



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**Departamento de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Zoologia**



**HERIBERTO BARBOSA MOYANO**

**Monitoramento do estresse em curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) e sua  
relação com o temperamento**

Março 2018

**ILHÉUS – BAHIA**

**HERIBERTO BARBOSA MOYANO**

**Monitoramento do estresse em curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) e sua  
relação com o temperamento**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, como cumprimento dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Siqueira da Cunha Nogueira

Março 2018

**ILHÉUS – BAHIA**

ii

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha avó pela companhia constante.

À minha Mami e Papi pelo amor e noites sem dormir pensando em meu bem-estar.

A todos os professores que fizeram parte de minha curta estadia na UESC, incluindo a Profa. Dr<sup>a</sup> Selene Nogueira pela orientação neste processo de formação.

Ao laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná em especial a Profa. Dr<sup>a</sup> Rosana Moraes pelo processamento das amostras e por estar sempre prestes a minhas dúvidas.

A Ilhéus e seus habitantes quem sempre estiveram prestes. Um abraço e dois cheiros.

Aos meus companheiros e amigos da turma pelos ensinamentos nas diversas áreas da Zoologia e pelas primeiras aulas de português.

A Djalma, Leticia e Erika meus amigos de batalha. Obrigado pela companhia e amizade bonita que me ofereceram.

A meus amigos Deisy, Roger, Omar, Jonas, Vanessa, Ramon e a todos os que compõem o grupo latino pela companhia e por ser aquela escapatória e refúgio para falar um pouco espanhol.

As meninas Megas Luana, Julieta, Carla, Meire e Andrea pelo carinho e bonita companhia.

A grande e única oportunidade que me ofereceu a OEA e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras para fazer parte da UESC e continuar com meus estudos.

Finalmente, a Rodrigo para quem a palavra Gracias é pequena ao se comparar com tudo o apoio e força que sempre esteve disposto a me auxiliar. Simplesmente sem você não teria sido possível.

## Monitoramento do estresse em curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) e sua relação com o temperamento

### RESUMO

O curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) é uma ave que pertence à ordem Passeriforme e família Thraupidae. No Brasil, o canto característico desta espécie é muito apreciado promovendo grande incidência de criadouros registrados pelo sistema de cadastro de criadores amadores de passeriformes (SISPASS), no entanto, nada sabemos sobre sua resposta ao estresse. O monitoramento não invasivo do estresse tem sido uma prática importante para avaliar o bem-estar de animais em cativeiro. Desta forma o objetivo da presente pesquisa, foi validar a eficácia da técnica imuno-enzimática (EIA) para monitorar, de forma não invasiva, o estresse de 12 machos da espécie por meio de metabólitos de glicocorticóides nas excretas (MGE) além de avaliar o papel do temperamento na expressão de estresse nestes animais. Para a validação fisiológica do EIA os animais foram randomicamente divididos em três grupos de quatro indivíduos para serem submetidos aos tratamentos: 100 µL solução salina - grupo S; 0,5 µg de hormônio adrenocorticotrópico sintético ACTH – grupo D2 e 1,0 µg de ACTH – grupo D1. Antes, durante e depois da estimulação farmacológica com ACTH (momentos pré-desafio, desafio e pós-desafio, cada um com duração de 24 horas), foi quantificado nos animais o tempo de apresentação das categorias comportamentais de alerta, *freezing*, conforto, voar e exploração. A amostragem de material uro-fecal para a avaliação endócrina foi realizada durante o pré-desafio e desafio, com intervalo de quatro e duas horas, respectivamente. Um mês após do desafio, o temperamento dos curiós foi avaliado pelo método de análise subjetiva do temperamento usando 16 adjetivos para qualificar o temperamento dos animais após terem sido expostos à três objetos novos (pregador de roupa, bola e esponja). Os valores de MGE apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, sendo a concentração basal para o dia pré desafio de MGE de  $68,7 \pm 20,2$  ng/g. Caracterizamos o temperamento dos curiós como *estressado* e *explorador* conferindo apenas uma dimensão de temperamento ( $r = 0,83$ ,  $P = 0,002$ ). No entanto, o temperamento não apresentou correlação com as categorias comportamentais analisadas e também não foi encontrada a relação temperamento e os níveis basais médios de MGE dos curiós nos momentos pré-desafio, desafio e pós desafio. Nosso estudo mostrou que o monitoramento por meio das excretas do curió por EIA é viável. No entanto, os dados revelaram que aparentemente a ação adrenal não está relacionada com o temperamento do curió.

**Palavras-chave:** bem-estar animal, criação de animais, curió, estresse, metabólitos de glicocorticoides.

## **Stress monitoring of seed-finch, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) and its relation to temperament**

### **ABSTRACT**

The seed-finch, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) is a bird that belongs to the order Passeriformes and family Thraupidae. In Brazil, the characteristic song of this species is highly appreciated, promoting a high incidence of breeding sites registered by the amateur breeders of Passeriformes (SISPASS). However, few is known about its response to stress. Noninvasive monitoring of stress has been an important practice in assessing the welfare of animals in captivity. Thus, the objective of the present study was to validate the efficacy of the immunoenzymatic technique (EIA) to noninvasively monitor the stress of 12 males of the species through excreta glucocorticoid metabolites (MGE) in addition to evaluating the role of temperament in the expression of stress in these animals. For the physiological validation of EIA the animals were randomly divided into three groups of four individuals to be submitted to treatments: 100  $\mu$ L saline solution - group S; 0.5  $\mu$ g of synthetic adrenocorticotrophic hormone ACTH - group D2 and 1.0  $\mu$ g of ACTH - group D1. Before, during and after the pharmacological stimulation with ACTH (pre-challenge, challenge and post-challenge moments, each lasting 24 hours), the animals were quantified in the time of presentation of the behavioral categories of alert, freezing, comfort, flying and exploration. Sampling of uro-fecal material for endocrine evaluation was performed during the pre-challenge and challenge, with a four- and two-hour interval, respectively. One month after the challenge, the temperament of the seed-finch was evaluated by the method of subjective analysis of temperament using 16 adjectives to qualify the temperament of the animals after they were exposed to three new objects (clothes, ball and sponge preacher). The MGE values presented differences ( $P < 0.05$ ) between the treatments, being the baseline concentration for the day before MGE challenge of  $68.7 \pm 20.2$  ng / g. We characterized the temperament of the seed-finch as stressed and explorer conferring only one dimension of temperament ( $r = 0.83$ ,  $P = 0.002$ ). However, temperament had no correlation with the behavioral categories analyzed and neither was the temperament relationship and the basal mean levels of MGE of the seed-finch at pre-challenge, challenge and post-challenge moments found. Our study showed that monitoring by the excreta of the seed-finch by EIA is viable. However, the data revealed that apparently the adrenal action is not related to the temper of the seed-finch.

**Keywords:** Animal welfare, glucocorticoid metabolites, breeding animals, seed-finch.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. Características morfológicas de curió (*Sporophila angolensis*) .....11
- Figura 2. Estrutura de glicocorticóides, cortisol e corticosterona .....13

### ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1. Paralelismo dos níveis de metabólitos de glicocorticóides fecais detectados em curió usando imunoensaio enzimático de corticosterona. Curva padrão (diamantes) ( $Y = -36.5 * X + 122.7$ ,  $r^2 = 0.99$ ); extrato uro fecal (quadrado) ( $Y = -34.9 * X + 120.5$ ,  $r^2 = 0.94$ ). ..... 333
- Figura 2. Valores médios da concentração basal de metabólitos de glicocorticóides nos excrementos (MGE) em função do horário da coleta de excretas. Dados de 72 amostras coletadas no dia pré-desafio (controle)..... 344
- Figura 3. Concentração de metabólitos de glicocorticóides nas excretas (MGE) de curiós (n=12) ao longo do dia e que receberam os tratamentos: S (controle: 100 µL de solução salina), D1(1,0 µg de ACTH em 100 µL de solução salina) D2 (0,5 µg de ACTH em 100 µL de solução salina)..... 354
- Figura 4. Escores de curiós nas duas dimensões de temperamento. Os escores para explorador (colunas preenchidas) foram obtidos dos escores para os adjetivos curioso e não apático. Os escores para estressado (colunas vazadas) foram obtidos dos escores para os adjetivos ativo, agitado e não apático. As letras identificam os curiós (n=11).....37

**LISTA DE TABELAS**  
**ARTIGO CIENTÍFICO**

Tabela 1. Dados biométricos de curiós (n=12) e tratamentos (S: solução salina, D1: 1,0 µg de ACTH e D2: 0,5 µg de ACTH) usados para o desafio de ACTH. E= envergadura; Ct= Comprimento total, do bico até a cauda .....	28
Tabela 2. Descrição das categorias comportamentais observadas nos curiós (n=12) que foram submetidos ao teste do desafio ACTH .....	300
Tabela 3. Coeficientes de correlação de Spearman $r_s$ significância (P) entre dois observadores para os escores dos 16 descritores do temperamento de curiós (n=11) .....	35
Tabela 1. Coeficientes de correlação de Spearman $r_s$ significância (P) inter-objetos dos escores médios para os adjetivos de temperamento de curiós (n=11).....	35
Tabela 5. Correlações de Spearman dos escores entre os adjetivos .....	36
Tabela 6. Correlações de Spearman entre as categorias comportamentais de curiós (n=11) nos três dias de observação .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Ag	Antígeno
AVT	Vasotocina arginina
CRF	Corticotrofina
EIA	Imunoensaios enzimáticos
GC	Glicocorticóides
HHA	Hipotálamo-hipófise adrenal
HHG	Hipotálamo-hipófise gonadal
MGE	Metabólitos de glicocorticóides contidos nos excrementos
RIA	Radioimunoensaios

## LISTA DE SIGLAS

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
SISPASS	Sistema de cadastro de criadores amadores de passeriformes
OEMAS	Órgão Estaduais de Meio Ambiente



## SUMÁRIO

1. OBJETIVOS .....	100
1.1 Geral.....	100
1.2 Específicos .....	100
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	111
2.1 Características e estado de conservação da espécie <i>Sporophila angolensis</i> .....	111
2.2 Estresse e bem-estar animal.....	122
2.3 Hormônios esteroides .....	122
2.3.1 Glicocorticóides e sua variação diurna.....	144
2.4 Métodos de identificação e quantificação de hormônios esteroides.....	144
2.4.1 Métodos de amostragem para imunoenaios de hormônios.....	155
2.4.2 Validação de métodos para monitorar o estresse .....	155
2.5 O temperamento em animais .....	166
REFERÊNCIAS .....	18
MANUSCRITO.....	244

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 Geral**

Validar a técnica de monitoramento do estresse por meio de metabólitos de glicocorticóides nas excretas de machos de curió, *Sporophila angolensis* e avaliar a relação entre o temperamento e estresse desses animais.

### **1.2 Específicos**

- a) Realizar a validação bioquímica analítica de um imunoenensaio para a detecção e quantificação de concentrações de metabólitos de glicocorticóides nos excrementos de curiós machos;
- b) Avaliar a resposta adrenocortical do curió por meio da ativação da glândula suprarrenal com um análogo de ACTH;
- c) Analisar se há diferentes tipos de temperamento nos curiós, utilizando um método subjetivo de análise;
- d) Descrever, quantificar e comparar as categorias comportamentais dos curiós antes, durante e depois da estimulação do estresse com ACTH por meio do método de observação direta;
- e) Avaliar a relação individual entre a resposta endócrina-adrenal e comportamental de machos de curió durante o desafio com ACTH;
- f) Avaliar a relação entre o temperamento individual e a produção de metabólitos de glicocorticóides.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características e estado de conservação da espécie *Sporophila angolensis*

O curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766), é uma ave que pertence à ordem Passeriforme e família Thraupidae. Apresenta sinonímia com *Oryzoborus angolensis* (Linnaeus, 1766) (BURNS et al., 2016), sendo reconhecido por estudos moleculares baseados em DNA mitocondrial como uma única espécie e, portanto, catalogado no gênero *Sporophila* (LIJTMAYER et al., 2004). Esta ave costuma apresentar um tamanho de aproximadamente 13 cm de comprimento e um peso que varia entre 11 e 15 g, sendo em estado adulto as fêmeas totalmente pardas e os machos pretos com abdômen acastanhado (Figura 1) (SICK, 1997).



Figura 1. Características morfológicas de curió (*Sporophila angolensis*)

A espécie apresenta ampla distribuição na América do Sul, exceto no Chile (OLSON, 2007; BIRDLIFE, 2017), encontrando-se em uma variedade de habitats que compreendem os extratos de forrageamento de vegetação de baixo sub-bosque desde as capoeiras arbustivas, clareiras com gramíneas e florestas abertas (LORDELLO, 1951; OLSON, 1981; BATISTA et al., 2013). Sua dieta é eminentemente granívora, baseada em sementes de *Paspalum notatum*, *Rhynchospora nervosa*, *Scleria bracteata* Cav., entre outras (LORDELLO, 1951). Esta espécie costuma apresentar hábitos solitários ou formar pares, portanto, sua ocorrência em bandos mistos com outros pássaros é rara (BATISTA et al., 2013).

O estado de conservação deste passeriforme é pouco preocupante (*least concern*) (BIRDLIFE, 2017). Porém, no Brasil, esta ave apresenta os maiores índices de apreensão registrados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (FREITAS et al., 2008; SANTOS et al., 2011; JUNIOR et al., 2014; PARREIRAS

DE FREITAS et al., 2015) além de mostrar reduções nas populações naturais nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná (NUNES, 2010). Entre os motivos desta redução pode-se citar a captura para a criação em cativeiro devido ao canto característico desta ave que é apreciado por humanos (DESTRO et al., 2012).

## **2.2 Estresse e bem-estar animal**

Os animais alojados em habitats artificiais são confrontados com uma ampla gama de desafios ambientais potencialmente provocadores de estresse (MORGAN; TROMBORG, 2007). Sendo preciso a integração de métodos que avaliem a qualidade do bem-estar dos animais incluindo avaliações clínicas para descartar lesões e doenças (DAWKINS, 2008), psicológicas por meio de observações de comportamento (DAWKINS, 2008; BROOM, 2011) e fisiológicas como as medidas hormonais (MÖSTL; PALME, 2002). Segundo Broom (2011), o estresse pode ser definido como um estímulo ambiental que sobrecarrega os sistemas de controle do indivíduo, reduzindo a sua adaptação. De acordo com a duração da presença de estímulo(s) estressor(es), as alterações fisiológicas podem ser classificadas em estresse agudo e crônico (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995; HOLST, 1998). Em situações de estresse agudo o animal encaminha a energia do corpo para funções que maximizam sua sobrevivência (WINGFIELD et al., 1992; LIGHTMAN, 2008). No entanto, em caso do que o indivíduo seja exposto a estímulo(s) nocivo(s) por um período maior (estresse crônico), o indivíduo apresenta uma elevação dos níveis séricos de glicocorticóides sobrecarregando os sistemas alostáticos (SOUSA et al., 2015), afetando por exemplo os sistemas imunológicos (MUNCK et al., 1984), reprodutivos (WINGFIELD et al., 1992; WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003) e muscular (LARSON et al., 2015) do indivíduo. Complementarmente, a palavra *distresse* pode ser utilizada para descrever aquela porção do bem-estar empobrecido que se refere às falhas na tentativa de enfrentar as dificuldades (BROOM; MOLENTO, 2004; BROOM, 2011).

## **2.3 Hormônios esteroides**

Os hormônios esteroides são mensageiros químicos produzidos pelas gônadas e glândulas suprarrenais a partir do colesterol (JONES, 2015). Sua produção é regulada pelos eixos hipotálamo-hipófise gonadal (HHG) e hipotálamo-hipófise adrenal (HHA) (ELLIS et

al., 2006; JONES, 2015). Uma vez produzidos, esses hormônios são encaminhados pelo sangue ao tecido-alvo, associados ou não a proteínas (LARSON et al., 2015) com a finalidade de regular, integrar e controlar as funções corporais (CREWS; MOORE., 2005; RANGEL-NEGRÍN et al., 2011). Seu processo de metabolização está associado às reações de derivatização (transformação de uma substância em outra estrutura semelhante) ou conjugação em tecidos periféricos como o fígado (MÖSTL et al., 2005; UBUKA; BENTLEY, 2011), tornando-se uma molécula mais solúvel para a eliminação fecal ou urinária (GOYMANN; MOSTL, 2002; VALDESPINO. et al., 2007; KUMMROW et al., 2011).

Entre os hormônios produzidos nas glândulas adrenais pode-se citar os glicocorticóides (GC) como o cortisol (Figura 2), que está presente em peixes e na maioria dos mamíferos (MILLER et al., 1991; OHL; FUCHS, 1999) e a corticosterona (Figura 2), que está presente em anfíbios, aves, répteis e roedores (VALDESPINO. et al., 2007; KALLIOKOSKI et al., 2012; CHAO et al., 2016). A liberação de GC está associada à estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que é produzido na hipófise e liberado por fatores hipotalâmicos da vasotocina arginina (AVT) e fator de liberação de corticotrofina (CRF) (ROMERO et al., 1998; LACROIX et al., 2000; COCKREM, 2007).

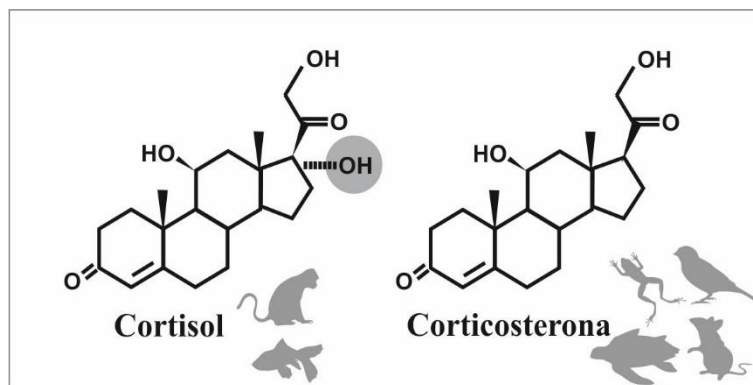


Figura 2. Estrutura de glicocorticóides, cortisol e corticosterona Fonte: Fraser et al. 2010

Funções metabólicas são atribuídas aos glicocorticoides, tais como promover a glicogenólise e estimular a função imune (MUNCK et al., 1984; KUO et al., 2015), além de ser comprovada a presença de altos níveis destes hormônios e seus metabólitos em resposta a estímulos considerados prejudiciais ao animal (ASTHEIMER et al., 1995; KOOLHAAS et al., 1999; COCKREM, 2007).

### 2.3.1 Variação diurna dos glicocorticóides

Na biologia, o ciclo circadiano se refere as oscilações das variáveis biológicas que acontecem no período de 24h, sendo estas operadas geneticamente como um "relógio biológico" (DUNLAP, 1999). Estas variáveis biológicas rítmicas compreendem eventos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais dos seres vivos, e são sincronizados principalmente pelos ciclos de fotoperíodo e temperatura (DUNLAP, 1999; AMY et al., 2017). No comportamento de aves, por exemplo, foi demonstrada a influência destes fatores abióticos principalmente nos seus hábitos alimentares e por consequência no aspecto reprodutivo (CHEMINEAU et al., 2007; AMY et al., 2017). A nível endócrino, a síntese e secreção de GC são principalmente reguladas pelo eixo neuroendócrino HHA e por mecanismos regulatórios múltiplos (CHUNG et al., 2011), demonstrando-se por métodos imuno-enzimáticos em passeriformes, níveis máximos de corticosterona séricos no início da fase ativa do dia com reduções subsequentes (CARERE et al., 2003; SCHWABL et al., 2016).

### 2.4 Métodos de identificação e quantificação de hormônios esteroides

Entre os métodos químicos analíticos usados para a identificação e quantificação de hormônios glicocorticóides, pode-se citar os ensaios imunológicos. Nestes ensaios, os hormônios são detectados e/ou quantificados pela conjugação com anticorpos (Ac) como se fosse um antígeno (Ag) (PORSTMANN; KIESSIG, 1992). Esta reação de conjugação pode ser monitorada por meio de técnicas colorimétricas como os testes de imunoensaios enzimáticos (EIA) ou por técnicas rádioquímicas de radioimunoensaios (RIA) (YALOW, 1978; SEO, 2000).

As técnicas RIA foram utilizadas para a avaliação do estresse induzido por mudanças climáticas drásticas em passeriformes como *Amphispiza bilineata*, *Campylorhynchus brunneicapillus*, *Pipilo aberti* e *Toxostoma curvirostre* (WINGFIELD et al., 1992). Apesar da eficácia da técnica RIA, pesquisadores tem preferido utilizar os ensaios EIA para a quantificação de GC por dispensar o uso de material radioativo, sendo útil na avaliação endócrina adrenal em aves como *Saxciola tortuosa rubicola* (GOYMANN; MOSTL, 2002), *Spheniscus magellanicus* (WALKER, 2005), *Gallus domesticus* e *Phalacrocorax carbo* (DEHNHARD et al., 2003).

#### **2.4.1 Métodos de amostragem para imunoenaios de hormônios**

A coleta do sangue em passeriformes geram a ativação do eixo HHA, com um incremento na concentração dos níveis plasmáticos de corticosterona (*Calcarius lapponicus*, ASTHEIMER et al., 1995). Adicionalmente, devido à propriedade pulsátil dos hormônios, uma única amostra de sangue não é suficiente para monitorar seus níveis plasmáticos (GOYMANN; MOSTL, 2002), tornando-se uma prática letal ou limitante a quantidade de plasma a ser coletado em pequenas espécies (GOYMANN, 2005). Por outro lado, os metabólitos de hormônios contidos nas fezes, urina ou excrementos (material uro-fecal em espécies como aves e lagartos) representam frações combinadas de hormônios metabolizados (GOYMANN; MOSTL, 2002; FRIGERIO et al., 2004), fornecendo um sistema integrado dos níveis de esteróides por um período de tempo maior (GOYMANN, 2005; HARPER; AUSTAD, 2012).

#### **2.4.2 Validação de métodos não invasivos para monitorar o estresse**

As avaliações de metabólitos hormonais por técnicas de imunoensaio a partir de amostras de excrementos oferecem protocolos econômicos de rápida execução sem necessidade de manipular os animais (MÖSTL; PALME, 2002; VALDESPINO. et al., 2007). No entanto, para que se possa utilizar com segurança a metodologia não invasiva, é necessária uma validação química e fisiológica do método, que em geral é distinta para cada sexo e espécie animal (MILLER et al., 1991; MÖSTL et al., 2005; POPP et al., 2008).

A validação fisiológica pode ser realizada basicamente por três métodos: a radioinfusão (GOYMANN, 2005; MÖSTL et al., 2005); a correlação dos níveis hormonais no plasma com seus metabólitos nas fezes (WASSER et al., 1997; DEHNHARD et al., 2003) e a estimulação ou supressão da produção de hormônios através da administração de fármacos (DEHNHARD et al., 2003; GOYMANN, 2005; POPP et al., 2008). O método da radioinfusão consiste em medir o tempo entre a injeção e excreção de um hormônio radio identificado no animal (GOYMANN, 2005), porém requer licenças e equipamentos especiais para o acolhimento de animais e a geração de resíduos radioativos. O segundo método consiste em relacionar a concentração dos níveis de hormônios no sangue com os metabólitos encontrados nas fezes, sendo sua aplicação limitada quando o animal é de pequeno porte ou de difícil

manipulação para a amostragem (GOYMANN; MOSTL, 2002). O terceiro método, a estimulação farmacológica do hormônio, é o mais comum, sendo utilizado em passeriformes como *Cardeulis flammea* (ROMERO et al., 1998), *Mimus polyglottos* (SIMS; HOLBERTON, 2000), *Junco hyemalis* (WILSON; HOLBERTON, 2001) e *Saxicola torquata rubicola* (GOYMANN; MOSTL, 2002). Nestes estudos, a resposta adrenal para a produção de GC foi estimulada por meio da administração de ACTH sintético, causando assim um rápido aumento nos níveis de GC e seus metabólitos, seguido da normalização dos níveis basais após um tempo relativamente curto, quando comparado com os mamíferos.

Além da validação fisiológica para garantir que o imunoensaio gere informações confiáveis sobre a concentração dos metabólitos de glicocorticóides contidos nos excrementos (MGE), uma validação química do método também deve ser realizada. Esta avaliação consiste na determinação de parâmetros analíticos como sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (RIBANI et al., 2004; MÖSTL et al., 2005). A sensibilidade do ensaio é estimada de forma indireta através do paralelismo entre as equações das retas geradas pela diluição das amostras e a curva do padrão do hormônio (LÈCHE et al., 2009; CORADELLO et al., 2012). A exatidão determina se os componentes de excrementos afetam a ligação do anticorpo-hormônio. O limite de detecção representa a menor concentração do hormônio que pode ser detectada, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração do hormônio que pode ser quantificada (CORADELLO et al., 2012). Finalmente, a precisão representa a dispersão da repetição dos ensaios e pode ser verificada através do cálculo do coeficiente de variação (CV) intra- e inter-ensaios dos resultados obtidos da concentração dos hormônios que estão sendo analisados (POPP et al., 2008; LÈCHE et al., 2009).

## **2.5 O temperamento em animais**

Os animais apresentam traços comportamentais individuais, os quais permanecem constantes ao longo do tempo e contexto (RÉALE et al., 2007). Estas características individuais são denominadas personalidade (GOSLING, 2001; COCKREM, 2007), síndromes comportamentais (SIH et al., 2004), estilos de comportamento (KOOLHAAS et al., 1999) ou temperamento (RÉALE et al., 2007). Cada indivíduo apresenta diferentes estratégias para tratar com as contingências de seu ambiente e por sua vez, expressam diferentes estilos de comportamento para lidar com o estresse (KOOLHAAS et al., 1999). Estas variações



comportamentais têm sido mostradas em aves (GROOTHUIS; CARERE, 2005; FEENDERS et al., 2011), encontrando-se uma relação positiva entre o comportamento agressivo para enfrentar predadores e a exploração de ambientes novos, por exemplo (KOOLHAAS et al., 1999; COCKREM, 2007).

Distinções individuais dos animais são possíveis de estabelecer por métodos qualitativos subjetivos como os expostos por Feaver et al. (1986) e Wemelsfelder et al. (2001). Nesta última referência o método QBA (*Qualitative Behavioral Assessment*) permite a caracterização e classificação dos traços comportamentais avaliando as reações de cada indivíduo em determinada situação, por meio de adjetivos como calmo, alegre, tenso, entre outros. Posteriormente, aqueles adjetivos que possuam relação positiva entre os juízes, são avaliados por métodos matemáticos, como a Análises de Componentes Principais (PCA), sendo o escore do componente que explica a maior variação dos dados, usado como o índice de temperamento para cada indivíduo (WEMELSFELDER et al., 2001; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013; NOGUEIRA et al., 2015). No entanto, os análises por PCA requer um número de animais elevado (pelo menos igual ao número de adjetivos analisados), que as variáveis sejam contínuas, com distribuição normal e que estejam relacionadas linearmente (STEVENSON-HINDE et al., 1980; FEAVAR et al., 1986). Já a análise proposta por Feaver et al. (1986) permite o uso de amostras pequenas (indivíduos), utilizando Correlação de Spearman ( $r_s$ ) e acrescenta um critério de rigor para a escolha de adjetivos com concordância mínima de 0,70.

No presente estudo, foi utilizado o método EIA para identificar as variações fisiológicas referentes às concentrações dos níveis de MGE e correlacioná-las com o temperamento individual de machos de *S. angolensis*, servindo assim, como método não invasivo para avaliar e monitorar os possíveis casos de estresse dos animais. Espera-se que este método possa ser aplicado de forma ampla para avaliar o estresse de curiós e que possa servir como ferramenta diagnóstica do bem-estar para esta espécie. Os métodos empregados, assim como os resultados obtidos deste trabalho, estão apresentados no formato do manuscrito, o qual será submetido ao periódico *Physiology & Behavior*.

## REFERÊNCIAS

- AMY, M.; UNG, D.; BÉGUIN, N.; LÉBOUCHER, G. Personality traits and behavioural profiles in the domestic canary are affected by sex and photoperiod. **Ethology**, v. 123, n. 12, p. 885–893, 2017.
- ASTHEIMER, L. B.; BUTTEMER, W. A.; WINGFIELD, J. C. Seasonal and acute changes in adrenocortical responsiveness in an arctic-breeding bird. **Hormones and Behavior**, v. 29, n. 4, p. 442–457, 1995.
- BATISTA, R. O.; MACHADO, C. G.; MIGUEL, S. A composição de bandos misto de aves em um fragmento de Mata Atlântica no litoral norte da Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 2001–2012, 2013.
- BROOM, D. M. A History of Animal Welfare Science. **Acta Biotheoretica**, v. 59, n. 2, p. 121–137, 2011.
- BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem estar animal: conceito e questões relacionadas - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2004.
- BURNS, K. J.; UNITT, P.; MASON, N. A. A genus-level classification of the family Thraupidae (Class Aves: Order Passeriformes). **Zootaxa**, v. 4088, n. 3, p. 329–354, 2016.
- CARERE, C.; GROOTHUIS, T. G. G.; MO, E.; DAAN, S.; KOOLHAAS, J. M. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities : daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 540–548, 2003.
- CHAO, A.; SCHLINGER, B.; REMAGE-HEALEY, L. Combined liquid and solid-phase extraction improves quantification of brain estrogen content. **Frontiers in Neuroanatomy**, , n. September 2011, 2016.
- CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; BRILLARD, J. P.; FOSTIER, A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes , birds and mammals. **Animal**, v. 1, n. 3, p. 419–432, 2007.
- CHUNG, S.; SON, G. H.; KIM, K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid : Its regulation and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 5, p. 581–591, 2011.
- COCKREM, J. F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. SUPPL. 2, p. 169–178, 2007.
- CORADELLO, M. A.; MORAIS, R. N.; ROPER, J.; et al. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 2, p. 275–82, 2012.
- DAWKINS, M. S. The science of animal suffering. **Ethology**, v. 114, n. 10, p. 937–945, 2008.
- DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; et al. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative**

**Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 345–352, 2003.

DESTRO, G. F. G.; LUCENA, T.; MONTI, R.; CABRAL, R.; BARRETO, R. Efforts to combat wild animals trafficking in Brazil. **Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, p. 33–36, 2012.

DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks Review. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271–290, 1999.

ELLIS, B. J.; JACKSON, J. J.; BOYCE, W. T. The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. **Developmental Review**, v. 26, n. 2, p. 175–212, 2006.

FEAVER, J.; MENDEL, M.; BATESON, P. A method for rating the individual distinctiveness of domestic cats. **Animal Behaviour**, v. 101, p. 1016–1025, 1986.

FEENDERS, G.; KLAUS, K.; BATESON, M. Fear and exploration in European Starlings (*Sturnus vulgaris*): A comparison of hand-reared and wild-caught birds. **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011.

FREITAS, L.; VERA, F.; LEÃO, S. Apreensão de espécimes da fauna silvestre em goiás – situação e destinação. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 2, p. 51–63, 2008.

FRIGERIO, D.; DITTAMI, J.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted corticosterone metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male Greylag geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 29–36, 2004.

GOSLING, S. D. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 1, p. 45–86, 2001.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 35–53, 2005.

GOYMANN, W.; MOSTL, E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **The Auk**, v. 119, n. October, p. 1167–1173, 2002.

GROOTHUIS, T. G. G.; CARERE, C. Avian personalities: Characterization and epigenesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 137–150, 2005.

HARPER, J. M.; AUSTAD, S. N. Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 1, p. 12–22, 2012.

HOLST, D. VON. The Concept of Stress and Its Relevance for Animal Behavior. **Advances in the Study of Behavior**, v. 21, p. 1,133, 1998.

IUCN. *Sporophila angolensis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2017. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Downloaded on 18 May 2017>. .

JONES, S. M. Variations upon a theme: Australian lizards provide insights into the endocrine control of vertebrate reproductive cycles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 244,

p. 60–69, 2015.

JUNIOR, M. B. F. D.; CUNHA, H. F. A.; CASTRO DIAS, T. C. A. DE. Caracterização das apreensões de fauna silvestre no estado do Amapá , Amazônia oriental , Brasil. **Biota Amazônia**, v. 4, p. 65–73, 2014.

KALLIOKOSKI, O.; TIMM, J. A.; IBSEN, I. B.; et al. Fecal glucocorticoid response to environmental stressors in green iguanas (*Iguana iguana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 177, n. 1, p. 93–97, 2012. Elsevier Inc.

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; BOER, S. F. DE; et al. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–935, 1999.

KUMMROW, M. S.; GILMAN, C.; MACKIE, P.; SMITH, D. A.; MASTROMONACO, G. F. Noninvasive analysis of fecal reproductive hormone metabolites in female veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) by enzyme immunoassay. **Zoo Biology**, v. 30, n. 1, p. 95–115, 2011.

KUO, T.; MCQUEEN, A.; CHEN, T. C.; WANG, J. C. Glucocorticoid Signaling. **Springer New York**. p.99–126, 2015.

LACROIX, A.; N'DIAYE, N.; MIRCESCU, H.; TREMBLAY, J.; HAMET, P. The diversity of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome allows novel pharmacological therapies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1201–1209, 2000.

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

LÈCHE, A.; BUSSO, J. M.; HANSEN, C.; et al. Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, n. 2, p. 188–191, 2009. Elsevier Inc.

LIGHTMAN, S. L. The neuroendocrinology of stress: A never ending story. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 880–884, 2008.

LIJTMAYER, A.; SHARPE, N. M. M.; TUBARO, P. L.; LOUGHEED, S. C. Molecular phylogenetics and diversification of the genus *Sporophila* (Aves : Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 562–579, 2004.

LORDELLO, L. G. E. Pequena contribuição à história natural de alguns Fringillidae do Brasil (Passeriformes). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 8, p. 649–662, 1951.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 205–216, 1995.

MILLER, M. W.; HOBBS, N. T.; SOUSA, M. C. Detecting stress responses in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): reliability of cortisol concentrations in

urine and feces. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 1, p. 15–24, 1991.

MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3–4, p. 262–302, 2007.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicator of stress. **Domestic Animal and Endocrinology**, v. 23, p. 67–74, 2002.

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

MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 25–44, 1984.

NOGUEIRA, S.; MACÊDO, J.; SANT'ANNA, A.; NOGUEIRA-FILHO, S.; COSTA, M. P. DA. Assessment of temperament traits of white-lipped (*Tayassu pecari*) and collared peccaries (*Pecari tajacu*) during handling in a farmed environment. **Animal Welfare**, v. 24, n. 3, p. 291–298, 2015.

NUNES, A. P. Estado de conservação da avifauna ameaçada de extinção ocorrente no Pantanal , Brasil. **Atualidades Ornitológicas**, v. 157, p. 85–98, 2010.

OHL, F.; FUCHS, E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. **Cognitive Brain Research**, v. 7, n. 3, p. 379–387, 1999.

OLSON, S. L. Interaction Between the Two Subspecies Groups of the Seed-Finch *Sporophila angolensis* in the Magdalena Valley, Colombia. **The Auk**, v. 98, n. 2, p. 379–381, 1981.

OLSON, S. L. A new subspecies of *Sporophila angolensis* (Aves : Emberizidae ) from Isla de Coiba and other additions to the avifauna of the Veragua. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 120, n. 4, p. 377–381, 2007.

PARREIRAS DE FREITAS, A. C. P. DE; OVIEDO-PASTRANA, M. E.; VILELA, D. A. DA R.; et al. Diagnóstico de animais ilegais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no ano de 2011. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 163–170, 2015.

POPP, L. G.; SERAFINI, P. P.; REGHELIN, A. L. S.; et al. Annual pattern of fecal corticoid excretion in captive Red-tailed parrots (*Amazona brasiliensis*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 178, n. 4, p. 487–493, 2008.

PORSTMANN, T.; KIESSIG, S. T. Enzyme immunoassay techniques an overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 150, n. 1–2, p. 5–21, 1992.

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

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

2, p. 291–318, 2007.

RIBANI, M.; GRESPLAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROMERO, L. M.; SOMA, K. K.; WINGFIELD, J. C. The hypothalamus and adrenal regulate modulation of corticosterone release in redpolls (*Carduelis flammea* an arctic-breeding song bird). **General and Comparative Endocrinology**, v. 109, n. 3, p. 347–55, 1998.

SANT'ANNA, A. C.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Validity and feasibility of qualitative behavior assessment for the evaluation of Nelore cattle temperament. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 254–262, 2013.

SANTOS, E. A. M.; BUENO, M.; ARAÚJO, A. S.; et al. Aves do Centro de Triagem de Animais Silvestres do Estado do Amapá. **Ornithologia**, v. 4, n. 2, p. 86–90, 2011.

SCHWABL, P.; BONACCORSO, E.; GOYMANN, W. Diurnal variation in corticosterone release among wild tropical forest birds. **Frontiers in Zoology**, p. 1–11, 2016.

SEO, Y. Enzyme Immunoassays. , p. 344, 2000.

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

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

SIMS, C. G.; HOLBERTON, R. L. Development of the corticosterone stress response in young northern mockingbirds (*Mimus polyglottos*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 2, p. 193–201, 2000.

STEVENSON-HINDE, J.; STILLWELL-BARNES, R.; ZUNZ, M. Subjective assessment of rhesus monkeys over four successive years. **Primates**, v. 21, p. 66–82, 1980.

UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. **Neuroendocrine Control of Reproduction in Birds**. Elsevier, 2011.

VALDESPINO., C.; MARTINEZ., R.; GARCÍA., L. M.; MARTINEZ., L. E. Evaluacion de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas : Evolución de una metodología no invasiva. **Acta Zoológica Mexicana**. v. 23, n. 3, p. 151–180, 2007.

WALKER, B. G. Field Endocrinology and Conservation Biology. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–18, 2005.

WASSER, S. K.; BEVIS, K.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. **Conservation Biology**, v. 11, n. 4, p. 1019, 1997.

WEMELSFELDER, F.; HUNTER, T. E. A.; MENDEL, M. T.; LAWRENCE, A. B. Assessing the “whole animal”: a free choice profiling approach. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 2, p. 209–220, 2001.

WILSON, C. M.; HOLBERTON, R. L. An alternative method for delivering adrenocorticotropin hormone in birds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 349–53, 2001.

WINGFIELD, J. C. Historical contributions of research on birds to behavioral neuroendocrinology. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 4, p. 395–402, 2005.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 8, p. 711–724, 2003.

WINGFIELD, J. C.; VLECK, C. M.; MOORE, M. C. Seasonal changes of the adrenocortical response to stress in birds of the Sonoran Desert. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 264, n. 4, p. 419–428, 1992.

YALOW, R. S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 200, n. 4347, p. 1236–1245, 1978.

## MANUSCRITO

Pretende-se submeter o presente manuscrito ao periódico *Physiology & Behavior*

Fator de Impacto: 2, 341

Qualis Capes Biodiversidade: B1

<https://www.journals.elsevier.com/physiology-and-behavior/>

### **Monitoramento do estresse em curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) e sua relação com o temperamento**

#### **RESUMO**

O monitoramento não invasivo do estresse tem sido uma prática importante para avaliar o bem-estar de animais em cativeiro. No Brasil, o curió é uma das aves canoras mais apreciadas em criatórios para competições de canto, no entanto, nada sabemos sobre sua resposta ao estresse. O objetivo da presente pesquisa, foi validar a eficácia da técnica imuno-enzimática (EIA) para monitorar, de forma não invasiva, o estresse de 12 machos da espécie por meio de metabólitos de glicocorticóides nas excretas (MGE) além de avaliar o papel do temperamento na expressão de estresse nestes animais. Para a validação fisiológica do EIA os animais foram randomicamente divididos em três grupos de quatro indivíduos para serem submetidos aos seguintes tratamentos: 100 µL solução salina - grupo S; 0,5 µg de hormônio adrenocorticotrópico sintético ACTH – grupo D2 e 1,0 µg de ACTH – grupo D1. Antes, durante e depois da estimulação farmacológica com ACTH (momentos pré-desafio, desafio e pós-desafio, cada um com duração de 24 horas), foi quantificado nos animais o tempo de apresentação das categorias comportamentais de alerta, *freezing*, conforto, voar e exploração. A amostragem para a avaliação endócrina foi realizada durante o pré-desafio e desafio, coletando amostras de material uro-fecal com intervalo de quatro e duas horas, respectivamente. Um mês após do desafio, o temperamento dos curiós foi avaliado pelo método de análise subjetiva do temperamento por dois observadores, usando 16 adjetivos para qualificar o temperamento dos animais após terem sido expostos à três objetos novos (pregador de roupa, bola e esponja). Os valores de MGE apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, sendo a concentração basal para o dia pré desafio de MGE de  $68,7 \pm 20,2$  ng/g. Caracterizamos o temperamento dos curiós como *estressado* e *explorador* conferindo apenas uma dimensão de temperamento ( $r = 0,83$ ,  $P = 0,002$ ). No entanto, o temperamento não apresentou correlação com as categorias comportamentais analisadas e também não foi encontrada a relação temperamento e os níveis basais médios de MGE dos curiós nos momentos pré-desafio, desafio e pós desafio. Nosso estudo mostrou que o monitoramento por meio das excretas do curió por EIA é viável. No entanto, os dados revelaram que aparentemente a ação adrenal não está relacionada com o temperamento do curió.

**Palavras-chave:** bem-estar animal, metabólitos de glicocorticoides, criação de animais, curió.



## INTRODUÇÃO

Um estímulo estressor gera alterações tanto comportamentais quanto endócrinas nos animais (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003). Dependendo do tempo de exposição do animal ao estímulo, o estresse pode ser classificado como agudo e crônico (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995; HOLST, 1998). No primeiro, o animal direciona a energia do organismo a maximizar mecanismos de sobrevivência gerando uma reação rápida de fuga ou luta (WINGFIELD et al., 1992; LIGHTMAN, 2008). Já durante o estresse crônico, quando o indivíduo é exposto a um estímulo nocivo por um período maior, há elevação dos níveis plasmáticos de glicocorticóides com consequências negativas ao seu bem-estar tendo como consequência, por exemplo, a depressão do sistema imunológico (MUNCK et al., 1984), a inibição da reprodução (WINGFIELD et al., 1992; WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003), a perda de tecido muscular (LARSON et al., 2015) e a diminuição da capacidade de aprendizagem (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995; OHL; FUCHS, 1999). Animais mantidos em cativeiro estão continuamente expostos a estímulos ou contingências emocionais nocivas ao seu bem-estar que podem desencadear o estresse crônico ou distresse (BROOM; MOLENTO, 2004; MORGAN; TROMBORG, 2007). Como consequência, os animais desenvolvem estereotípias e/ou doenças oportunistas que acabam por empobrecer seu bem-estar e no pior dos casos os levar até a morte (BROOM, 2011). Em meio aos desafios em que os animais nestas circunstâncias são acometidos, mecanismos alostáticos preditivos e reativos de ordem endócrina, imunológica e comportamental são ativados para se adaptarem às adversidades do ambiente (KNOL, 1991; ELLIS et al., 2006; COCKREM, 2007; STERLING, 2012; SOUSA et al., 2015).

As diferenças nos traços comportamentais dos indivíduos costumam repetir-se ao longo do tempo e em contextos diferentes (RÉALE et al., 2007), e podem ser denominados como temperamento (BOISSY, 1995; RÉALE et al., 2007). Há indícios de que a resposta comportamental aos estímulos aversivos ou estressores do ambiente depende de fatores genéticos e da experiência prévia do indivíduo (BOISSY, 1995; KOOLHAAS et al., 1999; COCKREM; SILVERIN, 2002). Tais diferenças nos traços comportamentais também tem sido observadas na expressão endócrina de indivíduos de uma mesma espécie quando são submetidos a um estímulo estressor (GROOTHUIS; CARERE, 2005; COCKREM, 2007). Em um estudo realizado com *Parus major* submetidos a um espaço novo, foram registrados indivíduos com personalidade proativa e níveis de corticosterona relativamente baixas,

enquanto que as aves com personalidade passiva apresentaram elevados níveis de corticosterona (COCKREM, 2007). Desta forma, a compreensão do papel do temperamento na expressão endócrina, de uma dada espécie, torna-se de extrema relevância.

O curió, *Sporophila angolensis* (Linnaeus, 1766) (BURNS et al., 2016), é um Passeriforme com ampla distribuição na América do Sul, exceto no Chile (OLSON, 2007; BATISTA et al., 2013; BIRDLIFE, 2017). Segundo a *International Union for Conservation of Nature*- IUCN (BIRDLIFE, 2017) o estado de conservação desta espécie é pouco preocupante (*least concern*). No entanto, em algumas regiões do Brasil, esta ave canora apresenta estado de *Perigo* de conservação tais como em Minas Gerais e Rio Grande do Sul; e *Vulnerável* nas regiões de São Paulo e Paraná (NUNES, 2010). O canto característico desta espécie é muito apreciado no Brasil promovendo grande incidência de criadouros registrados pelo sistema de cadastro de criadores amadores de passeriformes (SISPASS) (DESTRO et al., 2012), constituindo um banco genético que possibilita a reprodução de indivíduos para futuros programas de soltura. No entanto, esses criadores carecem de respaldo científico nos procedimentos de criação, manejo social e até mesmo no transporte, o que conseqüentemente pode afetar o bem-estar dos animais. Considerando a importância da espécie em cativeiro e ausência de conhecimento a respeito da expressão de estresse e suas possíveis diferenças individuais, propusemos validar química e fisiologicamente o método EIA para monitorar de forma não invasiva o estresse de machos curiós por meio de metabólitos de glicocorticóides nas excretas (MGE), além de avaliar a relação do temperamento dos animais na expressão endócrina. Esperamos que os parâmetros analíticos na validação do EIA para a detecção de MGE estejam dentro dos parâmetros permitidos para encontrar diferença nos níveis de MGE entre a fase controle e a estimulação adrenal com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Adicionalmente, predizemos que haverá diferentes tipos de temperamento entre os curiós estudados e que os indivíduos reagirão de forma diferente quando induzido o estresse.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Nota Ética**

Os procedimentos propostos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (Proc. nº 030-16).

## **Animais e alojamento**

O estudo foi realizado no Laboratório de Etologia Aplicada (LABET) da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil (14° 47' 39.8" S, 39° 10' 27.7" O) com 12 curiós machos adultos. Os animais foram cedidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do IBAMA, em Salvador, Bahia. Como foram animais apreendidos de forma ilegal por este órgão, a idade dos animais é desconhecida, porém a coloração preta e uniforme em suas penas indica maturidade sexual e, portanto, idade estimada acima de um ano.

Os pássaros foram mantidos no LABET em gaiolas individuais de madeira (0,48 m comprimento x 0,21 m largura x 0,46 m altura) contendo dois poleiros cada, um comedouro retangular (0,21 m de comprimento e 0,06 m de diâmetro) e um bebedouro para aves. As gaiolas foram alojadas em uma sala de 4,0 m<sup>2</sup>, com ventilação e iluminação natural mantendo o ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente (~25 °C). Todos os curiós foram avaliados por um médico veterinário no momento de sua chegada ao LABET, analisando aspectos visuais como qualidade da plumagem e motricidade. A alimentação foi baseada em 60% de alpiste (*Phalaris canariensis*), 15% de painço branco, 15% painço verde, 10% arroz em casca, acrescentada com 20 g de areia e aminoácidos Premix, sendo o fornecimento de água *ad libitum*. As 12 gaiolas foram dispostas em três prateleiras de madeira, separadas entre si por uma folha de papel-cartão, de forma a impedir que um animal visualizasse os demais e reduzir o estresse dessa espécie com hábito solitário (BATISTA et al., 2013).

## **Tratamentos e dosagem hormonal**

No dia Pré Desafio, foram coletadas amostras de material uro-fecal em intervalos de quatro horas (07h00min, 11h00min, 15h00min, 19h00min, 23h00min e 03h00min). Posteriormente, no dia do teste de desafio, os 12 indivíduos foram divididos por sorteio em três grupos, contendo quatro curiós cada. Os tratamentos foram: Tratamento S- (grupo controle), os animais receberam uma dose de 100 µL contendo apenas a solução salina; Tratamento D1 - os curiós desse grupo receberam uma dose de 1,0 µg de ACTH (ACTH analogue; human 800 UI in 1 mL Synacthen© (Dépôt–Novartis Pharma S/A, Nürnberg, Germany) diluído em 100 µL de solução salina, baseado no estudo de Goymann et al. (2002); Tratamento D2 - os pássaros desse grupo receberam uma dose de 0,5 µg de ACTH diluído em 100 µL de solução salina (Tabela 1). Todas as doses foram administradas por via intraperitoneal (agulha de 0,13 mm) no período da manhã a partir das 08h00min em um único

dia. Após a administração dos tratamentos, as amostras dos excrementos foram coletadas a cada 2 h entre às 8h00min e às 24h00min do dia desafio.

Tabela 2. Dados biométricos de curiós (n=12) e tratamentos (S: solução salina, D1: 1,0 µg de ACTH e D2: 0,5 µg de ACTH) usados para o desafio de ACTH. E= envergadura; Ct= Comprimento total, do bico até a cauda.

<b>Animal</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>E (mm)</b>	<b>Ct (mm)</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Ave C</b>	9,35	170	130	S
<b>Ave L</b>	13,87	160	14	S
<b>Ave H</b>	12,01	155	130	S
<b>Ave F</b>	11,81	150	130	S
<b>Ave D</b>	13,18	174	103	D2
<b>Ave G</b>	13,17	150	125	D2
<b>Ave B</b>	11,78	140	130	D2
<b>Ave A</b>	11,65	140	130	D2
<b>Ave I</b>	14,69	170	135	D1
<b>Ave E</b>	13,30	160	131	D1
<b>Ave J</b>	12,97	150	130	D1
<b>Ave K</b>	13,31	165	125	D1

Um total de 174 amostras de material uro-fecal foram recolhidas e acondicionadas em papel alumínio, após a eliminação natural pelos animais. Essas amostras foram transferidas para tubos cônicos (Eppendorf®) de 2 mL, pesados em balança de precisão (Model YL48-1, BEL Engineering®, Monza, Itália), identificados e armazenados em freezer (80°C negativos) até sua liofilização (FreeZonet® Plus 4.5 Liter, CascadeBench-top, Labconco, Kansas City, Missouri 64132, EUA). Depois de liofilizadas, as amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Nesse local, aproximadamente 0,1 g do excremento liofilizado foi transferido para o tubo Eppendorf® com 1,0 mL de solução metabólica (80% v/v tampão fosfato salino, PBS). A mistura foi agitada em vortex durante 30 minutos (Multi-Pulse de vórtice, modelo VB4 099a, 50/60Hz - Glass-Colt, Glas-Col, LLC). O sobrenadante, denominado de Extrato de Esteroides (EE) foi transferido para outro tubo Eppendorf® e armazenado a -20°C. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Sistema Puritech, Permuton, EJ Krieger & Cia. Ltda., Curitiba, Paraná, 81.460-030, Brasil), e os reagentes utilizados neste estudo foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri 63103, EUA).

Para a realização do EIA, a concentração de MGE foi medida em duplicatas, utilizando um volume de 100 $\mu$ L de EE, na presença de um imunosolvente ligado a uma enzima com o anticorpo policlonal de corticosterona (CJM006; 1:15000) e corticosterona conjugado com HRP (1:70.000) (Coralie Munro, Davis, CA, EUA). As leituras em absorbância das placas/poço medidas em 450 nm foram feitas em equipamento Tecan Infinite Ref com o software de Análise de Dados Magellan TM.

### **Validação analítica do imunoensaio**

Anteriormente à estimação dos valores de MGE pelo método EIA, foram feitos os testes de paralelismo, exatidão e precisão. Para o teste de paralelismo foram feitas duas curvas, uma curva do padrão de corticosterona e uma segunda curva feita com um pool de 48 amostras de EE das primeiras 8 horas após do desafio ACTH, este pool foi diluído em série desde 1:4 para 1:128 (tampão de diluição ELISA 1: 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, pH 7). No teste de exatidão, a uma amostra de EE (diluição 1:4) com uma concentração já estimada do hormônio foi adicionado o controle de concentração conhecida. Finalmente o teste de precisão foi estimado pelo cálculo de coeficientes de variação (CV) intra e inter ensaio. As concentrações médias de CV intra-ensaios foram utilizados a partir de amostras duplicadas de cada teste, no teste de CV inter-ensaios, foram calculadas a partir de controles com alta (30% de ligação) e baixa (70% de ligação) concentração em cada teste.

### **Coleta de dados comportamentais**

Nos três dias (momentos) de observação (dia pré-desafio, dia desafio e dia pós-desafio), os comportamentos dos curiós foram registrados durante 24hs utilizando duas câmeras de vídeo de 760 linhas de resolução de imagem (modelo SEGC-7630G, Greatek, Brasil), sendo as imagens armazenadas em um disco rígido externo. Para a análise comportamental, foram selecionadas as imagens gravadas entre 8h00min e 9h00min, as quais correspondem aos comportamentos expressos pelos indivíduos imediatamente após da estimulação farmacológica com ACTH, pois segundo Dehnhard et al. (2003), nos primeiros 15 minutos após do desafio com ACTH os níveis de corticoides plasmáticos são maiores em aves. Desta forma, foram avaliados dados comportamentais durante uma hora durante os três dias de observação, totalizando 36 horas de coleta de dados.

Usando o método de observação animal focal e registro contínuo (ALTMANN, 1974), um pesquisador, cego ao experimento, analisou as imagens com auxílio do software CowLog

(PASTELL, 2016), e contabilizou a duração dos comportamentos em segundos (s). Os comportamentos foram classificados em cinco categorias: alerta, *freezing*, conforto, voar e explorar (Tabela 2), determinando posteriormente a proporção de tempo de cada categoria por indivíduo.

Tabela 3. Descrição das categorias comportamentais observadas nos curiós (n=12) que foram submetidos ao teste do desafio ACTH

Categoria	Descrição
<b>Alerta</b>	Posturas das aves como parar no solo da gaiola, no poleiro ou assegurando-se da grade da gaiola. As asas permanecem próximas ao corpo, sem estarem elevadas ou abaixadas. Os movimentos da cabeça são livres, tanto para as laterais ou para acima e para abaixo, estando o pescoço nem distendido ou encolhido.
<b>Freezing</b>	No poleiro, o pássaro está com as pernas flexionadas de modo que o ventre se apoia sobre as patas durante o pouso, cobrindo as patas com a plumagem do ventre. O eixo longitudinal da cabeça e do corpo são idênticos, mantendo assim a cabeça para frente, com o pescoço encolhido e deixando o peito proeminente. Nesta postura a ave pode observar os arredores orientando a cabeça da direita para a esquerda ou para acima e para abaixo. As penas não estão eriçadas.
<b>Conforto</b>	Parada de pé no poleiro, a ave arrepia as penas do corpo, do alto do dorso, do peito e do pescoço, sendo estas eriçadas e acomodadas novamente. Também pode-se incluir nesta categoria atividades de limpeza e arrumação da plumagem, movimentos de espreguiçar, onde a ave estica uma das patas, erguendo o corpo e em certas ocasiões abrindo as asas.
<b>Voar</b>	O animal voa de um lado a outro da gaiola partindo das laterais da gaiola ou dos poleiros. Às vezes, o pássaro retorna ao poleiro de onde partiu ou pousa nas laterais da gaiola (teto e paredes) ou outro poleiro, mas não pousa no chão. O pássaro pode manter-se voando no centro da gaiola por poucos segundos. Nesta categoria também se inclui dois tipos de saltos. O primeiro é simples e vertical, e no segundo o animal faz uma volta em 360° (cambalhota). Nos dois saltos, é evidente as batidas das asas e o esforço das mesmas para manter o equilíbrio.
<b>Exploração</b>	Nesta categoria incluem-se os movimentos de deslocamento no solo e na grade lateral da gaiola. No solo, as aves realizam saltos desajeitados, onde mantém as duas patas juntas. Já para o deslocamento lateral, tanto entre os poleiros ou entre as paredes da gaiola, a ave salta com um impulso dado simultaneamente pelas duas pernas. Algumas vezes, além do impulso das pernas, a ave dá uma ou mais “batidas” de asas, pousando com as asas estendidas e fechando estas rapidamente. Comer e beber água também são inclusas nesta categoria.

### **Avaliação do temperamento**

Um mês após do desafio de ACTH, o temperamento dos curiós foi avaliado pelo método de análise subjetiva do temperamento (*subjective rating scale*) seguindo a metodologia de Feaver et al. (1986). Infelizmente, o curió E, que recebeu o tratamento D1,

escapou antes que pudesse ser avaliado seu temperamento, desta forma, o procedimento relatado a seguir foi realizado com 11 indivíduos. Os animais foram expostos, durante dez minutos, a três objetos novos (pregador de plástico verde com 1,5 x 3 cm, bola de borracha laranja com 5 cm de diâmetro, e uma almofada de pelúcia amarela (5 cm comprimento x 3 cm largura x 7 cm altura). O intervalo de apresentação de cada objeto foi de 20 dias, sendo submetidos todos os animais a cada um dos três testes no mesmo dia. Com este método analisamos a distinção dos traços comportamentais em um contexto (objeto novo) ao longo do tempo.

Todo o ensaio de teste de novidade foi gravado utilizando uma câmera digital (JVC GZ-HD500; Tóquio, Japão), e para cada indivíduo, foram selecionados clipes de 30 segundos de duração a partir do momento da introdução de cada objeto em sua gaiola. Os testes de temperamento foram realizados em outra sala com isolamento acústico, assim os demais animais não tiveram acesso às possíveis vocalizações ocorridas durante o teste. A análise dos clipes de vídeo foi feita por dois observadores com experiência na técnica de análise subjetiva do temperamento e que não estiveram presentes durante a coleta de dados. Estes observadores assistiram aos vídeos e julgaram a intensidade com que cada um dos adjetivos descritores de temperamento foi expresso pelos indivíduos. Os 16 adjetivos de temperamento usados (ativo, relaxado, medroso, agitado, calmo, tenso, entediado, dócil, alerta, nervoso, agressivo, ansioso, apático, satisfeito, estressado e curioso) foram escolhidos baseados em um estudo realizado com *Amazona rhodocorytha* (PAULINO, 2018) e que segundo nosso julgamento seriam adequados para caracterizar o temperamento de curiós. A intensidade dos adjetivos foi determinada com auxílio de uma escala visual analógica representada por uma linha horizontal de 125 mm. Para cada descritor, o valor mínimo representou a ausência da expressão comportamental, enquanto que o máximo foi sua manifestação mais intensa.

O teste de ambiente novo, geralmente usado em estudos de comportamentos de passeriformes (GREENBERG, 1992; DINGEMANSE et al., 2003; GROOTHUIS; CARERE, 2005; COCKREM, 2007), foi descartado neste estudo porque os animais nesta situação permaneceram em um único estado de *freezing* por longos períodos, impossibilitando uma análise da avaliação do temperamento.

### **Análise dos dados**

Para a validação do método EIA, na confirmação do paralelismo entre as curvas do padrão de corticosterona e da diluição do pool de EE, foi realizado um teste *t* para avaliar as

diferenças entre os coeficientes linear e angular das curvas, depois de ajustar os dados no Log10. A porcentagem de exatidão foi determinada pela divisão da concentração observada pela concentração esperada, multiplicando-se este valor por 100.

Na avaliação endócrina dos indivíduos, foi calculada a média da concentração dos MGE nas 72 amostras coletadas no dia controle (pré-desafio) dos 12 curiós para determinar a concentração basal média de MGE para a espécie. Em seguida, para verificar que as concentrações de MGE variaram ao longo do dia, os valores médios de MGE do dia controle foram comparadas por meio de ANOVA de medidas repetidas, seguida de testes *post hoc* de Duncan considerando-se o horário da coleta como variável independente. As concentrações médias de MGE no dia da administração dos tratamentos (dia do desafio) foram comparadas por ANOVA fatorial de medidas repetidas, seguida de teste *post hoc* de Duncan, sendo consideradas como variáveis independentes o horário da coleta e os tratamentos.

Para avaliar o temperamento dos curiós, inicialmente foi verificada a concordância entre observadores na avaliação dos 16 adjetivos descritores de temperamento (correlação inter-observadores), seguido da comparação dos escores dos adjetivos atribuídos aos indivíduos quando introduzidos objetos diferentes (correlação inter-objetos), usando testes de correlação de Spearman ( $r_s$ ) e considerando-se unicamente valores que apresentaram  $r_s \geq 0,70$ . Posteriormente, as médias desses escores foram transformados em valores de Z-escore, calculado pela diferença entre as médias para cada descritor e dividido pelo seu desvio padrão. Dessa forma se reduz a influência dos efeitos de distribuição dos escores dos adjetivos (Feaver et al. 1986), apresentando-se uma média zero e desvio padrão 1,0 nos valores de Z-escore. Esses valores foram correlacionados e combinados para determinar os escores de temperamento de cada curió, seguindo o critério de correlação ( $r_s \geq 0,70$  ou  $r_s \leq -0,70$ ).

Finalmente, os escores de temperamento foram correlacionados com as proporções de tempo em que os indivíduos foram observados nas diferentes categorias comportamentais nos períodos de observação dos dias pré-desafio, desafio e pós-desafio. Os escores de temperamento foram também correlacionados com os valores médios de MGE no dia sem estimulação fisiológica de ACTH (nível basal de MGE). Todos os dados foram analisados utilizando o software Stastistica (versão 7.0 - StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Para todas as análises foi considerado o nível de significância  $\alpha \leq 0,05$ .



## RESULTADOS

### Validação analítica de imunoensaio

O coeficiente angular (*slope*) da curva para a concentração de log por porcentagem de ligação (*slope*= -34,9) foi essencialmente igual à da curva padrão de corticosterona (*slope*= -36,5,  $P=0,67$ ). Assim, a similaridade imunogênica entre os antígenos padrão e os antígenos da amostra dos curiós mostrou paralelismo, validando a análise (Figura 1). O teste de paralelismo também revelou que a diluição ideal para as amostras fecais de curió é de 1:4, uma vez que esta diluição proporcionou uma porcentagem de ligação (*binding*) mais próxima de 64% na curva padrão. Os coeficientes (CV) intra e inter-ensaio foram de 2,3% e 7,2%, respectivamente. A precisão do ensaio foi de 88,5 ( $\pm 7,9$ ) % como uma recuperação média do hormônio adicionado após o pico.

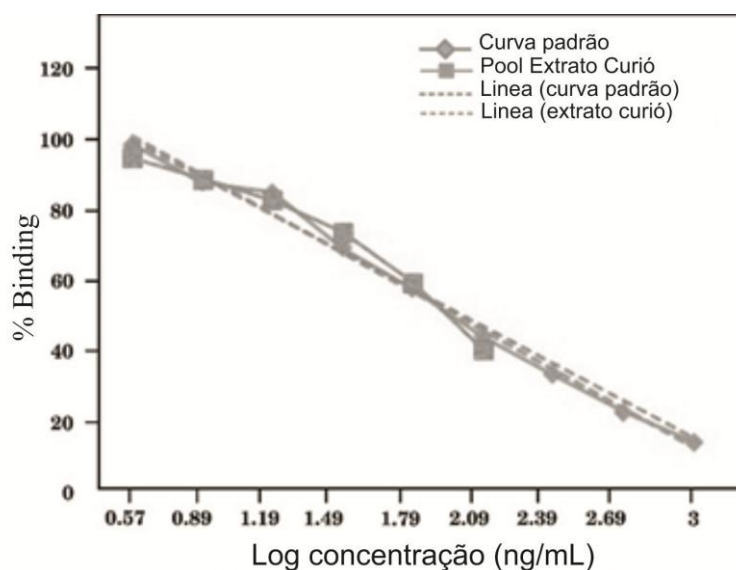


Figura. 1 Paralelismo dos níveis de metabólitos de glicocorticóides fecais detectados em curió usando imunoensaio enzimático de corticosterona. Curva padrão (diamantes) ( $Y=-36.5*X+122.7$ ,  $r^2=0.99$ ); extrato uro fecal (quadrado) ( $Y=-34.9*X+120.5$ ,  $r^2=0.94$ ).

### Variação na excreção de metabólitos de glicocorticóides na excreta (MGE)

A concentração média de MGE das 72 amostras coletadas no dia pré-desafio (controle) dos 12 curiós foi de  $68,7 \pm 20,2$  ng/g, considerando-se este valor como a concentração basal de MGE para a espécie. Houve diferença na concentração de MGE entre as horas do dia ( $F_{5, 50}=6,1$ ;  $P=0,0002$ ) (Figura 2), identificando-se pelos testes *post hoc*

concentrações significativamente menores de MGE às 15h00min ( $61,9 \pm 6,1$ ng/g) e às 23h00min ( $51,7 \pm 3,3$ ng/g (Figura 2).

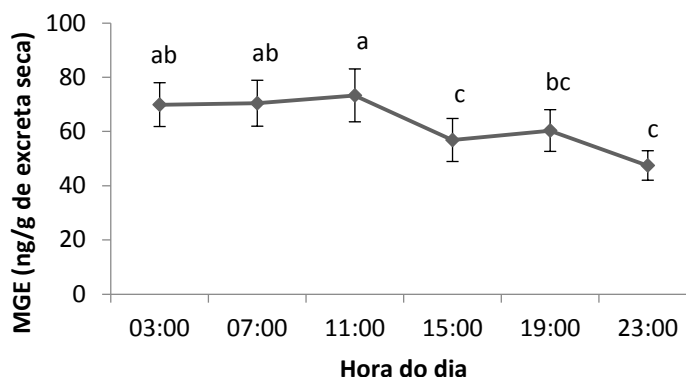


Figura. 2. Valores médios da concentração basal de metabólitos de glicocorticóides nos excrementos (MGE) em função do horário da coleta de excretas. Dados de 72 amostras coletadas no dia pré-desafio (controle). Médias com letras diferentes na barra de erro padrão diferem entre si ( $p < 0,05$  pelo teste de Duncan).

Para as amostras coletadas no dia da aplicação de ACTH (dia do desafio), o modelo estatístico mostrou efeito da interação dos tratamentos com horário da coleta na concentração de MGE ( $F_{16, 72} = 3,49$ ,  $P = 0,0001$ ) (Figura 3). Os testes *post hoc* indicaram que a concentração de MGE não diferiu entre os tratamentos S, D1 e D2 entre às 8h00 e às 18h00, com valores médios de  $95,5 \pm 7,9$  ng/g. Contudo, às 20 horas do dia da aplicação dos tratamentos (12 horas após a aplicação dos mesmos), houve incremento na concentração de MGE para os animais que receberam os tratamentos D1 ( $1,0 \mu\text{g}$  de ACTH em  $100 \mu\text{L}$  de solução salina) e D2 ( $0,5 \mu\text{g}$  de ACTH em  $100 \mu\text{L}$  de solução salina), com média de  $148,7 \pm 27,3$  ng/g, uma concentração 2,5 vezes maior do que a concentração de MGE para os animais que receberam o tratamento solução salina ( $58,7 \pm 22,5$  ng/g) (Figura 3). Após o pico de excreção de MGE houve uma gradual redução na concentração, sendo que às 24h00 (16 horas após a aplicação dos tratamentos), a concentração de MGE voltou aos níveis determinados às 8h00 e às 18h00.

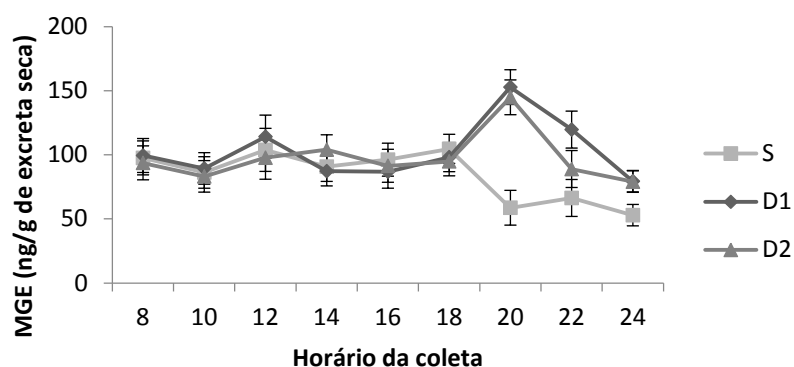


Figura. 3 Concentração de metabólitos de glicocorticóides nas excretas (MGE) de curiós (n=12) ao longo do dia e que receberam os tratamentos: S (controle: 100 µL de solução salina), D1(1,0 µg de ACTH em 100 µL de solução salina) D2 (0,5 µg de ACTH em 100 µL de solução salina).

### Avaliação do temperamento

Dos 16 adjetivos descritores de temperamento usados, nove foram positivamente correlacionados entre os observadores ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3). Contudo, para conferir um maior rigor às análises, apenas sete adjetivos com correlação de Spearman ( $r_s$ ) maior que 70% foram utilizados na análise dos testes com objeto novo (Tabela 3).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Spearman  $r_s$  significância (P) entre dois observadores para os escores dos 16 descritores do temperamento de curiós (n=11)

Descritor	$r_s$	P
<b>Ativo</b>	<b>0,76</b>	<0,05
Relaxado	0,67	<0,05
Medroso	0,63	<0,05
<b>Agitado</b>	<b>0,93</b>	<0,05
Calmo	0,39	n.s.
<b>Tenso</b>	<b>0,75</b>	<0,05
Entediado	0,15	n.s.
Dócil	0,12	n.s.
Alerta	0,40	n.s.
<b>Nervoso</b>	<b>0,91</b>	<0,05
Agressivo	0,52	n.s.
<b>Ansioso</b>	<b>0,91</b>	<0,05
<b>Apático</b>	<b>0,81</b>	<0,05
Satisfeito	0,65	n.s.
Estressado	0,51	n.s.
<b>Curioso</b>	<b>0,83</b>	<0,05

\*n.s correlações não significativas; os termos em negrito significam  $r_s > 0,70$ .

Dos sete adjetivos descritores analisados para comparar os escores obtidos nos testes com objeto novo (ativo, agitado, tenso, nervoso, ansioso, apático e curioso), seis apresentaram

correlações inter-objetos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4), mas apenas quatro apresentaram correlação de Spearman ( $r_s$ ) acima de 0,70 (Tabela 4).

Tabela 5. Coeficientes de correlação de Spearman  $r_s$  significância (P) inter-objetos dos escores médios para os adjetivos de temperamento de curiós (n=11)

Descritor	$r_s$	P
<b>Ativo</b>	<b>0,71</b>	<0,05
<b>Agitado</b>	<b>0,74</b>	<0,05
Tenso	0,47	N.S.
Nervoso	0,62	<0,05
Ansioso	0,64	<0,05
<b>Apático</b>	<b>0,72</b>	<0,05
<b>Curioso</b>	<b>0,85</b>	<0,05

\*Os adjetivos destacados em negrito são aqueles em que a correlação interobservadores foi maior do que 0,70 e, portanto, usados nas análises posteriores.

Usando o mesmo critério de procedimento de seleção entre os adjetivos, ou seja,  $r_s > 0,70$  ou  $r_s < -0,7$ , e de acordo com a correlação das variáveis, os quatro adjetivos foram agrupados em (1) ativo, agitado e não apático; e (2) curioso e não apático (Tabela 5).

Tabela 6. Correlações de Spearman dos escores entre os adjetivos

	Ativo	Agitado	Apático	Curioso
Ativo	-			
Agitado	<b>0,87</b>	-		
Apático	<b>-0,88</b>	<b>-0,83</b>	-	
Curioso	0,68	0,45	<b>-0,75</b>	-

Os Z-escores de cada descritor foram combinados para produzir os escores de temperamento  $Estressado = (\text{ativo} + \text{agitado} + \text{não apático} (= -1 * \text{apático})) / 3$  e  $Explorador = [\text{curioso} + \text{não apático} (= -1 * \text{apático})] / 2$ .

De acordo ao teste de correlação de Pearson (r) os dois escores foram correlacionadas ( $r=0,83$ ,  $P=0,002$ ), representando uma mesma dimensão do temperamento dos curiós. Assim, cinco curiós foram julgados como exploradores e estressados (C, I, J, K, L), dois deles receberam injeção de solução salina (C e L) e três indivíduos com dose 1 de ACTH (I, J e K). Quatro indivíduos foram considerados não exploradores e não estressados (D, F, G e H), dos quais, dois receberam injeção de solução salina (F e H) e dois receberam a dose 2 de ACTH (D e G). Finalmente, o curió A foi considerado explorador sem ser estressado, recebendo a dose 2 de ACTH, enquanto o curió B foi julgado como estressado e não explorador, pertencente ao tratamento de dose 2 de ACTH (Figura 4).

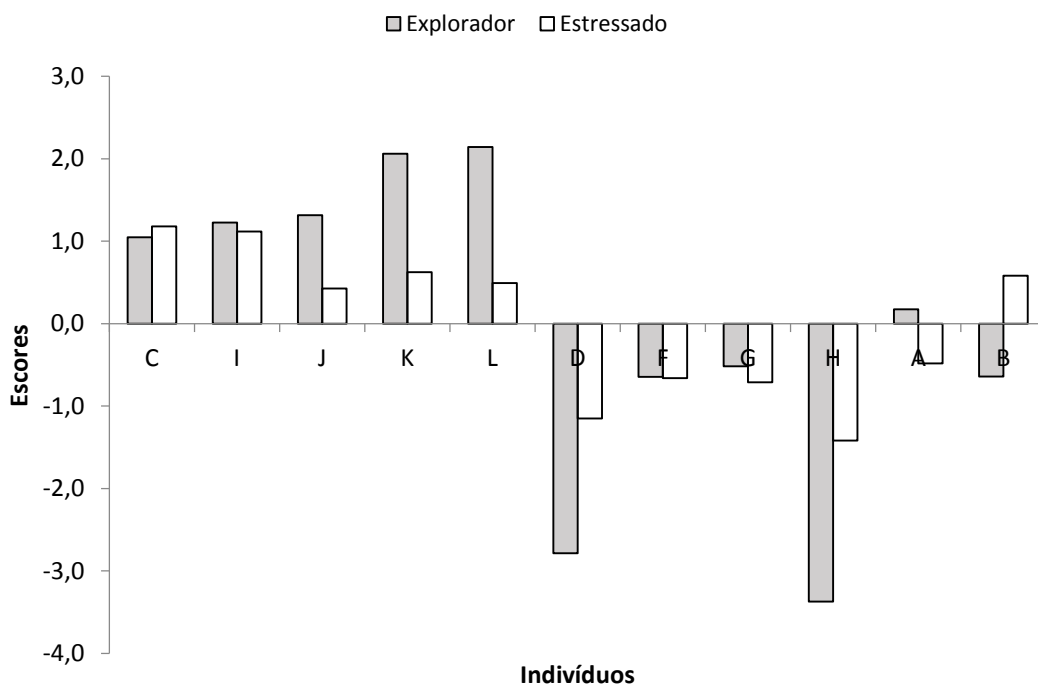


Figura. 4 Escores de curios nas duas dimensões de temperamento. Os escores para explorador (colunas preenchidas) foram obtidos dos escores para os adjetivos curioso e não apático. Os escores para estressado (colunas vazadas) foram obtidos dos escores para os adjetivos ativo, agitado e não apático. As letras identificam os curios (n=11).

Os escores nas duas dimensões de temperamento (explorador e estressado) não apresentaram correlação com as proporções de tempo em que os curios foram observados nas categorias comportamentais (alerta, *freezing*, conforto, voar e explorar) nos três momentos de observação (pré-desafio, desafio e pós-desafio). Mas pode-se observar correlação positiva entre os tempos expressos nos dias Pré e Pós desafio entre as categorias comportamentais de *freezing* e conforto (Tabela 6). Adicionalmente as correlações foram negativas entre as proporções de tempo expressado pelos animais nas categorias comportamentais de exploração com *freezing* e conforto nos dias Pré e Pós desafio, e entre *freezing* e alerta no dia do desafio (Tabela 6).

Tabela 7. Correlações de Spearman entre as categorias comportamentais de curios (n=11) nos três dias de observação.

Momento	Categorias comportamentais	$r_s$	P
Pré-desafio	<i>Freezing</i> - Conforto	0,66	<0,05
	<i>Freezing</i> - Exploração	-0,84	<0,05
	Conforto - Exploração	-0,77	<0,05
Desafio	<i>Freezing</i> - Alerta	-0,86	<0,05
Pré-desafio	<i>Freezing</i> - Conforto	0,76	<0,05
	<i>Freezing</i> - Exploração	-0,71	<0,05

Houve correlação positiva entre as concentrações de MGE e o comportamento de conforto no dia pré-desafio ( $r_s = 0,70$ ,  $P < 0,05$ ): animais com maiores concentrações de MGE foram observados com maior proporção do tempo de conforto no dia pré-desafio. No entanto, no dia do desafio, esta correlação foi negativa ( $r_s = -0,75$ ,  $P < 0,05$ ): quanto maior a proporção de conforto, menor as concentrações de MGE. Não houve correlações entre a proporção de tempo passado realizando os demais comportamentos (*freezing*, exploração, voar e alerta) com as concentrações basais de MGE individuais no dia pré-desafio e pós-desafio. Também não houve correlação entre o temperamento e os níveis basais médios de MGE dos curiós determinados no dia anterior ao teste de desafio ACTH (dia pré-desafio).

## DISCUSSÃO

No teste de paralelismo foi evidenciado que as diluições das amostras de material urológico do curió comportam-se de forma semelhante com a diluição das concentrações padrão de hormônio, neste caso corticosterona. Adicionalmente, o EIA validado aqui apresentou uma precisão ótima, similar às encontradas na literatura (POPP et al., 2008; LÈCHE et al., 2009; CORADELLO et al., 2012), com coeficientes de variação intra e inter-ensaio inferiores a 10%.

A administração do composto ACTH sintético, para estimular a produção de corticoide, foi útil para mostrar a relação de causa e efeito entre as administrações e a excreção posterior do hormônio Diana, validando fisiologicamente o ensaio EIA proposto. O aumento na concentração de MGE após a estimulação com as duas doses de ACTH verificados no curió é similar aos encontrados na literatura para outras espécies de aves como *Saxicola torquata rubicola* (GOYMANN, 2005), *Strix varia* e *Bubo virginianus* (WASSER et al., 2000). Os picos na excreção de MGE ocorreram 12 horas após a aplicação dos tratamentos D1 e D2, o que não foi verificado com o tratamento salina (controle), comprovando que é possível monitorar a atividade adrenal dos curiós por meio da determinação desses metabólitos. Esta resposta adrenal à estimulação com ACTH também foi detectada em outros estudos com passeriformes como em *Carduelis flammea* (ROMERO et al., 1998), *Mimus polyglottos* (SIMS; HOLBERTON, 2000), *Junco hyemalis* (WILSON; HOLBERTON, 2001) e *Saxicola torquata rubicola* (GOYMANN; MOSTL, 2002), onde se evidencia um crescimento instantâneo dos níveis de glicocorticóides e seus metabólitos,

seguido da normalização dos níveis baixos em um tempo relativamente curto, quando comparado com os mamíferos (CORADELLO et al., 2012). Adicionalmente, as concentrações dos MGE dos curiós no dia prévio ao desafio, apresentaram um padrão de variação diária que pode estar relacionado com variações ambientais como o fotoperíodo (ROMERO; REMAGE-HEALEY, 2000; POPP et al., 2008).

A confirmação de que existe diferenças de temperamento entre os curiós é um resultado de grande valia para analisar questões de adaptação dos indivíduos em cativeiro entre outras questões ecológicas importantes para um programa de reabilitação (PAULINO et al. 2018), por exemplo. Diferenças comportamentais entre indivíduos de uma mesma espécie, também tem sido mostrada em outros passeriformes (Groothuis e Carere 2005). Esses autores evidenciaram uma relação positiva entre a exploração e o comportamento agressivo em *Parus major* para enfrentar predadores.

Geralmente os estudos comportamentais em aves incluem o teste de ambiente novo (DRENT et al., 2003; GROOTHUIS; CARERE, 2005; FEENDERS et al., 2011). Em nosso trabalho, foi realizado um estudo piloto com este propósito, porém, infelizmente, os pássaros apresentaram apenas comportamentos de *freezing* e, portanto, o teste não foi realizado para não comprometer o bem-estar dos pássaros. O temperamento dos curiós foi determinado 30 dias após da estimulação farmacológica, tempo suficiente para a metabolização do ACTH exógeno (GOYMANN, 2005). Descarta-se assim a possibilidade de que as diferenças observadas no temperamento tenham sido influenciadas pelos tratamentos administrados.

A captura, manipulação e administração intraperitoneal de qualquer substância (S, D1 ou D2) em curiós induziu um incremento na expressão do comportamento *freezing*, sugerindo que esta mudança comportamental é um potencial sinalizador de estresse agudo. O comportamento de *freezing* como resposta à exposição de ameaça tal como encontramos no presente estudo, tem sido relatado em aves associado à diminuição na frequência cardíaca e respiratória (GABRIELSEN et al., 1985; STEEN et al., 1988), sendo categorizado em ratos como um modo de enfrentamento passivo relacionado com altos níveis de corticoides plasmáticos (BOER, DE et al., 1990; TAKAHASHI; RUBIN, 1993; KOOLHAAS et al., 1999). Infelizmente, não monitoramos os batimentos cardíacos e taxa respiratória em nossos animais, mas pudemos perceber no estudo piloto mencionado acima que os animais podiam permanecer em total imobilidade por mais de dez minutos. Este comportamento tem sido considerado como uma estratégia de defesa adaptativa para evitar a detecção pelo predador (WHISHAW; DRINGENBERG, 1991; MIRANDA et al., 2006) e também como um modo de

preparação para fuga ou luta defensiva (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; KALIN et al., 1998). Até onde sabemos, o presente estudo é inédito em revelar este comportamento em curiós, apresentando uma estratégia associada ao comportamento de defesa na espécie.

Como realçado por Feaver et al. (1986), a comparação de uma categoria obtida de observação comportamental direta com uma outra derivada de escores subjetivos pode ser questionada. O fato de não ter encontrado correlações entre as dimensões de temperamento e as proporções de tempo nas categorias comportamentais, pode significar que ocorreram erros nos julgamentos ou que os adjetivos escolhidos não foram suficientemente esclarecedores sobre os traços comportamentais do curió. No entanto, as correlações e o mantimento da direção de dita correlação entre as categorias comportamentais (conforto, *freezing* vs exploração), encontrasse entre os resultados esperados. Adicionalmente a correlação negativa entre o comportamento de *freezing* e alerta no dia de desafio, reforça o fato de que os animais apresentaram um estres agudo pela manipulação e injeção de qualquer sustância a nível intraperitoneal.

A ausência de correlação entre os comportamentos ativos como alerta e voar com os níveis de MGE é algo não esperado, devido a que em pesquisas previas feitas em outros passeriformes, a maior produção de corticoides estão relacionadas com as demandas energéticas de comportamentos ativos (MEIER et al., 1978; SIMS; HOLBERTON, 2000; CARERE et al., 2003). Presumimos que o pico de corticoides no plasma de nossos pássaros ocorreu durante as primeiras horas claras do dia, quando os indivíduos investem mais tempo em comportamentos ativos. No entanto, pode ser que para os testes de correlação aplicados aqui, a escolha do intervalo de tempo não tenha correspondido ao ritmo da produção de corticoides. É de mencionar, que as variações dos níveis dos metabolitos de glicocorticoides contidos nas fezes são uma medida das variações plasmáticas da corticosterona tempo após de sua metabolização (WASSER et al., 1997), sendo preciso de outros estudos que determinem a taxa de produção e eliminação de metabolitos de hormônios adrenocorticotrópicos. Adicionalmente, a variação na direção da correlação entre as concentrações de MGE e a atividade comportamental conforto, sendo positiva no dia pré desafio e negativa no dia de desafio, é outro resultado contraditório e que suporta possíveis erros na escolha da hora avaliada. Era de esperar-se que a correlação mantivesse sua direção ao incrementar a expressão do comportamento conforto no dia desafio, o que não aconteceu.

Nosso estudo mostrou que as concentrações dos MGE dos curiós foram diferentes entre os dias controle e desafio, além de ter sido comprovada a existência de temperamentos



distintos entre os indivíduos. Contudo, estas variáveis fisiológicas endócrinas (MGE) e comportamentais (temperamento) não apresentaram relação entre si e, portanto, não confirmaram nossa hipótese desta relação. No entanto, outras pesquisas em passeriformes têm relacionado com êxito a expressão de diferenças fisiológicas comportamentais e a produção de corticoides em estado de estresse, como em *Parus majur* submetidos a estresse social (CARERE et al., 2003), indivíduos de *Sturnus vulgaris* submetidos a estresse de captura (MADDOCKS et al., 2002) e *Taeniopygia guttata* submetidos a um estresse induzido farmacologicamente (SPENCER; VERHULST, 2007). As mudanças comportamentais e endócrinas em *T. guttata* foram dependentes do sexo, sugerindo que sejam investigadas futuramente a influência de variáveis como sexo, estresses social e ambiental nos testes de temperamento de curiós.

## CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou ser possível monitorar o estresse em curiós por um método não invasivo, usando metabólitos de glicocorticoides de suas excretas. Verificou-se que há diferentes traços comportamentais entre os curiós machos, caracterizando os animais em duas dimensões de temperamento: explorador e estressado. Notou-se também que estes indivíduos apresentaram diferenças endócrinas relacionadas com a produção normal de hormônios adrenocorticais. No entanto, a relação entre traços comportamentais subjetivos (temperamento) com as concentrações basais de MGE não foi comprovada, possivelmente pela dificuldade de uma avaliação homogênea nos julgamentos, sendo preciso para o futuro, a implementação de outros testes comportamentais complementares. Estes resultados evidenciam que considerar unicamente uma das avaliações fisiológicas seja endócrina ou comportamental como um indicador de bem-estar nos sistemas de criação de curió, pode não ser suficiente. Nosso estudo sugere, no entanto, que o comportamento de *freezing* é um sinal diagnóstica de estresse agudo, que pode ser usado pelos centros de criação em cativeiro de curió como indicadores de bem-estar útil para se tomar as medidas corretivas necessárias visando promover melhores condições para esses pássaros mantidos em cativeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALTMANN, J. Observational Study of Behavior : Sampling Methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3, p. 227–267, 1974.
- AMY, M.; UNG, D.; BÉGUIN, N.; LÉBOUCHER, G. Personality traits and behavioural profiles in the domestic canary are affected by sex and photoperiod. **Ethology**, v. 123, n. 12, p. 885–893, 2017.
- ASTHEIMER, L. B.; BUTTEMER, W. A.; WINGFIELD, J. C. Seasonal and acute changes in adrenocortical responsiveness in an arctic-breeding bird. **Hormones and Behavior**, v. 29, n. 4, p. 442–457, 1995.
- BATISTA, R. O.; MACHADO, C. G.; MIGUEL, S. A composição de bandos misto de aves em um fragmento de Mata Atlântica no litoral norte da Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 2001–2012, 2013.
- BIRDLIFE, I. *Sporophila angolensis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2017. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Downloaded on 18 May 2017>. .
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator Defensive Behaviors in a Visible Burrow System. **Journal of Comparative Physiology**, v. 103, n. I, p. 70–82, 1989.
- BOER, S. F. DE; SLANGEN, J. L.; GUGTEN, J. VAN DER. Plasma Catecholamine and Corticosterone Levels During Active and Passive Shock-Prod Avoidance Behavior in Rats : Effects of Chlordiazepoxide I. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 900, p. 1089–1098, 1990.
- BOISSY, A. Fear and fearfulness in animals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 2, p. 165–191, 1995.
- BROOM, D. M. A History of Animal Welfare Science. **Acta Biotheoretica**, v. 59, n. 2, p. 121–137, 2011.
- BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem estar animal: conceito e questões relacionadas - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2004.
- BURNS, K. J.; UNITT, P.; MASON, N. A. A genus-level classification of the family Thraupidae (Class Aves: Order Passeriformes). **Zootaxa**, v. 4088, n. 3, p. 329–354, 2016.
- CARERE, C.; GROOTHUIS, T. G. G.; MO, E.; DAAN, S.; KOOLHAAS, J. M. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities : daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 540–548, 2003.
- CHAO, A.; SCHLINGER, B.; REMAGE-HEALEY, L. Combined liquid and solid-phase extraction improves quantification of brain estrogen content. **Frontiers in Neuroanatomy**, , n. September 2011, 2016.
- CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B.; BRILLARD, J. P.; FOSTIER, A. Seasonality of reproduction and production in farm fishes , birds and mammals. **Animal**, v. 1, n. 3, p. 419–432, 2007. Disponível em: <[10.1017/S1751731107691873](https://doi.org/10.1017/S1751731107691873)>. .

- CHUNG, S.; SON, G. H.; KIM, K. Biochimica et Biophysica Acta Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 5, p. 581–591, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.003>>. .
- COCKREM, J. F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. SUPPL. 2, p. 169–178, 2007.
- COCKREM, J. F.; SILVERIN, B. Sight of a predator can stimulate a corticosterone response in the great tit (*Parus major*). **General and comparative endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 248–255, 2002.
- CORADELLO, M. A.; MORAIS, R. N.; ROPER, J.; et al. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 2, p. 275–82, 2012.
- CREWS, D.; MOORE., M. C. Historical contributions of research on birds to behavioral neuroendocrinology. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 4, p. 395–402, 2005.
- CRINO, O. L.; BUCHANAN, K. L.; TROMPF, L.; MAINWARING, M. C.; GRIFFITH, S. C. Stress reactivity, condition, and foraging behavior in zebra finches: effects on boldness, exploration, and sociality. **General and Comparative Endocrinology**, v. 244, p. 101–107, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.014>>. .
- DAWKINS, M. S. The science of animal suffering. **Ethology**, v. 114, n. 10, p. 937–945, 2008.
- DEHNHARD, M.; SCHREER, A.; KRONE, O.; et al. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 345–352, 2003.
- DESTRO, G. F. G.; LUCENA, T.; MONTI, R.; CABRAL, R.; BARRETO, R. Efforts to combat wild animals trafficking in Brazil. **Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, p. 33–36, 2012.
- DINGEMANSE, N. J.; BOTH, C.; NOORDWIJK, A. J. VAN; RUTTEN, A. L.; DRENT, P. J. Natal Dispersal and Personalities in Great Tits. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1516, p. 741–7, 2003.
- DRENT, P. J.; OERS, K. VAN; NOORDWIJK, A. J. VAN. Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1510, p. 45–51, 2003.
- DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks Review. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271–290, 1999.
- ELLIS, B. J.; JACKSON, J. J.; BOYCE, W. T. The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. **Developmental Review**, v. 26, n. 2, p. 175–212, 2006.
- FEAVER, J.; MENDEL, M.; BATESON, P. A method for rating the individual distinctiveness

of domestic cats. **Animal Behaviour**, v. 101, p. 1016–1025, 1986.

FEENDERS, G.; KLAUS, K.; BATESON, M. Fear and exploration in European Starlings (*Sturnus vulgaris*): A comparison of hand-reared and wild-caught birds. **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011.

FREITAS, L.; VERA, F.; LEÃO, S. Apreensão de espécimes da fauna silvestre em goiás – situação e destinação. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 2, p. 51–63, 2008.

FRIGERIO, D.; DITTAMI, J.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted corticosterone metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male Greylag geese (*Anser anser*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 29–36, 2004.

GABRIELSEN, G. W.; ARNOLDUS, S. B.; HOLGER, U. Orienting and freezing responses in incubating ptarmigan hens. **Physiology & Behavior**, v. 34, n. 6, p. 925–934, 1985.

GOSLING, S. D. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 1, p. 45–86, 2001.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 35–53, 2005.

GOYMANN, W.; MOSTL, E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). **The Auk**, v. 119, n. October, p. 1167–1173, 2002.

GREENBERG, R. Differences in Neophobia between Naive Song and Swamp Sparrows. **Ethology**, v. 91, n. 1, p. 17–24, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0310.1992.tb00847.x>>. .

GROOTHUIS, T. G. G.; CARERE, C. Avian personalities: Characterization and epigenesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 137–150, 2005.

HARPER, J. M.; AUSTAD, S. N. Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 1, p. 12–22, 2012.

HOLST, D. VON. The Concept of Stress and Its Relevance for Animal Behavior. **Advances in the Study of Behavior**, v. 21, p. 1,133, 1998.

JONES, S. M. Variations upon a theme: Australian lizards provide insights into the endocrine control of vertebrate reproductive cycles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 244, p. 60–69, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.004>>. .

JUNIOR, M. B. F. D.; CUNHA, H. F. A.; CASTRO DIAS, T. C. A. DE. Caracterização das apreensões de fauna silvestre no estado do Amapá , Amazônia oriental , Brasil. **Biota Amazônia**, v. 4, p. 65–73, 2014.

KALIN, N. H.; SHELTON, S. E.; RICKMAN, M.; DAVIDSON, R. J. Individual Differences in Freezing and Cortisol in Infant and Mother Rhesus Monkeys. **Behavioral Neuroscience**, v.

112, n. 1, p. 251–254, 1998.

KALLIOKOSKI, O.; TIMM, J. A.; IBSEN, I. B.; et al. Fecal glucocorticoid response to environmental stressors in green iguanas (*Iguana iguana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 177, n. 1, p. 93–97, 2012. Elsevier Inc.

KNOL, B. W. Stress and the endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: a review. **The Veterinary quarterly**, v. 13, n. 2, p. 104–114, 1991.

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; BOER, S. F. DE; et al. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–935, 1999.

KUMMROW, M. S.; GILMAN, C.; MACKIE, P.; SMITH, D. A.; MASTROMONACO, G. F. Noninvasive analysis of fecal reproductive hormone metabolites in female veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) by enzyme immunoassay. **Zoo Biology**, v. 30, n. 1, p. 95–115, 2011.

KUO, T.; MCQUEEN, A.; CHEN, T. C.; WANG, J. C. Glucocorticoid Signaling. **Springer New York**. p.99–126, 2015.

LACROIX, A.; N'DIAYE, N.; MIRCESCU, H.; TREMBLAY, J.; HAMET, P. The diversity of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome allows novel pharmacological therapies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1201–1209, 2000.

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

LÈCHE, A.; BUSSO, J. M.; HANSEN, C.; et al. Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, n. 2, p. 188–191, 2009. Elsevier Inc.

LIGHTMAN, S. L. The neuroendocrinology of stress: A never ending story. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 880–884, 2008.

LIJTMAYER, A.; SHARPE, N. M. M.; TUBARO, P. L.; LOUGHEED, S. C. Molecular phylogenetics and diversification of the genus *Sporophila* (Aves : Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 562–579, 2004.

LORDELLO, L. G. E. Pequena contribuição à história natural de alguns Fringillidae do Brasil (Passeriformes). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 8, p. 649–662, 1951.

MADDOCKS, S. A.; GOLDSMITH, A. R.; CUTHILL, I. C.; et al. Behavioural and physiological effects of absence of ultraviolet wavelengths on European starlings *Sturnus vulgaris*. **Journal of Avian Biology**, v. 3, p. 103–1006, 2002.

MADDOCKS, S.; CUTHILL, I. C.; GOLDSMITH, A. R.; SHERWIN, C. M. Behavioural and physiological effects of absence of ultraviolet wavelengths for domestic chicks. **Animal**

- Behaviour**, v. 62, n. Sherwin 1998, p. 1013–1019, 2001.
- MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 205–216, 1995.
- MEIER, A. H.; FIVIZZANI, A. J.; OTTENWELLER, J. E. Daily rhythm of plasma corticosterone binding activity in the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*. **Life Sciences**, v. 22, n. 5, p. 401–405, 1978.
- MILLER, M. W.; HOBBS, N. T.; SOUSA, M. C. Detecting stress responses in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): reliability of cortisol concentrations in urine and feces. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 1, p. 15–24, 1991.
- MIRANDA, M. D.; BERNARDI, P.; MORO-RIOS, R. F.; PASSOS, F. C. Antipredator Behavior of Brown Howlers Attacked by Black Hawk-eagle in Southern Brazil 1. **International Journal of Primatology**, v. 27, n. 4, p. 1097–1101, 2006.
- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3–4, p. 262–302, 2007.
- MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicator of stress. **Domestic Animal and Endocrinology**, v. 23, p. 67–74, 2002.
- MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings : an analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 34, p. 17–34, 2005.
- MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 25–44, 1984.
- NOGUEIRA, S.; MACÊDO, J.; SANT'ANNA, A.; NOGUEIRA-FILHO, S.; COSTA, M. P. DA. Assessment of temperament traits of white-lipped (*Tayassu pecari*) and collared peccaries (*Pecari tajacu*) during handling in a farmed environment. **Animal Welfare**, v. 24, n. 3, p. 291–298, 2015.
- NUNES, A. P. Estado de conservação da avifauna ameaçada de extinção ocorrente no Pantanal , Brasil. **Atualidades Ornitológicas**, v. 157, p. 85–98, 2010.
- OHL, F.; FUCHS, E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. **Cognitive Brain Research**, v. 7, n. 3, p. 379–387, 1999.
- OLSON, S. L. Interaction Between the Two Subspecies Groups of the Seed-Finch *Sporophila angolensis* in the Magdalena Valley, Colombia. **The Auk**, v. 98, n. 2, p. 379–381, 1981.
- OLSON, S. L. A new subspecies of *Sporophila angolensis* (Aves : Emberizidae ) from Isla de Coiba and other additions to the avifauna of the Veragua. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 120, n. 4, p. 377–381, 2007.
- PARREIRAS DE FREITAS, A. C. P. DE; OVIEDO-PASTRANA, M. E.; VILELA, D. A. DA R.; et al. Diagnóstico de animais ilegais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no ano de 2011. **Ciência Rural**, v. 45,

n. 1, p. 163–170, 2015.

PASTELL, M. CowLog – Cross-Platform Application for Coding Behaviours from Video. , p. 4–7, 2016.

PAULINO, R.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; SIQUEIRA, S. The role of individual behavioral distinctiveness in exploratory and anti-predatory behaviors of red-browed Amazon parrot (*Amazona rhodocorytha*) during pre-release training. **Applied Animal Behaviour Science**, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.05.023>>

POPP, L. G.; SERAFINI, P. P.; REGHELIN, A. L. S.; et al. Annual pattern of fecal corticoid excretion in captive Red-tailed parrots (*Amazona brasiliensis*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 178, n. 4, p. 487–493, 2008.

PORSTMANN, T.; KIESSIG, S. T. Enzyme immunoassay techniques an overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 150, n. 1–2, p. 5–21, 1992.

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

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

RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROMERO, L. M.; REMAGE-HEALEY, L. Daily and Seasonal Variation in Response to Stress in Captive Starlings (*Sturnus vulgaris*): Corticosterone. **General and Comparative Endocrinology**, v. 59, p. 52–59, 2000.

ROMERO, L. M.; SOMA, K. K.; WINGFIELD, J. C. The hypothalamus and adrenal regulate modulation of corticosterone release in redpolls (*Carduelis flammea* an arctic-breeding song bird). **General and Comparative Endocrinology**, v. 109, n. 3, p. 347–55, 1998.

SANT'ANNA, A. C.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Validity and feasibility of qualitative behavior assessment for the evaluation of Nellore cattle temperament. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 254–262, 2013. Elsevier.

SANTOS, E. A. M.; BUENO, M.; ARAÚJO, A. S.; et al. Aves do Centro de Triagem de Animais Silvestres do Estado do Amapá. **Ornithologia**, v. 4, n. 2, p. 86–90, 2011.

SCHWABL, P.; BONACCORSO, E.; GOYMANN, W. Diurnal variation in corticosterone release among wild tropical forest birds. **Frontiers in Zoology**, p. 1–11, 2016. *Frontiers in Zoology*. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12983-016-0151-3>>..

SEO, Y. Enzyme Immunoassays. , p. 344, 2000.

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

- SIH, A.; BELL, A.; JOHNSON, J. C. Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 7, p. 372–378, 2004.
- SIMS, C. G.; HOLBERTON, R. L. Development of the corticosterone stress response in young northern mockingbirds (*Mimus polyglottos*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 2, p. 193–201, 2000.
- SOUSA, M. B. C. DE; SILVA, H. P. A.; GALVÃO-COELHO, N. L. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. **Estudos de Psicologia**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2015.
- SPENCER, K. A.; VERHULST, S. Delayed behavioral effects of postnatal exposure to corticosterone in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). **Hormones and behavior**, v. 51, p. 273–280, 2007.
- STEEN, J. B.; GABRIELSEN, G.; KANWISHER, J. Physiological aspects of freezing behaviour in willow ptarmigan hens. **Acta Physiologica**, v. 134, n. 2, p. 299–304, 1988.
- STERLING, P. Physiology & Behavior Allostasis: A model of predictive regulation. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 1, p. 5–15, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.004>>. .
- STEVENSON-HINDE, J.; STILLWELL-BARNES, R.; ZUNZ, M. Subjective assessment of rhesus monkeys over four successive years. **Primates**, v. 21, p. 66–82, 1980.
- TAKAHASHI, L. K.; RUBIN, W. W. Corticosteroid Induction of Threat-Induced Behavioral Inhibition in Prewaning Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 5, p. 860–866, 1993.
- UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. **Neuroendocrine Control of Reproduction in Birds**. Elsevier, 2011.
- VALDESPINO., C.; MARTINEZ., R.; GARCÍA., L. M.; MARTINEZ., L. E. Evaluacion de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas : Evolución de una metodología no invasiva. **Acta Zoo. Mex.**, v. 23, n. 3, p. 151–180, 2007.
- VYAS, A.; CHATTARJI, S. Modulation of Different States of Anxiety-Like Behavior by Chronic Stress. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 6, p. 1450–1454, 2004.
- WALKER, B. G. Field Endocrinology and Conservation Biology. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 1, p. 12–18, 2005.
- WASSER, S. K.; BEVIS, K.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. **Conservation Biology**, v. 11, n. 4, p. 1019, 1997.
- WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; et al. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and comparative endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 260–275, 2000.
- WEMELSFELDER, F.; HUNTER, T. E. A.; MENDEL, M. T.; LAWRENCE, A. B. Assessing the “whole animal”: a free choice profiling approach. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 2, p. 209–220, 2001.
- WHISHAW, I. Q.; DRINGENBERG, H. C. How does the rat (*Rattus norvegicus*) adjust food



-carrying responses to the influences of distance , effort , predatory odor , food size , and food availability ? **Psychobiology**, v. 19, n. 3, p. 251–261, 1991.

WILSON, C. M.; HOLBERTON, R. L. An alternative method for delivering adrenocorticotropin hormone in birds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 349–53, 2001.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 8, p. 711–724, 2003.

WINGFIELD, J. C.; VLECK, C. M.; MOORE, M. C. Seasonal changes of the adrenocortical response to stress in birds of the Sonoran Desert. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 264, n. 4, p. 419–428, 1992.

YALOW, R. S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 200, n. 4347, p. 1236–1245, 1978.