e ductos das glândulas salivares por difusão, devido sua solubilidade em membranas lipídicas, e atingem a saliva. Esse mecanismo parece ser possível somente para os

esteróides não-conjugados, pois os esteróides conjugados não são suficientemente lipossolúveis. A concentração dos esteróides salivares não é afetada por diferenças na intensidade de produção de saliva (RIAD-FAHMY et al., 1982; VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983). Em humanos, a testosterona salivar apresenta valores próximos dos encontrados para a testosterona livre no sangue e por volta de 2% da concentração de testosterona total sanguínea (RIAD-FAHMY et al., 1982; RILLING et al., 1996; FORDE et al., 2006).

Os hormônios esteróides presentes na circulação sanguínea são, em sua grande maioria, metabolizados no fígado, porém alguma atividade catabólica também ocorre nos rins (PALME et al., 1996; NORRIS, 1997; GRAHAM, 2004). Inicialmente os andrógenos têm as suas duplas ligações reduzidas, inativando as moléculas, e posteriormente são conjugados com glucoronídeos ou sulfatos tornando-os hidrossolúveis. Os metabólitos podem retornar à circulação sanguínea ou serem eliminados no duodeno através da bile. No sangue, os metabólitos são filtrados pelos rins e eliminados na urina (SENGER, 2005). Os metabólitos excretados no intestino podem sofrer ação bacteriana causando sua desconjugação. Após isto, podem ser reabsorvidos pela circulação entero-hepática e transportados para o fígado para serem conjugados novamente ou para os rins para serem excretados. Os metabólitos não reabsorvidos (conjugados e não-conjugados) são excretados pelas fezes (WHITTEN; BROCKMAN; STAVISKY, 1998; GRAHAM, 2004; TOUMA; PALME, 2005) (Figura 3).

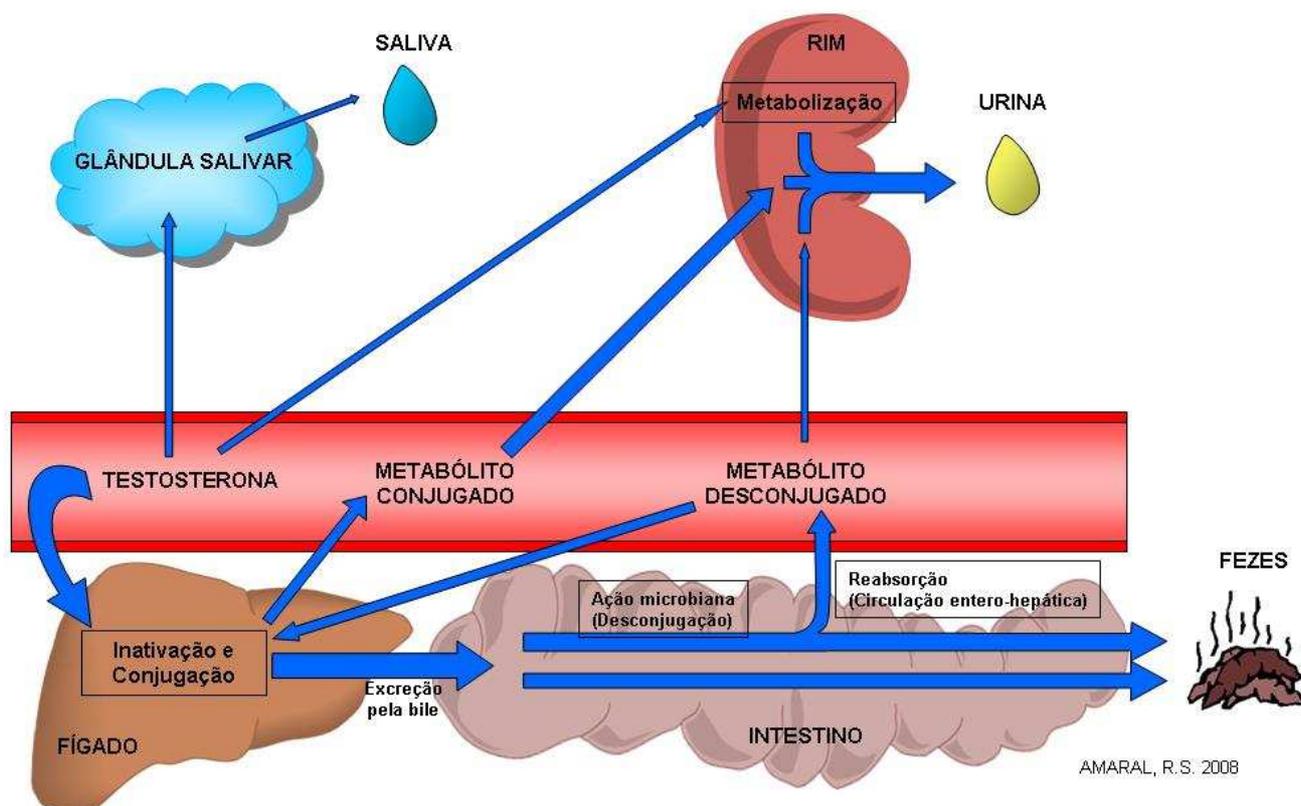


Figura 3 – Figura esquemática das rotas de metabolismo e excreção da testosterona

2.3 UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MATRIZES BIOLÓGICAS NA DOSAGEM HORMONAL

O estudo da endocrinologia reprodutiva, em animais domésticos, normalmente é realizado com amostras sanguíneas, necessitando, em estudos mais profundos, de coletas seriadas com intervalos curtos. Em animais selvagens e animais de pequeno porte, essas coletas podem ficar impossibilitadas devido ao estresse causado pela coleta (contenção física e/ou química do animal) (GUIMARÃES, 2003), risco de flebite (animais que não apresentam vaso periférico de fácil punção) e/ou por volume sanguíneo insuficiente (CHELINI et al., 2005).

A partir dos conhecimentos sobre a distribuição dos esteróides pela corrente sanguínea, a sua fácil passagem pelas membranas celulares, e seu metabolismo e vias de excreção, vários trabalhos vêm sendo realizados sobre a fisiologia reprodutiva de diferentes espécies de animais tanto de laboratório quanto domésticos e selvagens utilizando diferentes matrizes biológicas.

Atkinson et al (1999) mensuraram progesterona em amostras de secreção lacrimal de falsas-orcas (*Pseudorca crassidens*), porém não obtiveram correlação com amostras plasmáticas. Até o presente momento não existe relato da utilização de secreção lacrimal na dosagem de andrógenos em humanos ou animais, possivelmente devido ao baixo volume de amostra que se consegue obter na grande maioria dos animais. Entretanto, a secreção lacrimal em peixes-bois da Amazônia, como nos outros mamíferos aquáticos, é de consistência viscosa, espessa, transparente, e de produção constante, principalmente quando o animal se encontra fora d'água. Possivelmente esta secreção tem a função bacteriostática, lubrificante, de proteção corneal e de redução da resistência hidrodinâmica, como sugerido para golfinhos (YOUNG; DAWSON, 1992).

Amostras de saliva têm sido utilizadas na mensuração de esteróides reprodutivos femininos (estrógenos e progesterona) e de glucocorticóides em animais (VINCENT; MICHELL, 1992; PIETRASZEK; ATKINSON, 1994; CZEKALA; CALLISON, 1996; CROSS; PINES; ROGERS, 2004; CROSS; ROGERS, 2004; PEDERNEIRA-ROMANO et al., 2006). Já o uso de testosterona salivar tem sido muito relatado em estudos comportamentais e de puberdade em humanos, devido a sua grande facilidade de coleta (DABBS JR, 1993; HALPERN; UDRY;

SUCHINDRAN, 1998; CAMPBELL; SCHULTHEISS; MCCLELLAND, 1999; GRANGER et al., 1999; GRANGER et al., 2004; SCHULTHEISS; WIRTH; STANTON, 2004), entretanto, já existem relatos se sua utilização em estudos reprodutivos e/ou comportamentais de lobos (*Canis lupus*) (HORVÁTH; ÚJVÁRY; MIKLÓSI, 2007) e alguns mamíferos aquáticos mantidos em cativeiro como as focas-monges-do-Havaí (*Monachus schauinslandi*) (THEODOROU; ATKINSON, 1998) e os golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (HOGG; VICKERS; ROGERS, 2005).

Os andrógenos urinários vêm sendo muito utilizados em estudos sobre biologia reprodutiva e/ou comportamental de animais de laboratório, domésticos e selvagens (em cativeiro ou vida-livre) devido a sua facilidade de coleta, podendo até ser coletado diretamente do chão logo após a micção, e sua estreita correlação com os andrógenos sangüíneos (LASLEY, 1985; DRAISCI et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000; GANSWINDT et al., 2002; MÖHLE et al., 2002; HAGEY; CZEKALA, 2003; DECATANZARO et al., 2004; BUSSO et al., 2005; MARSHALL; HOHMANN, 2005).

Entretanto, o uso de andrógenos fecais em estudos reprodutivos é o de maior difusão, dentre as matrizes anteriormente citadas, por ser a de mais fácil obtenção e por necessitar de menor contato com o animal. Os andrógenos fecais já foram mensurados em várias espécies de mamíferos (domésticos, de laboratório e selvagens) e aves (LASLEY, 1985; BROWN; TERIO; GRAHAM, 1996; PALME et al., 1996; HIRSCHENHAUSER et al., 2000; MÖHLE et al., 2002; GUIMARÃES, 2003; DLONIAK et al., 2004; MORATO et al., 2004a; MORATO et al., 2004b; DIAS; OLIVEIRA, 2006; LIMA, 2006; SCHWARZENBERGER, 2007).

A principal rota de excreção (fezes ou urina), o principal metabólito excretado e sua forma (se conjugado ou livre) e o tempo entre a síntese do esteróide e a excreção de seu metabólito nas fezes ou urina podem variar consideravelmente entre as espécies e entre cada esteróide em uma mesma espécie animal (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WHITTEN; BROCKMAN; STAVISKY, 1998; GRAHAM, 2004). Estas informações são extremamente importantes para correlacionar os hormônios estudados com os eventos fisiológicos e/ou comportamentais observados, influenciando assim, em todo o delineamento experimental a ser feito.

O tempo para metabolização e excreção dos esteróides pela urina está relacionado com a taxa metabólica do animal, já a excreção pelas fezes, além da

taxa metabólica, está também relacionada com a taxa de passagem da digesta pelo trato intestinal (do duodeno – onde o metabólito foi excretado pela vesícula biliar – ao reto) (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WHITTEN; BROCKMAN; STAVISKY, 1998; MÖHLE et al., 2002; KRETZSCHMAR; GANSLOßER; DEHNHARD, 2004; PALME, 2005)

Uma forma para a determinação das vias e tempo de excreção dos esteróides e seus principais metabólitos de excreção é a aplicação de hormônios radiomarcados na corrente sanguínea e posterior realização de coletas seriadas, com intervalos curtos, de fezes e urina para a mensuração dos metabólitos radiomarcados. Porém, deve-se lembrar sempre dos riscos inerentes de utilização de substâncias radioativas em animais (GRAHAM, 2004). Este procedimento tem sido realizado em várias espécies de animais domésticos e selvagens como forma de validação fisiológica da metodologia empregada para a mensuração hormonal, além da determinação do tempo e rotas de excreção. Para a grande maioria dos animais o tempo de aparecimento dos metabólitos na urina é curto (menos de um dia), já nas fezes pode variar de 12 horas a três dias (HINDLE; HODGES, 1990; BROWN et al., 1994; MONFORT et al., 1995; BROWN; TERIO; GRAHAM, 1996; PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WASSER et al., 1996; MONFORT et al., 1997; BILLITTI; LASLEY; WILSON, 1998; HEISTERMANN et al., 1998; VELLOSO et al., 1998; MOORMAN et al., 2002; BUSSO et al., 2005; TOUMA; PALME, 2005).

Outra forma de garantir que as metodologias utilizadas nas análises hormonais são capazes de expressar os eventos fisiológicos ocorridos, além fornecer dados sobre o tempo para a excreção do metabólito, é a realização de desafios hormonais (PALME et al., 2005). Trata-se da administração de uma droga conhecidamente estimulante ou inibitória da produção hormonal para demonstrar a relação de causa-efeito entre a administração exógena e a subsequente produção hormonal. Para a avaliação dos hormônios andrógenos pode-se utilizar uma aplicação intramuscular de GnRH (que causará um pico de LH e posterior elevação nos níveis de testosterona) ou de hCG (gonadotrofina coriônica humana – *human chorionic gonadotropin*) que mimetizará a atuação do LH estimulando a produção de testosterona.

O pico de testosterona pode ser observado tanto no sangue quanto nas outras matrizes biológicas, sendo na forma de metabólito ou não. No sangue, já foi

observado em vários mamíferos que uma única dose intramuscular de GnRH exógeno causa um aumento nos níveis de LH em aproximadamente 30 minutos e um pico na testosterona plasmática entre uma a três horas após a aplicação (POST; REICH; BINDON, 1987; GILMORE et al., 1991; BENNETT et al., 1993; BENNETT; FAULKES; SPINKS, 1997; JUHÁSZ et al., 2000; SPINKS et al., 2000; HERBERT et al., 2004; BROWN-DOUGLAS et al., 2005; ALLEN et al., 2006; BEIJERINK et al., 2007; OOSTHUIZEN; BENNETT, 2007). Porém, nas outras matrizes biológicas, o tempo para o aparecimento dos picos de LH e andrógenos irá depender de outros fatores como a taxa metabólica, as vias de excreção do hormônio e fisiologia digestiva da espécie, conforme já descrito anteriormente.

2.3.1 Utilização de diferentes matrizes biológicas na dosagem hormonal em sirênios

Alguns estudos já foram realizados utilizando esteróides urinários ou fecais de sirênios. Com dugongos, Lanyon et al. (2005) mensuraram estrógenos e andrógenos fecais de animais de vida-livre para verificar a existência de diferenças nas concentrações hormonais entre os sexos e entre as faixas etárias, e Wakai et al. (2002) dosaram progestinas e estrógenos urinários em uma fêmea cativa monitorando suas variações durante dois anos. Com peixe-boi marinho da Flórida, foram utilizadas amostras fecais, tanto de animais cativos quanto de vida-livre, para analisar o ciclo estral, sazonalidade reprodutiva e diferenças nas concentrações hormonais entre os sexos e entre as faixas etárias, dosando progestinas, estrógenos e andrógenos (LARKIN, 2000; LARKIN; GROSS; REEP, 2005). Já para o peixe-boi da Amazônia, foram realizados trabalhos comparando andrógenos fecais de machos cativos com diferentes períodos do ciclo hidrológico dos rios da Amazônia e com a precipitação pluviométrica (PIMENTEL, 1998), e utilizando estrógenos e progestinas fecais para a verificação de sazonalidade e ciclo estral em fêmeas mantidas em cativeiro (NASCIMENTO, 2004). Até o presente momento, nenhum trabalho foi realizado com sirênios utilizando amostras de saliva ou secreção lacrimal na dosagem hormonal.

Porém, tendo em vista que os sirênios são animais que apresentam algumas características fisiológicas peculiares (como a taxa metabólica e a fisiologia

digestiva), todos os trabalhos relatam a necessidade de maior entendimento sobre o tempo entre a síntese e a excreção dos hormônios esteróides nas espécies estudadas para uma melhor compreensão dos resultados encontrados.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Determinar o tempo necessário para que um pico de testosterona sérica seja observado em outras matrizes biológicas tais como: fezes, urina, saliva e secreção lacrimal.
- Validar biologicamente a utilização de fezes, urina, saliva e secreção lacrimal como meios não-invasivos de mensuração de andrógenos por meio de radioimunoensaio.
- Determinar a eficiência e a aplicabilidade da dosagem de andrógenos por diferentes matrizes biológicas na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

As descrições sobre os animais e a metodologia utilizada seguem nos tópicos abaixo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados dois machos adultos de peixe-boi da Amazônia (Quadro 1) mantidos em cativeiro no Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus - AM, alojados juntamente com mais 20 animais em três piscinas circulares (10m X 2,5m de profundidade; 196m³) conectadas entre si por tanques de cambiamento (3,5m X 2,5m X 1,5m de profundidade; 13m³) (Figura 4). Cada tanque possui fonte de água e drenagem independente. A água é retirada de um poço artesiano e circula pelos tanques 24 horas por dia, tendo seus componentes químicos e físicos periodicamente analisados. A temperatura da água variou entre 27 e 29°C. Durante o período de experimentação, cada animal foi mantido no tanque de cambiamento para facilitar o manejo.

Os animais foram alimentados com capim colônia (*Brachiaria mutica*), além de verduras e legumes diversos, em porções variadas, com o total de alimentos não sendo inferior a 8% do peso de cada animal.

Animal	Idade (anos)	Peso (kg)	Tamanho (cm)
A-1	> 28	325	251
A-2	> 27	216	244

Quadro 1 – Características dos peixes-bois da Amazônia utilizados neste estudo



Figura 4 – Tanques dos peixes-bois da Amazônia no Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMA/INPA

4.2 DESAFIO HORMONAL

Os animais foram submetidos a um protocolo de experimentação de 12 dias (D-1 a D10). No D0, foi aplicado o análogo de GnRH (Lecirelina, Gestran Plus® - Tecnopec - São Paulo/SP) para promover a produção de um pico fisiológico de testosterona. A aplicação foi por via intramuscular, na região do pedúnculo caudal utilizando agulha 40X0,8mm, na dosagem de 0,7 μ g/Kg (Figura 5).



Figura 5 – Aplicação do análogo de GnRH na região do pedúnculo caudal de um *T. inunguis*

4.3 COLHEITA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As coletas foram realizadas diariamente (entre 08:00 e 09:00 horas) após a contenção física dos animais causada pela drenagem do tanque de cambiamento. Todo o material coletado era identificado com o nome do animal, data e hora da coleta e congelado a -20°C até a análise.

4.3.1 Fezes

A compressão do abdômen do animal no fundo do tanque devido à drenagem do cambiamento sempre resultava em defecação. As fezes eram coletadas imediatamente, com o soerguimento da nadadeira caudal, e condicionadas em sacos plásticos (Figura 6).



Figura 6 – Coleta de fezes de *T. inunguis* após drenagem do tanque de cambiamento. Seta: amostra de fezes

4.3.2 Urina

A urina foi obtida com a lateralização do animal e compressão abdominal na região da vesícula urinária seguindo a metodologia descrita por Pantoja (2004) e armazenadas em frascos plásticos (Figura 7). Para compensar as variações no consumo de água e no clearance renal, uma alíquota de cada amostra foi separada para dosagem de creatinina urinária (Cr).

4.3.3 Saliva

A coleta da saliva foi realizada com o auxílio de uma colher de metal, raspando levemente a mucosa bucal, e armazenada em frascos plásticos (Figura 8).

4.3.4 Secreção lacrimal

As amostras de secreção lacrimal foram coletadas, por gravidade, diretamente da face do animal, utilizando tubos plásticos, sendo estas armazenadas nos próprios tubos.



Figura 7 – Coleta de urina de *T. inunguis* por compressão abdominal na região da vesícula urinária



Figura 8 – Coleta de saliva de *T. inunguis* com o auxílio de uma colher de metal

4.4 ANÁLISE HORMONAL

Todo o material coletado foi dosado técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida para testosterona total utilizando o conjunto diagnóstico comercial Coat-A-Count® (Siemens, Los Angeles, CA, USA; antiga DPC Medlab) desenvolvido para dosagem hormonal em soro humano.

Este conjunto diagnóstico comercial é um teste de competição entre testosterona marcada (^{125}I) e testosterona não-marcada (testosterona da amostra), durante um tempo fixo, por sítios de ligação dos anticorpos específicos que se encontram imobilizados nas paredes dos tubos de polipropileno.

O anticorpo utilizado apresenta as seguintes reações cruzadas (fornecidas pelo fabricante): 100% testosterona, 20% 19-nortestosterona, 20% 4-estren-17-ol-3-ona, 16% 11-cetotestosterona, 3.3% 5 α -diidrotestosterona, 2.0% 19-hidroxiandrostenediona, 1.7% metiltestosterona, 1.1% 4-estren-7 α -metil-17 β -ol-3-ona, e <1% com (lista parcial) aldosterona, androstenediona, androsterona, 5-androsten-3 β ,17 β -diol, corticosterona, cortisol, cortisona, desidroepiandrosterona, estradiol, estrona, progesterona e 11 β -hidroxitesterona.

A etapa de análise hormonal foi realizada no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LDH-VRA-FMVZ/USP), São Paulo – SP.

4.4.1 Fezes

As amostras de fezes foram secas em um liofilizador a vácuo (Savant Instrument Speedvac Rotatory Evaporator, Forma Scientific Inc., OH, EUA) por 12 horas e peneiradas para remoção de alimentos não digeridos (pedaços de capim e sementes). O material foi submetido à extração hormonal utilizando o protocolo descrito por Graham et al. (2001).

Foi colocado 0,25g de fezes liofilizada e peneirada em um tubo de ensaio juntamente com 5mL de metanol 80%. Os tubos foram tampados e suavemente

agitados por 15 horas utilizando um homogeneizador de sangue (AP22, Phoenix, SP, Brasil). As amostras foram centrifugadas (500G, 15 minutos) e o sobrenadante separado e armazenado a -20°C até a análise.

Os extratos fecais obtidos foram diluídos (1:10) em tampão gelatina (0,061M $\text{H}_2\text{NaPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,041M $\text{H}_2\text{NaPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,015M NaN_3 ; 0,154M NaCl ; 1,0g gelatina; pH 7,0) antes do RIE. A dosagem hormonal foi realizada de acordo com as especificações do fabricante do conjunto diagnóstico comercial de RIE.

4.4.2 Urina

Antes do RIE, as amostras de urina foram submetidas a um processo de hidrólise ácida para quebra das ligações com os conjugados. Foi pipetado 1mL de urina para um tubo de ensaio e adicionado 200 μL de ácido clorídrico (HCl, 12N). Os tubos foram levemente tampados e incubados em banho-maria fervente por 15 minutos. Após isso, cada amostra de urina hidrolisada foi diluída (1:25) em soro bovino depletado (carvão-dextran) e em seguida analisada hormonalmente.

Toda etapa laboratorial foi realizada de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante do conjunto diagnóstico comercial de RIE, com exceção do uso de soro bovino depletado na diluição das amostras no lugar do calibrador “0” (soro humano limpo de hormônio) por ser uma opção de baixo custo e com resultados similares.

A creatinina urinária foi dosada colorimetricamente utilizando a reação de Jaffé (TAUSSKY, 1954). Esta análise foi realizada na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus – AM, usando o analisador químico Dade Behring Dimension AR (Diamond Diagnostics, MA, EUA).

4.4.3 Saliva

As amostras de saliva passaram por dois ciclos de congelamento e descongelamento, e posterior centrifugação para remoção dos mucopolissacarídeos

e outros resíduos. Após isso, foram submetidas a um protocolo de RIE adaptado das metodologias propostas por Schultheiss et al. (2004) e Campbell, Schultheiss e McClelland (1999) para aumentar a sensibilidade do teste.

Foram pipetados 200 μ L de saliva nos tubos de propileno e posteriormente foram incubados por 24 horas em temperatura ambiente. Após a primeira incubação, adicionou-se 1mL da testosterona radiomarcada e, então, os tubos foram para a segunda incubação por 16-24 horas em temperatura ambiente. O material foi decantado e os tubos foram medidos em contador gama por 2 minutos. Os calibradores utilizados na construção da curva padrão foram diluídos 20 vezes em água destilada.

4.4.4 Secreção lacrimal

Devido à característica peculiar das amostras de secreção lacrimal (formação de uma gelatina consistente após o congelamento), essas foram submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento, e posterior centrifugação, até que as amostras se apresentassem liqüefeitas. O ensaio hormonal foi realizado seguindo o protocolo adotado para as amostras de saliva.

4.4.5 Paralelismo

Foi realizado o teste de paralelismo utilizando matriz íntegra para avaliar se as matrizes interferiram na ligação antígeno-anticorpo. Para tal, adicionou-se uma concentração conhecida de testosterona a um “pool” de cada matriz com baixas concentrações hormonais, o qual posteriormente foi diluído seriadamente utilizando a própria matriz e dosado por RIE, comparando os resultados com a curva padrão. O paralelismo não foi realizado para as amostras de secreção lacrimal por não ter volume suficiente de amostras para a formação do “pool”.

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados nas amostras urinárias foram corrigidos com o valor de creatinina e expressos como ng/mg Cr, enquanto os andrógenos fecais foram expressos como ng/g de fezes secas. Já a testosterona salivar e a testosterona lacrimal foram expressas como pg/mL.

Devido ao número amostral ser pequeno, não foi possível realizar análises estatísticas mais refinadas. Por não se ter um número grande de amostras do período antes da aplicação hormonal, o qual possibilitaria o cálculo da média e do desvio padrão, sendo estes os rotineiramente utilizados para a definição de pico hormonal, optou-se por trabalhar com a mediana e o desvio interquartilico (DI) dos dados, onde, assim, poderia se diluir os efeitos pós tratamento hormonal. A mediana e o DI para cada matriz de cada animal foram calculados. Foi definido como pico para cada animal como qualquer valor que ultrapassasse o dobro do DI acima da mediana (pico > mediana+2DI) para cada matriz. O intervalo de tempo entre a aplicação hormonal e o pico de andrógeno para cada matriz foi determinado e comparado entre eles. Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre as matrizes para cada animal e os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

A análise do paralelismo foi realizada comparando os resultados obtidos com a curva padrão por regressão linear simples.

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando os programas estatísticos SPSS 12.0 (© SPSS, Inc.) e SigmaPlot 10.0 (© Systat Software, Inc.).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS ENSAIOS HORMONAIS

O controle de qualidade dos ensaios de RIE foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, o qual foi inferior a 13,30% para todas as matrizes. As doses mínimas detectadas foram de 0,34 ng/dL, 0,08 ng/dL, 2,73 ng/dL e 3,18 ng/dL de testosterona para os ensaios de saliva, secreção lacrimal, urina e fezes, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Controles de qualidade obtidos nos ensaios hormonais de andrógenos presentes na saliva, secreção lacrimal, urina e fezes de dois peixes-bois amazônicos machos adultos

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose ng/dL)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
Saliva	34152,5	48%	0,59%	98,9 (0,3448)	7,70%	12,49%
Secreção lacrimal	23336,3	56%	0,55%	99,5 (0,0784)	13,30%	1,44%
Urina	22778,5	46%	0,91%	90,8 (2,7253)	6,54%	8,02%
Fezes	36834,5	45%	0,30%	92,5 (3,1844)	1,63%	4,89%

5.2 PARALELISMO

Houve paralelismo entre a curva do conjunto diagnóstico comercial e as curvas de diluição das matrizes ($p < 0,05$ para as matrizes salivar, urinária e fecal) dentro do intervalo de confiança de 95%, onde demonstra que as matrizes não interferiram na ligação antígeno-anticorpo dos ensaios. Os resultados estão expressos na tabela 2 e nos gráficos 1, 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados da regressão linear para o teste de paralelismo entre as matrizes salivar, urinária e fecal de peixes-bois da Amazônia e a curva do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens)

Matriz	F (regressão)	p ^a	R2 (ajustado)	Equação
Saliva	2308,5730	0,0149	0,9991	$Y = 108,5381 + 1,0411.X$
Urina	1184,0250	0,0001	0,9966	$Y = 20,2244 + 0,6510.X$
Fezes	474,6079	0,0002	0,9916	$Y = 85,5676 + 0,5881.X$

a – Significância = $p < 0,05$

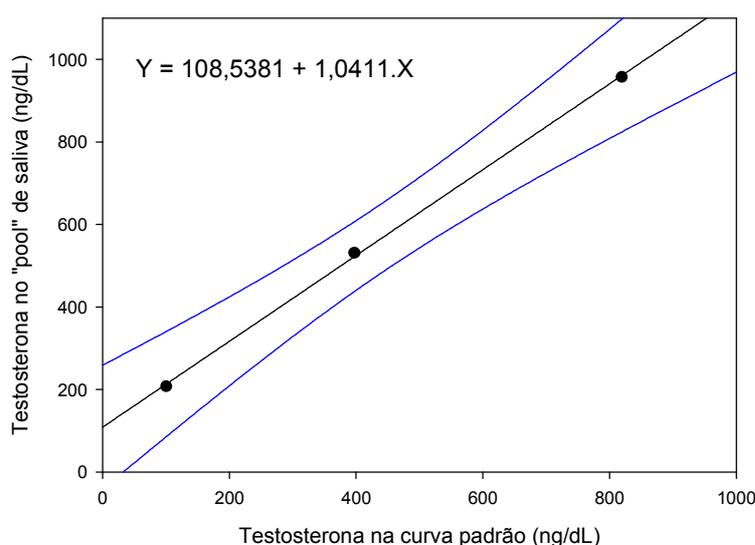


Gráfico 1 – Representação gráfica da regressão linear entre a matriz salivar de *T. inunguis* e a curva padrão do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens)

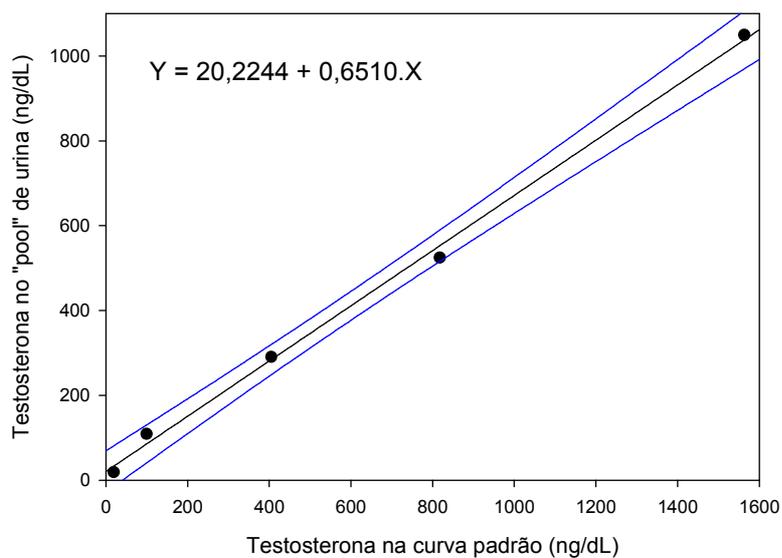


Gráfico 2 – Representação gráfica da regressão linear entre a matriz urinária de *T. inunguis* e a curva padrão do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens)

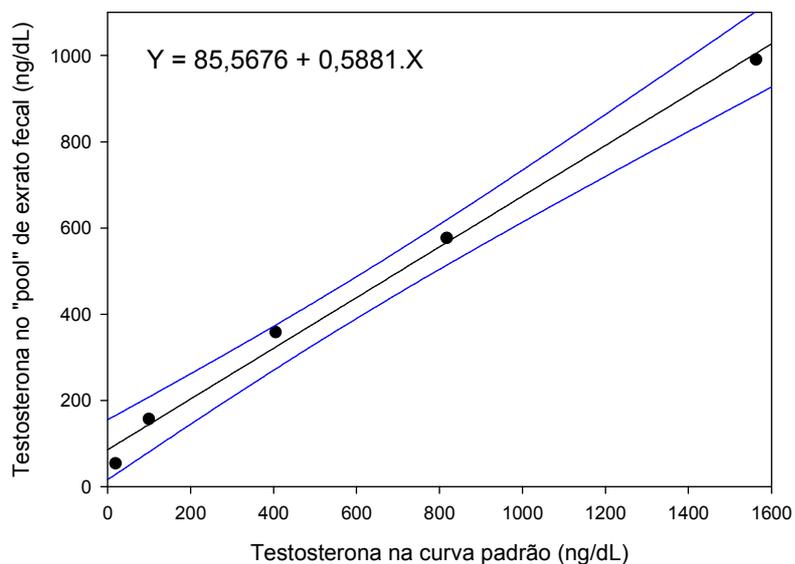


Gráfico 3 – Representação gráfica da regressão linear entre a matriz fecal de *T. inunguis* e a curva padrão do conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens)

5.3 DESAFIO HORMONAL

Os resultados obtidos nas dosagens hormonais e nas dosagens de Cr estão expressos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Resultados das dosagens de andrógenos salivares, lacrimais, fecais e urinários, e de creatinina urinária (Cr) de um peixe-boi amazônico macho (A-1) durante o desafio hormonal

Dias do desafio	A-1				
	Saliva (pg/mL)	Lágrima (pg/mL)	Fezes (ng/g fezes secas)	Urina (ng/mg Cr)	Cr (mg/dL)
D-1	45,14	9,11	109,87	23,64	20,9
D0	47,46	74,46	122,05	25,00	11,6
D1	49,90	42,45	155,72	17,90	8,0
D2	260,37	52,98	112,45	18,67	12,2
D3	146,39	81,71	157,68	22,26	18,4
D4	100,64	8,05	124,02	13,14	23,0
D5	678,89	222,68	126,92	648,16	32,6
D6	106,74	29,88	147,82	24,12	0,7
D7	256,50	59,15	139,35	44,79	33,4
D8	125,53	81,02	151,10	63,45	12,3
D9	55,44	76,03	172,27	69,54	13,0
D10	93,47	114,24	293,78	19,13	14,2

Tabela 4 – Resultados das dosagens de andrógenos salivares, lacrimais, fecais e urinários, e de creatinina urinária (Cr) de um peixe-boi amazônico macho (A-4) durante o desafio hormonal

Dias do desafio	A-2				
	Saliva (pg/mL)	Lágrima (pg/mL)	Fezes (ng/g fezes secas)	Urina (ng/mg Cr)	Cr (mg/dL)
D-1	231,68	111,58	147,47	201,87	10,6
D0	202,79	54,89	116,42	96,81	9,1
D1	399,92	100,88	138,43	243,21	4,7
D2	433,19	17,89	201,90	99,27	10,1
D3	733,71	163,29	289,68	370,44	9,5
D4	178,80	15,13	210,88	47,81	14,0
D5	245,23	12,14	350,10	18,47	22,4
D6	105,95	38,64	191,28	86,44	32,3
D7	301,48	37,57	443,64	70,47	8,7
D8	280,61	106,68	686,72	136,80	11,9
D9	168,41	89,95	445,86	128,47	19,4
D10	514,85	103,03	276,76	199,61	25,4

Foi possível observar, nos dois animais, um pico de andrógenos nas fezes, urina e saliva após o desafio hormonal (Tabela 5 e Gráfico 4). Porém, o pico de andrógenos somente foi tecnicamente observado no A-1 quando analisada a matriz lacrimal.

Tabela 5 – Análise dos andrógenos salivares, lacrimais, urinários e fecais de dois peixes-bois da Amazônia machos em resposta ao desafio hormonal com GnRH

Matriz	Animal	Mediana (DI) (n=12)	Pico ^a	Aumento (%)	Dias para o pico ^b
Saliva (pg/mL)	A-1	103,69 (119,86)	678,89	554,73	5
	A-2	262,92 (211,44)	733,71	179,06	3
Secreção lacrimal (pg/mL)	A-1	66,81(41,88)	222,68	233,33	5
	A-2	72,42 (73,04)	163,29*	125,48	3*
Urina (ng/mg Cr)	A-1	23,88 (30,44)	648,16	2614,05	5
	A-2	113,87 (117,73)	370,44	225,32	3
Fezes (ng/g fezes secas)	A-1	143,58 (32,38)	293,78	104,60	10
	A-2	243,82 (193,16)	686,72	181,65	8

a – Pico de andrógenos = >mediana + 2 DI.

b – Dias entre a aplicação do GnRH e a observação do pico de andrógenos.

* – Tecnicamente não caracterizado como pico (valor < mediana + 2 DI).

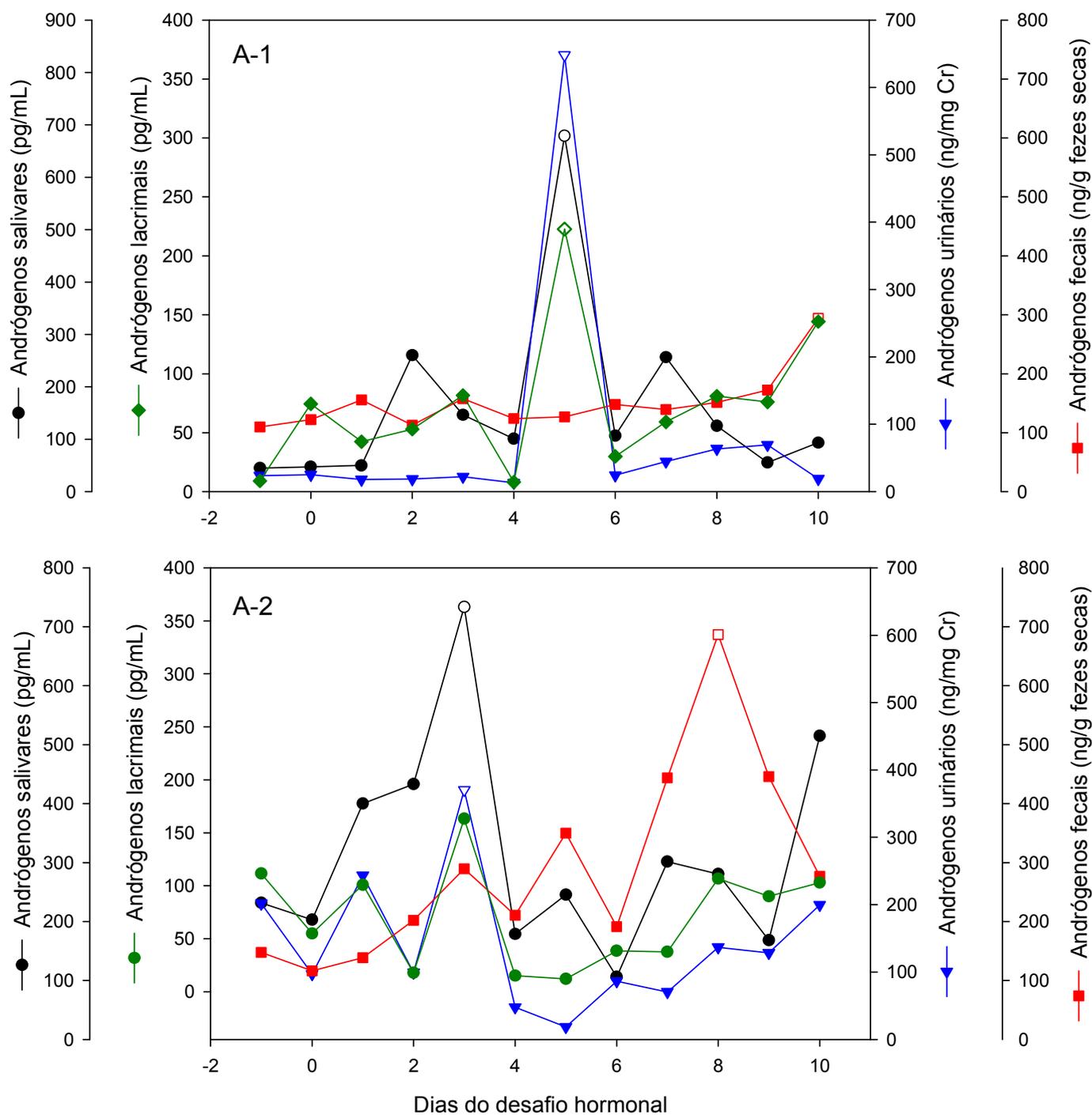


Gráfico 4 – Mudança na excreção de andrógenos salivares, lacrimais, urinários e fecais em resposta ao desafio hormonal com GnRH em dois peixes-bois da Amazônia machos mantidos em cativeiro (A-1 e A-2). O dia 0 representa o dia de administração do GnRH. Os símbolos abertos (○;◇;▽;□) indicam os picos de andrógenos

Observou-se uma correlação significativa entre as matrizes salivar, lacrimal e urinária para ambos os animais, fato esse não observado entre a matriz fecal e as outras matrizes (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados do teste de correlação linear de Pearson para as matrizes salivar, lacrimal, urinária e fecal de dois peixes-bois da Amazônia machos (A-1 e A-2) submetidos a um desafio hormonal com GnRH

Matrizes	A-1		A-2	
	r	p ^a	r	p ^a
Saliva X Lágrima	0,7825	0,0026	0,5815	0,0473
Saliva X Urina	0,9058	< 0,0001	0,7685	0,0035
Saliva X Fezes	-0,2091	0,5142	-0,0187	0,9540
Lágrima X Urina	0,8514	0,0004	0,9170	< 0,0001
Lágrima X Fezes	0,2494	0,4344	0,1443	0,6547
Urina X Fezes	-0,1515	0,6384	-0,1264	0,6955

a – Significância = $p < 0,05$

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O manejo populacional de uma espécie, tanto cativa quanto de vida-livre, necessita, como base, de conhecimentos prévios sobre a biologia da espécie em questão, sendo um dos pontos fundamentais as informações sobre a biologia reprodutiva. Alguns estudos foram realizados sobre a endocrinologia reprodutiva de sirênios (FRANCIS-FLOYD et al., 1991; PIMENTEL, 1998; LARKIN, 2000; NASCIMENTO et al., 2002; WAKAI et al., 2002; NASCIMENTO, 2004; LANYON; SMITH; CARRICK, 2005; LARKIN; GROSS; REEP, 2005). Entretanto, este é o primeiro trabalho realizando um desafio hormonal.

6.1 DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS SALIVARES

Como previsto, um pico de andrógenos foi observado nas amostras de saliva dos dois peixes-bois da Amazônia utilizados neste estudo. Porém, estes picos aconteceram depois do período esperado (poucas horas após a administração hormonal). Vários trabalhos têm demonstrado que as concentrações de testosterona salivar estão intimamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas em humanos devido à grande facilidade que a molécula de testosterona é transportada do sangue para a saliva (RIAD-FAHMY et al., 1982; VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983; DABBS JR, 1993; NEAVE et al., 2003; SCHULTHEISS; WIRTH; STANTON, 2004; WHEELER, 2006). Com isso, descartando a possibilidade de uma demora no transporte da testosterona plasmática para a saliva, o atraso observado neste estudo (5 e 3 dias para A-1 e A-2, respectivamente) pode ter ocorrido em consequência de uma ação retardada do GnRH exógeno no eixo hipófise-gonadal.

A escolha da agulha utilizada a aplicação intramuscular (40X0,8mm) foi baseada na rotina de manejo veterinário dos animais alojados no LMA – INPA (informação verbal)¹. Porém, possivelmente a agulha utilizada é curta para a administração de fármacos pela via intramuscular em peixe-boi da Amazônia (devido a sua grande espessura de pele e de camada de gordura

¹ Informação fornecida por D’Affonsêca Neto em Manaus, em 2005.

subcutânea (MENDES, 1958; VERÍSSIMO, 1970), fazendo com que a aplicação tenha ocorrido na camada de tecido adiposo subcutânea, levando, com isso, a um retardamento na absorção hormonal.

A absorção de fármacos pela via intramuscular ocorre tanto hematogenicamente como por via linfática e geralmente é rápida. Uma das desvantagens desta via é a possibilidade de deposição inadequada nos nervos, vasos sanguíneos, gordura ou entre as fibras musculares dos revestimentos de tecido conjuntivo. A taxa de absorção pela via subcutânea pode ser imprevisível e depende de vários fatores, sendo o mais importante o fluxo sanguíneo na região, porém, geralmente a taxa de absorção tende a ser mais lenta que pela via intramuscular. Alguns fármacos são absorvidos tão rapidamente nos tecidos subcutâneos como nos músculos, embora a absorção nos locais de aplicações em regiões com concentração de gordura subcutânea fique sempre significativamente retardada (FRASER et al., 1996; BROWN, 2001; SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2006).

Outro fator agravante para o atraso na absorção hormônio exógeno poderia ser a taxa metabólica extremamente baixa apresentada pelo *T. inunguis*, sendo equivalente a 36% da taxa de um mamífero terrestre de tamanho similar (GALLIVAN; BEST, 1980; BEST, 1981).

Entretanto, não existem trabalhos sobre farmacocinética na espécie para possibilitar o descarte de alguma dessas hipóteses (atraso na absorção pela aplicação no tecido adiposo e/ou pela baixa taxa metabólica). Baseado nisso, acredita-se que o GnRH exógeno tenha tido seu efeito (ativando o eixo hipófise-gonadal) entre os dias 4 e 5 para o animal A-1 e entre os dias 2 e 3 para o animal A-2.

6.2 DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS LACRIMAIS

Foi observado um aumento de testosterona nas amostras de secreção lacrimal em ambos os animais (D5 e D3 para A-1 e A-2, respectivamente), porém, somente no animal A-1 este aumento foi considerado tecnicamente como pico ($<$ mediana + 2 DI). Os baixos valores observados durante todo o desafio hormonal nas

amostras lacrimais e as baixas porcentagens de aumento observadas (179,06% e 125,48% para A-1 e A-2, respectivamente) sugerem que, apesar de ser possível dosar testosterona em amostras de secreção lacrimal, a matriz, nas condições propostas, não é capaz de expressar todas as possíveis variações hormonais que possam ocorrer no animal. Entretanto, como a matriz não foi validada laboratorialmente, realizando a teste de paralelismo, não se pode descartar uma possível interferência da matriz nas reações antígeno-anticorpo do ensaio.

O único trabalho realizado avaliando hormônios esteróides em secreção lacrimal foi realizado por Atkinson et al. (1999) mensurando progesterona em falsas-orcas. Entretanto, os autores não observaram correlação entre as amostras de secreção lacrimal e de plasma sanguíneo. Porém, para testosterona em peixe-boi amazônico, a matriz lacrimal apresentou uma correlação significativa com a matriz salivar ($p < 0,05$) e principalmente com a matriz urinária ($p < 0,0004$) nos dois animais, sugerindo uma possível correlação com a matriz sérica.

6.3 DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS URINÁRIAS

Os picos de andrógenos foram observados na urina após 5 e 3 dias, para A-1 e A-2 respectivamente. Apesar do peixe-boi amazônico apresentar uma baixa taxa metabólica, e do tempo de metabolização e excreção dos esteróides pela urina estar relacionado com a taxa metabólica do animal, os resultados obtidos não devem expressar o tempo real de metabolização e excreção dos andrógenos.

Considerando o atraso na ação do GnRH exógeno e a correlação significativa observada entre as amostras de saliva e urina em ambos os animais ($p < 0,01$), o pico observado nas amostras de urina provavelmente ocorreu poucas horas após o pico aparecer na corrente sanguínea, corroborando com o tempo de excreção dos andrógenos pela urina observado em outros mamíferos (menos de 24 horas) (MONFORT et al., 1995; PALME et al., 1996; BILLITTI; LASLEY; WILSON, 1998; WILLIAMS et al., 2000; MÖHLE et al., 2002; GRAHAM, 2004; BUSSO et al., 2005).

6.4 DESAFIO HORMONAL X AMOSTRAS FECAIS

O tratamento com GnRH também causou um aumento significativo dos andrógenos fecais nos dois machos utilizados nesse estudo (A-1 no D-8 e A-2 no D-10). Adotando o atraso na ação do GnRH exógeno, o intervalo entre o possível pico de testosterona no sangue (entre os dias 4 e 5 para o animal A-1 e entre os dias 2 e 3 para o animal A-2) e o pico de andrógenos observado nas fezes (entre cinco e seis dias para ambos os animais) foi maior do que os relatados para outras espécies de mamíferos herbívoros. O intervalo de tempo para o aparecimento dos andrógenos fecais é por volta de 12-24 horas em ruminantes e entre 24-50 horas em animais com fermentação cecal (equínos, suínos, rinocerontes, elefantes e primatas) (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; BROWN, 2000; MÖHLE et al., 2002; KRETZSCHMAR; GANSLOßER; DEHNHARD, 2004; SCHWARZENBERGER, 2007)

Os metabólitos de esteróides são excretados via bile dentro do duodeno e são transportados junto com o bolo fecal. Com isso, em espécies não-ruminantes, a excreção dos esteróides fecais está intimamente relacionada com a taxa de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; SCHWARZENBERGER, 2007). Os sirênios apresentam um longo tempo de passagem em comparação com o tempo de transito gastrointestinal de outros mamíferos (WARNER, 1981; LOMOLINO; EWEL, 1984; LANYON; MARSH, 1995; ITAVO; ROSAS; CAVALLANTE, 1996; LARKIN; FOWLER; REEP, 2007). Itavo, Rosas e Cavallante (1996) observaram um tempo de passagem gastrointestinal entre cinco e sete dias para peixes-boi da Amazônia, e este resultado corrobora com o tempo de excreção dos andrógenos pelas fezes observado no desafio hormonal (entre cinco e seis dias).

Os resultados não demonstraram correlação entre os andrógenos fecais e os andrógenos urinários, salivares ou lacrimais, sendo claramente explicado pelo curto período experimental e o grande intervalo entre os picos observados (cinco dias), sendo este influenciado pelas vias de excreção.

6.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS MATRIZES ANALISADAS

Como o pico de andrógenos foi observado tanto na urina quanto nas fezes, não foi possível definir uma principal rota de excreção de andrógenos para a espécie, sendo possível que o *T. inunguis* utilize as duas vias de excreção em proporções próximas. Uma maneira de provar esta hipótese seria a administração de andrógenos radiomarcados.

A administração de hormônios radioativamente marcados em animais domésticos e selvagens tem sido usada para determinar a rota de excreção, o tempo para a excreção e o tipo de metabólito excretado em maior quantidade na urina e nas fezes (HINDLE; HODGES, 1990; BROWN et al., 1994; MONFORT et al., 1995; BROWN; TERIO; GRAHAM, 1996; PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996; WASSER et al., 1996; MONFORT et al., 1997; BILLITTI; LASLEY; WILSON, 1998; HEISTERMANN et al., 1998; VELLOSO et al., 1998; MOORMAN et al., 2002; TOUMA et al., 2003; BUSSO et al., 2005). Entretanto, este procedimento é muito trabalhoso, necessitando coletas de amostras seriadas com curtos intervalos de tempo (30 minutos a três horas) durante duas semanas, impossibilitando assim a sua realização em peixes-bois amazônicos. Outro fator agravante é o risco inerente no uso de substâncias radioativas em animais (GRAHAM, 2004).

Os resultados demonstraram a viabilidade da utilização de amostras de saliva, urina e fezes para o monitoramento reprodutivo de peixes-bois da Amazônia machos. Porém, a escolha de qual matriz biológica será usada no manejo reprodutivo deve considerar a facilidade de coleta das amostras, as etapas laboratoriais necessárias e se a matriz escolhida será capaz de responder a questão levantada.

As amostras de saliva apresentam como desvantagens a necessidade de contato íntimo com o animal para a realização de sua coleta (drenagem do tanque e manipulação do animal), o baixo volume da amostra (em média 500 μ L) e a obrigatoriedade de um ajuste no protocolo de RIE (aumentando o tempo para a obtenção dos resultados). Sendo que, a grande vantagem é a proximidade com o evento fisiológico o qual está sendo demonstrado, sendo este fator de grande importância no manejo reprodutivo de espécies em cativeiro.

Do mesmo modo, as amostras de urina também necessitam de manipulação do animal para a sua coleta e de etapas laboratoriais mais laboriosas como a hidrólise para a desconjugação dos metabólitos e a dosagem de creatinina urinária para a correção dos resultados. Porém, a vantagem em sua utilização, assim como a saliva, é o fornecimento de resultados mais próximos do evento fisiológico.

Tanto para saliva quanto para urina, o problema da necessidade de drenagem do tanque para sua obtenção poderia ser resolvido com o condicionamento dos animais para colaborarem com as coletas, como já foi demonstrado com falsas-orcas (ATKINSON et al., 1999) e focas-monge-do-Havaí (*Monachus schauinsland*) (THEODOROU; ATKINSON, 1998) para coleta de saliva, e com orcas (*Orcinus orca*) (WALKER et al., 1988; ROBECK et al., 2004), golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (ROBECK et al., 2005), dugongos (WAKAI et al., 2002) e peixes-bois marinhos (COLBERT et al., 2001; LIMA et al., 2005) para coleta de urina.

Já as amostras de fezes, são as mais fáceis de serem obtidas, podendo ser coletadas boiando na água logo após a defecação. Porém, necessitam de liofilização e extração hormonal tornado sua manipulação laboratorial mais trabalhosa. Outro importante fator desfavorável à matriz fecal é o longo intervalo entre o resultado obtido e o evento fisiológico. Apesar destas desvantagens, é a única matriz de fácil trabalho em animais de vida-livre, por não necessitar de nenhum contato com o animal (nem mesmo visual) para a sua coleta. Os animais podem ser rastreados por radio-telemetria e as amostras coletadas nas proximidades de onde se encontra o animal podem ser aliadas a técnicas de análises genéticas para a identificação do indivíduo, como tem sido realizado com baleias-francas-do-Norte (*Eubalaena glacialis*) (ROLLAND et al., 2005; HUNT et al., 2006; ROLLAND et al., 2006).

Há uma necessidade de mais estudos sobre o uso de secreção lacrimal no monitoramento reprodutivo de peixes-bois da Amazônia machos, porém, nas condições aqui apresentadas, sua utilização é inviável por não ser capaz de demonstrar as variações hormonais ocorridas. Outros fatores que devem ser levado em consideração são a forma de coleta (necessidade de manipulação do animal) e a manipulação da amostra no laboratório (necessidade de vários ciclos de congelamento e descongelamento para liqüefazer a amostra e uso do protocolo ajustado como nas amostras salivares). Com isso, comparando as matrizes salivar e lacrimal, onde as desvantagens de uso são as mesmas, a primeira se apresenta como uma melhor opção já é capaz de expressar os eventos fisiológicos.

Esses resultados, apesar de serem provenientes de somente dois animais e do sexo masculino, podem ser utilizados como referência para estudos futuros sobre a fisiologia reprodutiva de peixes-bois da Amazônia fêmeas, além de outros sirênios. No entanto, é necessário sempre lembrar que a principal rota de excreção dos esteróides pode variar consideravelmente entre as espécies, bem como entre os esteróides em uma mesma espécie (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento, é possível concluir que:

- O conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens) foi validado biologicamente para a quantificação de andrógenos salivares, urinários e fecais de peixes-bois da Amazônia machos.
- Os andrógenos lacrimais, apesar de serem possíveis de ser mensurados pelo conjunto diagnóstico comercial Testosterona Total Coat-A-Count® (Siemens), aparentemente não são capazes de demonstrar os eventos fisiológicos em *T. inunguis* de forma confiável.
- As concentrações de andrógenos presentes na saliva, urina ou fezes são capazes de refletir consistentemente eventos fisiológicos, sendo uma importante ferramenta no monitoramento reprodutivo de *T. inunguis*.
- Apesar dos andrógenos fecais apresentarem um longo intervalo entre o evento fisiológico e sua observação, eles podem ser utilizados no monitoramento reprodutivo de peixes-bois da Amazônia de vida-livre devido à facilidade na coleta de amostras de fezes.
- Andrógenos salivares e urinários são capazes de refletir os eventos fisiológicos mais próximos de sua ocorrência, se tornando ferramentas mais acuradas para o manejo reprodutivo de peixes-bois amazônicos em cativeiro.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. V. C.; LUNA, F. O.; GUIMARÃES, D. A.; OLIVEIRA, J. M.; DUQUE, V. M. Caça e utilização do peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*) no Rio Arapiuns. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7., 2006, Ilhéus. **Resumos...** Ilhéus: UESC, 2006. p. 393.
- ALLEN, C. D.; MCKINNON, A. J.; LISLE, A. T.; D'OCCHIO, M. J.; JOHNSTON, S. D. Use of a GnRH agonist and hCG to obtain an index of testosterone secretory capacity in the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Journal of Andrology**, v. 27, n. 6, p. 720-724, 2006.
- ATKINSON, S.; COMBELLES, C.; VINCENT, D.; NACHTIGALL, P.; PAWLOSKI, J.; BREESE, M. Monitoring of progesterone in captive female false killer whales, *Pseudorca crassidens*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 3, p. 323-332, 1999.
- AYRES, J. M.; BEST, R. Estratégias para a conservação da fauna amazônica. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 7, p. 81-101, 1979. Suplemento.
- AZZAROLO, A. M.; MIRCHEFF, A. K.; KASWAN, R. L.; STANCZYK, F. Z.; CTENSCHNAIN, E.; BECKER, L.; NASSIR, B.; WARREN, D. W. Androgen support of lacrimal gland function. **Endocrine**, v. 6, n. 1, p. 39-45, 1997.
- BEIJERINK, N. J.; BUIJTELS, J. J. C. W. M.; OKKENS, A. C.; KOOISTRA, H. S.; DIELEMAN, S. J. Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1039-1045, 2007.
- BENNETT, N. C.; FAULKES, C. G.; SPINKS, A. C. LH responses to single doses of exogenous GnRH by social Mashona mole-rats: A continuum of socially induced infertility in the family Bathyergidae. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B, Biological Sciences**, v. 264, n. 1384, p. 1001-1006, 1997.
- BENNETT, N. C.; JARVIS, J. U. M.; FAULKES, C. G.; MILLAR, R. P. LH responses to single doses of exogenous GnRH by freshly captured Damaraland mole-rats, *Cryptomys damarensis*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 1, p. 81-86, 1993.

BEST, R. C. Foods and feeding habits of wild and captive Sirenia. **Mammal Review**, v. 11, n. 1, p. 3-29, 1981.

_____ A salvação de uma espécie: novas perspectivas para o peixe-boi da Amazônia. **Revista IBM**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 1982a.

_____ Seasonal breeding in the Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, v. 14, n. 1, p. 76-78, 1982b.

_____ Apparent dry-season fasting in Amazonian manatees (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, v. 15, n. 1, p. 61-64, 1983.

_____ The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: SIOLI, H. **The Amazon, limnology and landscape: ecology of a mighty tropical river and its basin**. 1. ed. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1984. p. 371-412.

BILLITTI, J. E.; LASLEY, B. L.; WILSON, B. W. Development and validation of a fecal testosterone biomarker in *Mus musculus* and *Peromyscus maniculatus*. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1023-1028, 1998.

BROWN-DOUGLAS, C. G.; FIRTH, E. C.; PARKINSON, T. J.; FENNESSY, P. F. The pituitary and testicular responses to GnRH challenge between 4 and 14 months of age in thoroughbred colts born in spring and autumn. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 3-4, p. 287-298, 2005.

BROWN, J. L. Reproductive endocrine monitoring of elephants: an essential tool for assisting captive management. **Zoo Biology**, v. 19, n. 5, p. 347-367, 2000.

BROWN, J. L.; TERIO, K. A.; GRAHAM, L. H. Fecal androgen metabolite analysis for noninvasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v. 15, n. 4, p. 425-434, 1996.

BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 776-786, 1994.

BROWN, S. A. Pharmacokinetics: disposition and fate of drugs in the body. In: ADAMS, H. R. **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 15-56.

BUSSO, J. M.; PONZIO, M. F.; DABBENE, V.; DE CUNEO, M. F.; RUIZ, R. D. Assessment of urine and fecal testosterone metabolite excretion in *Chinchilla lanigera* males. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 3-4, p. 339-351, 2005.

CALDWELL, D. K.; CALDWELL, M. C. Manatees: *Trichechus manatus*, *Trichechus senegalensis* and *Trichechus inunguis*. In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. J. **Handbook of marine mammals: the sirenians and baleen whales**. 1. ed. New York: Academic Press, 1985. p. 33-66.

CAMPBELL, K. L.; SCHULTHEISS, O. C.; MCCLELLAND, D. C. A necessary adjustment of protocol for use of DPC Coat-a-Count Total Testosterone assay with saliva. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 83-85, 1999.

CHELINI, M. O.; SOUZA, N. L.; ROCHA, A. M.; FELIPPE, E. C.; OLIVEIRA, C. A. Quantification of fecal estradiol and progesterone metabolites in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, p. 1711-1717, 2005.

COLBERT, D. E.; FELLNER, W.; BAUER, G. B.; MANIRE, C. A.; RHINEHART, H. L. Husbandry and research training of two Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **Aquatic Mammals**, v. 27, n. 1, p. 16-23, 2001.

CORK, S. J.; WARNER, A. C. I. The passage of digesta markers through the gut of a folivorous marsupial, the koala *Phascolarctos cinereus*. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 152, n. 1, p. 43-51, 1983.

CROSS, N.; PINES, M. K.; ROGERS, L. J. Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioral stress. **American Journal of Primatology**, v. 62, n. 2, p. 107-114, 2004.

CROSS, N.; ROGERS, L. J. Diurnal cycle in salivary cortisol levels in common marmosets. **Developmental Psychobiology**, v. 45, n. 3, p. 134-139, 2004.

CZEKALA, N. M.; CALLISON, L. Pregnancy diagnosis in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by salivary hormone analysis. **Zoo Biology**, v. 15, n. 1, p. 37-44, 1996.

DABBS JR, J. M. Salivary testosterone measurements in behavioral studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, n. 1, p. 177-183, 1993.

DECATANZARO, D.; MUIR, C.; BEATON, E. A.; JETHA, M. Non-invasive repeated measurement of urinary progesterone, 17 β -estradiol, and testosterone in developing, cycling, pregnant, and postpartum female mice. **Steroids**, v. 69, n. 10, p. 687-696, 2004.

DIAS, E. A.; OLIVEIRA, C. A. Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIA) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 5-11, 2006. Suplemento.

DLONIAK, S. M.; FRENCH, J. A.; PLACE, N. J.; WELDELE, M. L.; GLICKMAN, S. E.; HOLEKAMP, K. E. Non-invasive monitoring of fecal androgens in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, n. 1, p. 51-61, 2004.

DOMNING, D. P. Commercial exploitation of Manatee *Trichechus* in Brazil, c. 1785-1973. **Biological Conservation**, v. 22, n. 2, p. 101-126, 1982.

DOMNING, D. P.; HAYEK, L.-A. C. Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: *Trichechus*). **Marine Mammal Science**, v. 2, n. 2, p. 87-144, 1986.

DRAISCI, R.; PALLESCHI, L.; FERRETTI, E.; LUCENTINI, L.; CAMMARATA, P. Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1-2, p. 511-522, 2000.

FERREIRA, A. R. Memoria sobre o peixe-boy e do uso que lhe dão no estado do Grão Pará. **Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 12, n. 1, p. 169-174, 1903.

_____. **Viagem filosófica pelas capitânicas do Grão Pará, Rio Negro, Mato Grosso e Cuiabá: memórias, zoologia e botânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Conselho Federal de Cultura, 1972. 246 p.

FOLEY, W. J.; ENGELHARDT, W. V.; CHARLES-DOMINIQUE, P. The digesta passage, particle size, and *in vitro* fermentation rate in the three-toed sloth *Bradypus tridactylus* (Edentata: Bradypodidae). **Journal of Zoology**, v. 236, n. 1, p. 681-696, 1995.

FORDE, M. D.; KOKA, S.; ECKERT, S. E.; CARR, A. B.; WONG, D. T. Systemic assessments utilizing saliva: part 1 - general considerations and current assessments. **International Journal of Prosthodontics**, v. 19, n. 1, p. 43-52, 2006.

FRANCIS-FLOYD, R.; WHITE, J. R.; CHEN, C. L.; CARDEILHAC, P. T.; CICHRA, C. E. Serum progesterone and estradiol concentrations in captive manatees *Trichechus manatus*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, n. p. 70-73, 1991.

FRASER, C. M.; BERGERON, J. A.; MAYS, A.; AIELLO, S. E. **Manual merk de veterinária**: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7. ed. São Paulo: Roca, 1996. 2169 p.

GALLIVAN, G. J.; BEST, R. C. Metabolism and respiration of the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). **Physiological Zoology**, v. 53, n. 3, p. 245-253, 1980.

GANSWINDT, A.; HEISTERMANN, M.; BORRAGAN, S.; HODGES, J. K. Assessment of testicular endocrine function in captive African elephants by measurement of urinary and fecal androgens. **Zoo Biology**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2002.

GILMORE, D. P.; PERES DA COSTA, C.; VALENÇA, M.; DUARTE, D. P. F.; WILSON, C. A.; GRAY, C. E. Effects of exogenous LHRH on plasma LH and sex steroid levels in the three-toed sloth *Bradypus tridactylus*. **Medical Science Research**, v. 19, n. 1, p. 333-335, 1991.

GRAHAM, L. H. Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 91-98, 2004.

GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

GRANGER, D. A.; SCHWARTZ, E. B.; BOOTH, A.; ARENTZ, M. Salivary testosterone determination in studies of child health and development. **Hormones and Behavior**, v. 35, n. 1, p. 18-27, 1999.

GRANGER, D. A.; SHIRTCLIFF, E. A.; BOOTH, A.; KIVLIGHAN, K. T.; SCHWARTZ, E. B. The "trouble" with salivary testosterone. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 10, p. 1229-1240, 2004.

GUIMARÃES, M. A. B. V. The importance of the application of non-invasive techniques in the study of wild animal reproduction. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 29-37, 2003.

HAGEY, L. R.; CZEKALA, N. M. Comparative urinary androstanes in the great apes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 64-69, 2003.

HALPERN, C. T.; UDRY, J. R.; SUCHINDRAN, C. Monthly measures of salivary testosterone predict sexual activity in adolescent males. **Archives of Sexual Behavior**, v. 27, n. 5, p. 445-465, 1998.

HEATON, H. C. **The discovery of the Amazon according to the account of Friar Gaspar de Carvajal and others documents**. New York: AMS Press, 1970. 467 p.

HEISTERMANN, M.; AGIL, M.; BÜTHE, A.; HODGES, J. K. Metabolism and excretion of oestradiol-17b and progesterone in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1-4, p. 157-172, 1998.

HERBERT, C. A.; TRIGG, T. E.; RENFREE, M. B.; SHAW, G.; ECKERY, D. C.; COOPER, D. W. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist implant on reproduction in a male marsupial, *Macropus eugenii*. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1836-1842, 2004.

HINDLE, J. E.; HODGES, J. K. Metabolism of oestradiol-17b and progesterone in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 2, p. 571-580, 1990.

HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; PÉCZELY, P.; WALLNER, B.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Seasonal relationships between plasma and fecal testosterone in response to GnRH in domestic ganders. **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 262-272, 2000.

HOGG, C. J.; VICKERS, E. R.; ROGERS, T. L. Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 814, n. 2, p. 339-346, 2005.

HORVÁTH, Z.; ÚJVÁRY, D.; MIKLÓSI, Á. Dominance and social stress in the gray wolf (*Canis lupus*): an analysis of testosterone and cortisol levels in saliva from a captive pack. In: INTERNATIONAL ZOO AND WILDLIFE RESEARCH CONFERENCE ON BEHAVIOUR, PHYSIOLOGY AND GENETICS, 6, 2007, Berlin. **Contributions...** Berlin: Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research - IZW, 2007. p. 109.

HUNT, K. E.; ROLLAND, R. M.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 260-272, 2006.

HUSAR, S. L. *Trichechus inunguis*. **Mammalian Species**, v. 72, n. 1, p. 1-4, 1977.

IBAMA **Mamíferos aquáticos do Brasil**: plano de ação, versão II. 2. ed. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2001. 102 p.

ITAVO, R. V.; ROSAS, F. C. W.; CAVALLANTE, A. P. Tempo de passagem do alimento no trato digestivo do peixe-boi da Amazônia, *Trichechus inunguis*, em cativeiro. In: REUNIÓN DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUÁTICOS DE AMÉRICA DEL SUR & CONGRESO SOLAMAC, 7., 1996, Viña del Mar. **Resúmenes...** Viña del Mar: Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos - SOLAMAC, 1996. p. 105.

IUCN. **2006 IUCN Red List of Threatened Species**. Gland: The World Conservation Union, 2006. Disponível em: < <http://www.iucn.org> >. Acesso em: 15 ago. 2007.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, G. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 69, n. 4, p. 247-259, 2000.

KRETZSCHMAR, P.; GANSLOßER, U.; DEHNHARD, M. Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2004.

LANYON, J. M.; MARSH, H. Digesta passage times in the dugong. **Australian Journal of Zoology**, v. 43, n. 2, p. 119-127, 1995.

LANYON, J. M.; SMITH, K. M.; CARRICK, F. N. Reproductive steroids are detectable in the faeces of dugongs. **The Australian Zoologist**, v. 33, n. 2, p. 247-250, 2005.

LARKIN, I. L. V. **Reproductive endocrinology of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*): estrous cycles, seasonal patterns and behavior**. 2000. 354 f. Dissertation (Philosophy Doctor) - Department of Physiological Sciences, University of Florida, Gainesville, 2000.

LARKIN, I. L. V.; FOWLER, V. F.; REEP, R. L. Digesta passage rates in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 6, p. 503-515, 2007.

LARKIN, I. L. V.; GROSS, T. S.; REEP, R. L. Use of faecal testosterone concentrations to monitor male Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) reproductive status. **Aquatic Mammals**, v. 31, n. 1, p. 52-61, 2005.

LASLEY, B. L. Methods for evaluating reproductive function in exotic species. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 30, n. 1, p. 209-228, 1985.

LIMA, A. B. F. **Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* - E. GEOFFROY, 19806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LIMA, D. S.; VERGARA-PARENTE, J.-E.; YOUNG, R.-J.; PASZKIEWICZ, E. Training of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* (Linnaeus, 1758) as a management technique for individual welfare. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 4, n. 1, p. 61-68, 2005.

LOMOLINO, M. V.; EWEL, K. C. Digestive efficiencies of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*). **Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 176-179, 1984.

MARMONTEL, M.; ODELL, D. K.; REYNOLDS III, J. E. Reproductive biology of South American manatees. In: HAMLETT, W. C. **Reproductive biology of South American vertebrates**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 295-312.

MARSHALL, A. J.; HOHMANN, G. Urinary testosterone levels of wild male bonobos (*Pan paniscus*) in the Lomako Forest, Democratic Republic of Congo. **American Journal of Primatology**, v. 65, n. 1, p. 87-92, 2005.

MARSHALL, C. D.; MAEDA, H.; IWATA, M.; FURUTA, M.; ASANO, S.; ROSAS, F.; REEP, R. L. Orofacial morphology and feeding behaviour of the dugong, Amazonian,

West African and Antillean manatees (Mammalia: Sirenia): Functional morphology of the muscular-vibrissal complex. **Journal of Zoology**, v. 259, n. 3, p. 245-260, 2003.

MATHERS, W. D.; STOVALL, D.; LANE, J. A.; ZIMMERMAN, M. B.; JOHNSON, S. Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production. **Cornea**, v. 17, n. 4, p. 353-358, 1998.

MENDES, A. **As pescarias amazônicas e a piscicultura no Brasil**: notas e sugestões. 1. ed. São Paulo: Livraria e Editora Record, 1958. 181 p.

MÖHLE, U.; HEISTERMANN, M.; PALME, R.; HODGES, J. K. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 135-145, 2002.

MONFORT, S. L.; HARVEY, E.; GEURTS, L.; PADILLA, L.; SIMMONS, H. A.; WILLIAMSON, L. R.; WILDT, D. E. Urinary 3 α ,17 β -androstanediol glucuronide is a measure of androgenic status in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 3, p. 700-706, 1995.

MONFORT, S. L.; WASSER, S. K.; MASHBURN, K. L.; BURKE, M.; BREWER, B. A.; CREEL, S. R. Steroid metabolism and validation of noninvasive endocrine monitoring in the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Zoo Biology**, v. 16, n. 6, p. 533-548, 1997.

MOORMAN, E. A.; MENDOZA, S. P.; SHIDELER, S. E.; LASLEY, B. L. Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **American Journal of Primatology**, v. 57, n. 2, p. 79-90, 2002.

MORATO, R. G.; BUENO, M. G.; MALMHEISTER, P.; VERRESCHI, I. T. N.; BARNABE, R. C. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1903-1907, 2004a.

MORATO, R. G.; VERRESCHI, I. T. N.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R. C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1273-1281, 2004b.

NASCIMENTO, C. C. **Avaliação da função reprodutiva de fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883), mantidas em cativeiro, por**

meio da extração e dosagem de esteróides fecais. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NASCIMENTO, C. C.; OLIVEIRA, C. A.; DA SILVA, V. M. F.; D'AFFONSÊCA NETO, J. A. Estimativa do período de gestação em fêmeas de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), mantidas em cativeiro, com base nos níveis plasmáticos de progesterona. In: REUNIÓN DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUÁTICOS DE AMÉRICA DEL SUR & CONGRESSO SOLAMAC, 10., 2002, Valdivia. **Libro de Resúmenes...** Valdivia: Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos - SOLAMAC, 2002. p. 41-42.

NEAVE, N.; LAING, S.; FINK, B.; MANNING, J. T. Second to fourth digit ratio, testosterone and perceived male dominance. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B, Biological Sciences**, v. 270, n. 1529, p. 2167-2172, 2003.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 558 p.

NORRIS, D. O. **Vertebrate endocrinology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 634 p.

NOZAKI, O. Steroid analysis for medical diagnosis. **Journal of Chromatography A**, v. 935, n. 1-2, p. 267-278, 2001.

OOSTHUIZEN, M. K.; BENNETT, N. C. LH responses to single doses of exogenous GnRH in the Cape mole rat (*Georychus capensis*): the pituitary potential for opportunistic breeding. **Journal of Zoology**, v. 271, n. 1, p. 198-202, 2007.

PALME, R. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75-80, 2005.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M. N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MÖSTL, E. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, n. 1, p. 162-171, 2005.

PANTOJA, T. M. A. **Análise física e química da urina de *Trichechus inunguis* (Mammalia, Sirenia): valores-referência para o peixe-boi da Amazônia.** 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia de Água Doce e Pesca Interior)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

PEDERNERA-ROMANO, C.; VALDEZ, R. A.; SINGH, S.; CHIAPPA, X.; ROMANO, M. C.; GALINDO, F. Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): A non-invasive technique. **Animal Welfare**, v. 15, n. 4, p. 359-362, 2006.

PEREIRA, M. N. O peixe-boi da Amazônia. **Boletim do Ministério da Agricultura**, v. 33, n. 5, p. 21-95, 1944.

PIETRASZEK, J.; ATKINSON, S. Concentrations of estrone sulfate and progesterone in plasma and saliva, vaginal cytology, and bioelectric impedance during the estrous cycle of the Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). **Marine Mammal Science**, v. 10, n. 4, p. 430-441, 1994.

PIMENTEL, G. P. **Determinação da testosterona presente nas fezes do peixe-boi da Amazônia *Trichechus inunguis* (Sirenia: Trichechidae), utilizando a técnica de radioimunoensaio.** 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Oceanografia Biológica)) - Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

POST, T. B.; REICH, M. M.; BINDON, B. M. Characterization of LH and testosterone responses to intramuscular injection of GnRH in tropical postpubertal bulls. **Theriogenology**, v. 27, n. 2, p. 305-315, 1987.

REEP, R. L.; MARSHALL, C. D.; STOLL, M. L. Tactile hairs on the postcranial body in Florida manatees: a Mammalian lateral line? **Brain Behavior and Evolution**, v. 59, n. 3, p. 141-154, 2002.

RIAD-FAHMY, D.; READ, G. F.; WALKER, R. F.; GRIFFITHS, K. Steroids in saliva for assessing endocrine function. **Endocrine Reviews**, v. 3, n. 4, p. 367-395, 1982.

RILLING, J. K.; WORTHMAN, C. M.; CAMPBELL, B. C.; STALLINGS, J. F.; MBIZVA, M. Ratios of plasma and salivary testosterone throughout puberty: Production versus bioavailability. **Steroids**, v. 61, n. 6, p. 374-378, 1996.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GEARHART, S.; REIDARSON, T. R.; MCBAIN, J. F.; MONFORT, S. L. Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 650-660, 2004.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; YOSHIOKA, M.; JENSEN, E.; O'BRIEN, J. K.; KATSUMATA, E.; GILI, C.; MCBAIN, J. F.; SWEENEY, J.; MONFORT, S. L. Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Reproduction**, v. 129, n. 5, p. 659-674, 2005.

RODRIGUES, F. R. **Características anatômicas e histológicas do aparelho reprodutor feminino de *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883) (Mammalia: Sirenia)**. 2002. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia de Água Doce e Pesca Interior)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade do Amazonas, Manaus, 2002.

RODRIGUES, F. R.; DA SILVA, V. M. F.; MARQUES, J. F.; LAZZARINI, S. M. Evidence of infertile estrus cycles before the first conception on a female Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) kept in captivity at the Aquatic Mammals Laboratory, Amazon, Brazil. In: BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 15., 2003, Greensboro. **Abstracts...** Greensboro: Society of Marine Mammalogy, 2003. p. 138.

ROLLAND, R. M.; HAMILTON, P. K.; KRAUS, S. D.; DAVENPORT, B.; GILLET, R. M.; WASSER, S. K. Faecal sampling using detection dogs to study reproduction and health in North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*). **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 8, n. 2, p. 121-125, 2006.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 308-317, 2005.

ROSAS, F. C. W. Biology, conservation and status of the Amazonian manatee *Trichechus inunguis*. **Mammal Review**, v. 24, n. 2, p. 49-59, 1994.

ROSAS, F. C. W.; PIMENTEL, T. L. Order Sirenia (manatees, dugongs and sea cows). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 352-362.

SCHULTHEISS, O. C.; WIRTH, M. M.; STANTON, S. J. Effects of affiliation and power motivation arousal on salivary progesterone and testosterone. **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 5, p. 592-599, 2004.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52-74, 2007.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 515-526, 1996.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, 2005. 368 p.

SPINKS, A. C.; BENNETT, N. C.; FAULKES, C. G.; JARVIS, J. U. M. Circulating LH levels and the response to exogenous GnRH in the common mole-rat: Implications for reproductive regulation in this social, seasonal breeding species. **Hormones and Behavior**, v. 37, n. 3, p. 221-228, 2000.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897 p.

SULLIVAN, D. A.; BLOCH, K. J.; ALLANSMITH, M. R. Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: androgen regulation of secretory component levels in rat tears. **The Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1130-1135, 1984.

TAUSSKY, H. H. A microcolorimetric determination of creatinine in urine by the Jaffe reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 208, n. 1, p. 853-851, 1954.

THEODOROU, J.; ATKINSON, S. Monitoring total androgen concentrations in saliva from captive Hawaiian monk seals (*Monachus Schauinslandi*). **Marine Mammal Science**, v. 14, n. 2, p. 304-310, 1998.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 54-74, 2005.

TOUMA, C.; SACHSER, N.; MÖSTL, E.; PALME, R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **General and Comparative Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 267-278, 2003.

VELLOSO, A. L.; WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; DIETZ, J. M. Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, n. 1, p. 96-107, 1998.

VERÍSSIMO, J. **A pesca na Amazônia**. 1. ed. Belém: Universidade Federal do Pará, 1970. 130 p.

VINCENT, I. C.; MICHELL, A. R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 3, p. 342-345, 1992.

VINING, R. F.; MCGINLEY, R. A.; SYMONS, R. G. Hormones in saliva: Mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1752-1756, 1983.

WAKAI, Y.; HASEGAWA, K.; SAKAMOTO, S.; ASANO, S.; WATANABE, G.; TAYA, K. Annual changes of urinary progesterone and estradiol-17 β of the dugong (*Dugong dugon*) in captivity. **Zoological Science**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2002.

WALKER, L. A.; CORNELL, L.; DAHL, K. D.; CZEKALA, N. M.; DARGEN, C. M.; JOSEPH, B.; HSUEH, A. J.; LASLEY, B. L. Urinary concentrations of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales (*Orcinus orca*) during ovarian cycles and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 5, p. 1013-1020, 1988.

WARNER, A. C. I. Rate of passage digesta through the gut of mammals and birds. **Nutritional Abstracts Review Series B**, v. 51, n. 1, p. 789-820, 1981.

WASSER, S. K.; PAPAGEORGE, S.; FOLEY, C.; BROWN, J. L. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 102, n. 2, p. 255-262, 1996.

WHEELER, M. J. Measurement of androgens. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 324, n. 1, p. 197-211, 2006.

WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 41, n. 1, p. 1-23, 1998.

WILLIAMS, T. M.; KIND, A. J.; HYDE, W. G.; HILL, D. W. Characterization of urinary metabolites of testosterone, methyltestosterone, mibolerone and boldenone in greyhound dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 121-129, 2000.

YOUNG, N. M.; DAWSON, W. W. The ocular secretions of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. **Marine Mammal Science**, v. 8, n. 1, p. 57-68, 1992.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)