

MONITORAMENTO NÃO INVASIVO DO ESTRESSE EM ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO

VANESSA SOUZA ALTINO¹, SERGIO LUIZ GAMA NOGUEIRA-FILHO^{1*} & SELENE SIQUEIRA DA CUNHA NOGUEIRA¹

¹Universidade Estadual de Santa Cruz e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estudos Interdisciplinares e Transdisciplinares em Ecologia e Evolução. E-mails: *slgnogue@uesc.br; van.altino@gmail.com; seleneuesc@gmail.com.

Abstract. Non-invasive monitoring of stress in captive wild animals. In recent decades, concerns about the welfare of captive-bred animals have intensified and, in parallel, measures addressed to evaluating the effects of an artificial environment and animal welfare are in demand. One way to assess animal stress is to perform noninvasive monitoring by evaluating the concentration of glucocorticoid metabolites in samples of feces. This technique is safe, convenient and practical, because there is no need to immobilize the animals, and feces collection is part of the daily routine adopted in captive breeding, so it hardly disturbs the subjects. The evaluation, however, needs to be interpreted with caution, because a rise in the concentration of glucocorticoid metabolites is not always related to poor welfare. For instance, positive behaviors such as play, copula and environmental enrichment can also increase glucocorticoid production by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In addition, animals with chronic stress may become habituated to their conditions and present a low production of glucocorticoid. Therefore, besides monitoring physiology, it is advisable to analyze behavioral responses to assess stress. The emergence or increase in the occurrence or frequency of behavior that is potentially indicative of stress, such as pacing and other stereotyped behaviors, may denote poor animal welfare. Therefore, in this paper we reviewed the methods used for non-invasive monitoring of physiological stress in Neotropical animals kept in captivity and highlighted the gaps to stimulate further research.

Keywords: abnormal behavior, animal welfare, fecal glucocorticoids, HPA axis, stereotyped behavior.

Resumo. Nas últimas décadas a preocupação com o bem-estar de animais criados em cativeiro foi intensificada e, paralelamente, houve aumento da demanda por estudos relacionados à avaliação do bem-estar desses animais. Uma das maneiras de avaliar o estresse dos animais é realizar o monitoramento não invasivo por meio da quantificação da concentração de metabólitos de glicocorticóides em amostras de fezes. Esta técnica é conveniente porque causa pouca perturbação aos animais durante a coleta das amostras, pois não há necessidade de imobilização dos animais; além disso, a coleta diária das fezes faz parte da rotina dos animais criados em cativeiro. A elevação na concentração de metabólitos de glicocorticoides, contudo, nem sempre está relacionada ao bem-estar empobrecido. Alguns exemplos confirmam que comportamentos positivos ao bem-estar dos animais, tais como brincadeira, cópula e o uso de enriquecimento ambiental também estimulam a produção e a elevação de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Além disso, animais com estresse crônico também podem se habituar às condições do ambiente e apresentarem baixa produção de glicocorticoides. Dessa forma, além do monitoramento fisiológico, é recomendada a análise das respostas comportamentais para acessar o estresse. O aparecimento ou aumento na ocorrência ou frequência de comportamentos potencialmente

indicadores de estresse, como *pacing* e outros comportamentos estereotipados, podem denotar bem-estar empobrecido. Nesse artigo, portanto, foi feita uma revisão sobre métodos usados para monitoramento não invasivo do estresse, em animais neotropicais criados em cativeiro, destacando as lacunas no conhecimento atual, para estimular novos estudos que determinem ferramentas para o monitoramento do bem-estar desses animais.

Palavras-chave: bem-estar animal, comportamento anormal, comportamento estereotipado, eixo HPA, glicocorticoide fecal.

INTRODUÇÃO

A manutenção de animais silvestres em cativeiro tem provocado debate. Enquanto em alguns artigos científicos são apresentados argumentos e dados favoráveis à atividade (CHALLENGER & MACMILLAN, 2014; FÀBREGAS *et al.*, 2015; GREENE *et al.*, 2016), outros autores discordam da proposta de manter espécies não domesticadas em zoológicos e são ainda mais contrários ao confinamento desses animais como animais de estimação e para produção de carne, couro e outros produtos (MCPHEE, 2004; MOCKRIN *et al.*, 2005; ARAKI *et al.*, 2007). Além da questão ética, se devemos ou não usar animais em benefício da espécie humana (MINTEER & COLLINS, 2013), existe a preocupação quanto ao bem-estar de animais silvestres mantidos em instalações comerciais (INTERNATIONAL ACADEMY OF ANIMAL WELFARE SCIENCE, 1992; NOGUEIRA *et al.*, 2011a; MINTEER & COLLINS, 2013). O estresse causado pelo cativeiro pode levar a inúmeras alterações tanto fisiológicas como comportamentais (MASON, 1991), que podem resultar em danos à saúde, dificuldades para reprodução e redução na produtividade, o que afeta a viabilidade da atividade (SQUIRES, 2003; NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA, 2004).

A carne de animais neotropicais ainda é a principal fonte de proteína animal para populações que vivem dentro e no entorno das florestas (ISAAC *et al.*, 2015; VAN VLIET *et al.*, 2016). Por esse motivo, alguns conservacionistas propuseram a criação de algumas espécies ainda não domesticadas, como o caititu (*Pecari tajacu*) e a paca (*Cuniculus paca*) em áreas onde a zootecnia tradicional é limitada pelas condições locais (CHARDONNET *et al.*, 2002; NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA, 2004). Tanto a caça quanto a destruição do hábitat para expansão da fronteira agrícola tem causado o declínio de algumas populações de espécies silvestres (ANTUNES *et al.*, 2016; BENÍTEZ-LÓPEZ *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017), por outro lado, algumas dessas espécies adaptam-se facilmente ao cativeiro (NOGUEIRA & NOGUEIRA-FILHO, 2011). A produção desses animais em cativeiro, portanto, pode ser um mecanismo para conservação da biodiversidade, por reduzir a pressão de caça de animais em vida livre uma vez que proporciona outra alternativa de renda em detrimento do tráfico e caça ilegal, ao mesmo tempo que atende às necessidades humanas por proteína animal (NOGUEIRA & NOGUEIRA-FILHO, 2011).

Para alcançar o sucesso na atividade é necessário

que sejam estabelecidos sistemas de produção que promovam e monitorem o bem-estar desses animais. Para isso é preciso estabelecer formas de monitoramento não invasivo do estresse dessas espécies, que permitam a avaliação contínua do bem-estar animal e assim viabilizar a adequação das práticas adotadas nessas criações quando detectadas condições não propícias. Dessa forma, no presente artigo tivemos como objetivo principal rever os estudos sobre métodos não invasivos para monitorar o bem-estar de animais neotropicais mantidos em cativeiro e estimular a execução de novos estudos na área.

BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE

O bem-estar de um indivíduo diz respeito às suas tentativas de lidar com seu ambiente (BROOM, 1986). Bem-estar, portanto, refere-se a todos os mecanismos de enfrentamento às condições do ambiente envolvendo mecanismos fisiológicos, comportamentais e imunológicos que são coordenados pelo cérebro. O animal pode conseguir ou não sucesso nesses processos de adaptação e seu bem-estar podendo ser medido e classificado de muito bom a muito pobre (BROOM, 2011). Uma das formas de medir o bem-estar animal é por meio de concentrações hormonais. Em resposta a um estímulo estressor, o hipotálamo é estimulado à produzir o hormônio liberador de corticotrofina. Este, por sua vez, estimula a parte anterior da hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico que, por sua vez, estimula a liberação de glicocorticoides (cortisol e/ou corticosterona) pelo córtex adrenal (LANE, 2006). Os glicocorticoides induzem a

gliconeogênese e a lipólise (THUN & SCHWARTZ-PORSCHÉ, 1994). Durante um evento de estresse agudo, portanto, a ação dos glicocorticoides inibe o acúmulo de glicose e disponibiliza energia ao indivíduo para as respostas de 'luta ou fuga' em resposta ao evento estressor (WILSON & REEDER, 2005). Simultaneamente os glicocorticoides modelam temporariamente os sistemas imunológico, reprodutivo e digestivo até que o agente estressor seja reduzido ou eliminado (SQUIRES, 2003).

A produção dos glicocorticoides é controlada por meio de um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativa: o córtex adrenal cessa a secreção de glicocorticoides quando seus níveis se elevam. Em situações de estresse crônico, contudo, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) é continuamente estimulado e os níveis de cortisol mantêm-se constantes prejudicando o animal. Esse prejuízo ocorre porque os glicocorticoides aceleram o catabolismo, degradando proteínas, promovendo a utilização da energia disponível para as respostas do animal ao agente estressor (GRAEFF, 2003). Os glicocorticoides promovem também a elevação da concentração de glicose no sangue, além de possuir um efeito anti-inflamatório, que reduz as respostas às lesões teciduais (MORMÈDE *et al.*, 2007). Adicionalmente, em animais jovens, os glicocorticoides podem afetar o crescimento (MOBERG, 2000), provavelmente, devido ao decréscimo da incorporação de proteínas no tecido muscular e inibição da secreção dos hormônios de crescimento.

Como a secreção de glicocorticoides aumenta com o estresse, a concentração plasmática destes hormônios pode ser usada como parâmetro para monitoramento da atividade adrenal (MORTON *et al.*, 1995; MÖSTL & PALME, 2002). Para a coleta de amostras do sangue, no entanto, há necessidade de contenção do animal, que por si só é um agente estressor, elevando a concentração de glicocorticoides no plasma, afetando desse modo os resultados da investigação (BAUER *et al.*, 2008). Por este motivo, técnicas de monitoramento endócrino não invasivo, que dispensam a contenção, estão sendo propostas, tais como aquelas que avaliam a concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes, na urina e na saliva dos animais. Para a coleta de amostras de urina e saliva, contudo, também é necessária a contenção e, por esse motivo, não são as mais indicadas para animais silvestres e não serão discutidas nessa revisão.

Por outro lado, a técnica mais usual empregada para monitoramento não invasivo do estresse em espécies silvestres é a determinação da concentração de metabólitos de glicocorticoides em amostras de fezes. Para a coleta dessas amostras não há necessidade de contenção e os metabólitos de glicocorticoides nas fezes são relativamente estáveis por até 72 horas (ABÁIGAR *et al.*, 2010). Adicionalmente, as excretas coletadas podem ser preservadas indefinidamente por congelamento (WASSER *et al.*, 2000; MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004; PALME, 2005). O monitoramento do estresse por meio da concentração de metabólitos de

glicocorticoides nas fezes é possível porque, após sua ação nas células-alvo, os glicocorticoides são desassociados de seus receptores e inativados, tanto pelas células-alvo quanto pelo fígado (NORRIS & CARR, 2007). Em seguida, são eliminados na bile e lançados nas fezes e/ou na urina, a depender da espécie (TAYLOR, 1971; BUSO & RUIZ, 2011). Existe, portanto, um intervalo de tempo entre a circulação dos hormônios no sangue e o aparecimento dos metabólitos hormonais nas fezes. A duração desse intervalo depende da taxa de passagem no intestino dos animais (PALME *et al.*, 1996). Em geral, o tempo para eliminação se aproxima ao tempo do trânsito gastrointestinal e da posição no intestino onde a bile é excretada até o reto, sendo que este período pode variar de 12 a 24 horas para mamíferos com fermentação pré-gástrica e de 24 a 48 horas para animais de ceco funcional (PALME *et al.*, 1996). No caso de aves, como papagaios, o trânsito é comparativamente mais rápido, entre 3-9 horas após o estímulo estressor agudo (FERREIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, esse atraso deve ser levado em consideração quando se pretende avaliar o efeito do estresse agudo causado por determinadas práticas de manejo, como captura, contenção, transporte e pesagem dos animais, por exemplo.

VALIDAÇÃO DO MONITORAMENTO ENDÓCRINO NÃO INVASIVO

Antes de sua excreção, os glicocorticoides passam por alterações metabólicas tanto no trato hepato-intestinal, quanto pela atividade da microflora presente no trato gastrointestinal, que

varia de espécie para espécie (DANISZOVÁ *et al.*, 2017). Devido às diferenças no metabolismo e na excreção dos glicocorticoides entre as espécies, o método de monitoramento endócrino precisa ser previamente validado, antes de ser usado para confirmar que a concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes de fato reflete a atividade adrenal naquela espécie em que se pretende usar a metodologia (SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996; TOUMA & PALME, 2005). O método normalmente utilizado para a validação fisiológica é o teste de desafio com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (WASSER *et al.*, 2000; GOYMANN, 2005; TOUMA & PALME, 2005). Neste desafio, o ACTH exógeno é administrado visando causar a ativação da atividade adrenocortical e, conseqüentemente, elevar a liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal na corrente sanguínea (WHITTEN *et al.*, 1998; WASSER *et al.*, 2000; HEISTERMANN *et al.*, 2006). Caso sejam detectadas mudanças no nível dos metabólitos de glicocorticoides nas amostras de fezes coletadas após a aplicação do ACTH exógeno, confirma-se que é possível monitorar, de forma indireta, as concentrações de esteroides no sangue, permitindo o uso desse tipo de monitoramento não invasivo do estresse para aquela espécie.

Durante o desafio de ACTH, as fezes dos animais são coletadas e, podem ser congeladas para análises posteriores. Depois de descongeladas, as amostras de fezes devem passar pelo processo de extração hormonal para retirar a maior quantidade de hormônio. Existem vários protocolos de extração que são baseados na

natureza lipídica dos hormônios. A maioria desses protocolos consiste na dissolução dos metabólitos em solventes orgânicos, álcoois e éteres, soluções aquosas ou técnicas mistas (PALME *et al.*, 1996). Após a extração, a quantificação dos hormônios pode ser realizada pela técnica de radioensaio (RIA) estabelecida por YALOW & BERSON, (1960). A análise é baseada no uso de um agente ligante específico e de hormônios radioativos como traçadores (THORELL & LARSON, 1978). A desvantagem desse tipo de análise é a necessidade dos laboratórios terem autorização para o uso de rastreadores radioisotópicos, além do preço elevado do equipamento para detecção de cintilação gama e beta.

Alternativamente, a quantificação dos hormônios pode ser realizada por imunoensaio enzimático (EIA - *enzyme immunoassays*). Nessa metodologia, utilizam-se anticorpos específicos para hormônios esteroides não metabolizados ou conjugados esteroides metabolizados (LASLEY & KIRKPATRICK, 1991; MUNRO *et al.*, 1991; CZEKALA *et al.*, 1994). Como os EIAs não utilizam radioatividade, não há necessidade de autorizações especiais, os equipamentos são comparativamente mais baratos e os reagentes são fáceis para preparar, estáveis e de validade mais longa do que os usados para o método RIA.

No início da aplicação da técnica de monitoramento de glicocorticoides (GC) nas fezes, foram utilizados vários solventes como metanol, etanol e propanol, com várias concentrações ou utilizando técnicas de extração mistas (PALME *et al.*, 2013). Mas, atualmente, a maioria dos

pesquisados utiliza metanol com a concentração de 80% para a extração de metabólitos de GC em mamíferos, enquanto que em aves prevalece o uso de metanol na concentração de 60% (TOUMA & PALME, 2005; PALME *et al.*, 2013). A utilização de metanol 80% é relativamente simples e produz a melhor recuperação de metabólitos em muitas espécies estudadas (MÖSTL & PALME, 2002; CORADELLO *et al.*, 2012; PALME *et al.* 1996, 2005, 2013). A maioria dos estudos utiliza a razão 10:1, ou seja, para cada 0,1 g de amostra seca de fezes é adicionado 1mL de solvente (o procedimento padrão é pesar 0,5 g de fezes secas e adicionar metanol com concentração de 80%) (GRAHAM *et al.*, 2001; CORADELLO *et al.*, 2012; PALME *et al.*, 2013).

Antes da aplicação da técnica em uma nova espécie, no entanto, é necessário fazer a validação bioquímica para verificar se o EIA é capaz de medir a concentração dos metabólitos de GC nas fezes (TOUMA & PALME, 2005). Para isso, verifica-se a similaridade imunogênica entre os antígenos padrão (com concentração conhecida) e o antígeno a ser dosado nas amostras através do ensaio de paralelismo (TOUMA & PALME, 2005). O *pool* do extrato das amostras é diluído em série como também o antígeno padrão, os dados obtidos passam pela transformação log-logit e a inclinação da curva desse *pool* é comparada com a da curva do antígeno padrão. Caso seja observado paralelismo a técnica é bioquimicamente validada (TOUMA & PALME, 2005).

Vários estudos foram realizados com objetivo de

validar os métodos de medição dos metabólitos de glicocorticoides na excreta de diversas espécies de animais domésticos, como ovelhas (*Ovis aries*), bovinos (*Bos taurus*), suínos (*Sus scrofa*) e galinhas (*Gallus domesticus*) (PALME *et al.*, 1996; MÖSTL *et al.*, 1999). Poucos estudos, contudo, foram feitos com animais neotropicais, como saguis (*Callithrix jachus*) (SOUSA & ZIEGLER, 1998), caititus (*Pecari tajacu*) (CORADELLO *et al.*, 2012), queixadas (*Tayassu pecari*) (NOGUEIRA-FILHO *et al.*, 2012) e papagaios (*Amazona aestiva*) (FERREIRA *et al.*, 2015). Para diversas outras espécies neotropicais usualmente mantidas em cativeiro, como capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), paca (*Cuniculus paca*) e cutia (*Dasyprocta* spp.), ainda precisam ser feitos testes de validação.

MONITORAMENTO DE COMPORTAMENTOS INDICADORES DE ESTRESSE

O aumento na concentração de glicocorticoides em amostras de fezes não é exclusivo de situações aversivas. Um dos objetivos da técnica de enriquecimento ambiental, por exemplo, é a promoção do aumento de comportamentos exploratórios para diminuir a inatividade dos animais e neste processo há um incremento de glicocorticoides (DAWKINS *et al.*, 2004). NOGUEIRA *et al.* (2011b), por exemplo, verificaram incremento na concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes de queixadas após a introdução de enriquecimento ambiental devido ao aumento no comportamento de brincadeira. Por outro lado, deve ser considerado que a elevação de cortisol pode estar associado

ao incremento de taxas de comportamentos anormais, o que seria considerado um sintoma de estresse (CARLSTEAD & BROWN, 2005). É preciso, portanto, que paralelamente às coletas de fezes para determinação da concentração de metabólitos de glicocorticoides, seja feita a coleta e análise de dados comportamentais para a interpretação mais correta das medidas hormonais, como recomendado por DAWKINS *et al.* (2004). Dessa forma, a quantificação de comportamentos estereotipados e outros potencialmente indicativos de estresse (BPIS do inglês: *behaviour potentially indicative of stress*, FERREIRA *et al.*, 2016).

provê uma medida complementar para a interpretação dos resultados após o monitoramento não invasivo do estresse de animais silvestres.

Poucos estudos decreveram BPIS para animais silvestres neotropicais mantidos em cativeiro. A pterofagia é um exemplo clássico de comportamento anormal observado em papagaios (*Amazona* spp.) mantidos em condições de bem-estar empobrecido (GASKINS *et al.*, 2011). Para caititus foi descrito o aumento no comportamento de vigilância e redução no comportamento exploratório (NOGUEIRA *et al.*, 2011a). Para queixadas foi verificado que o bater de dentes e a vocalização denominada “grunhido” estão relacionados com o estresse (NOGUEIRA *et al.*, 2016). Capivaras, por sua vez, apresentam o comportamento de congelamento (*freezing*), no qual se mantém paralizadas até que possam definir uma estratégia de fuga

efetiva, observando-se apenas movimentos de respiração em situações de perigo (NOGUEIRA, observação pessoal).

Outro comportamento anômalo frequente em animais em confinamento é a estereotipia, definida como padrão comportamental repetitivo, relativamente invariável, com nenhuma função biológica ou objetivo aparente (MASON, 1991). Alguns autores sugerem que o comportamento estereotipado é um mecanismo de enfrentamento para reduzir o estresse crônico ou para promover ao animal alguma forma de controle sobre o ambiente (BOISSY *et al.*, 2007; MASON *et al.*, 2007). O comportamento estereotipado (*padding*) foi observado em arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*) que também expressaram outro comportamento anômalo, o de arrancar as próprias penas (AZEVEDO *et al.*, 2016). Outros exemplos de comportamento estereotipado observados em outras espécies de animais Neotropicais são: *padding* em ema (*Rhea americana*) (AZEVEDO *et al.*, 2010); *padding*, andar em círculos e lambar as mãos repetidamente em cairara (*Cebus olivaceus*) (TÁRANO & LÓPEZ, 2015); e *padding* em onça (*Panthera onca*, SELLINGER & HA, 2005).

Outro aspecto a ser observado é a estratégia ou estilo de enfrentamento que está ligado à forma como os indivíduos reagem e adaptam-se a uma situação ou ambiente estressor (KOOLHAAS *et al.*, 1999, 2010). A resposta de enfrentamento atuaria como minimizador do estresse (KOOLHAAS *et al.*, 1999) e vários termos são usados para caracterizar essas estratégias, sendo um exemplo

os termos “proativo” e “reativo”. O enfrentamento proativo é caracterizado pelas tentativas do animal em escapar ou remover o estresse (resposta *fight-or-flight*) e a baixa sensibilidade às mudanças no meio ambiente, enquanto que no enfrentamento reativo os animais não mostram sinais de reação negativa, apresentam baixos níveis de comportamento de agressão, tendência em apresentar o comportamento de *freezing*, mostrar baixa atividade em resposta a desafios e elevada sensibilidade à mudança ambiental (SEAMAN *et al.*, 2002; KOOLHAAS *et al.*, 2010). Os indivíduos proativos também tendem a ter menor estimulação do eixo HPA e conseqüentemente, menor produção de glicocorticoides, quando comparados com animais reativos (TOUMA *et al.*, 2008; KOOLHAAS *et al.*, 2010). Dessa forma, é preciso que mais estudos sejam feitos para identificar os comportamentos que possam ser monitorados para avaliação do bem-estar de animais neotropicais mantidos em cativeiro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de monitoramento do estresse por meio não invasivo é uma necessidade para fornecer mais conforto aos animais, ao mesmo tempo em que permite a avaliação do ambiente e manejo em que o animal está submetido. No entanto, deve ser levado em consideração que concentrações elevadas de metabólitos de glicocorticoides nas fezes não é sempre um reflexo de bem-estar empobrecido; é necessário que paralelamente às coletas de fezes, seja feita a coleta e análise de dados comportamentais para a interpretação correta das medidas fisiológicas.

Essas duas técnicas em conjunto podem ser usadas como ferramentas para o monitoramento não invasivo do estresse de animais neotropicais mantidos em cativeiro, proporcionando assim uma boa prática de monitoramento para interferir o menos possível na rotina dos animais.

AGRADECIMENTOS

VSA recebeu bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, no. 001/2014). Também agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, no. 88881.119854/2016-01 para SSCN e no. 88881.119838/2016-01 para SLGNF). Agradecemos também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (8647/2015) pelo apoio a esse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÁIGAR, T.; DOMENÉ, M. A. & PALOMARES, F. 2010. Effects of fecal age and seasonality on steroid hormone concentration as a reproductive parameter in field studies. **European Journal of Wildlife Research** 56(5): 781-787.
- ANTUNES, A. P.; FEWSTER, R. M.; VENTICINQUE, E. M.; PERES, C. A.; LEVI, T.; ROHE, F. & SHEPARD JR, G. H. 2016. Empty forest or empty rivers? A century of commercial hunting in Amazonia. **Science Advances** 2(October): 1-14.
- ARAKI, H.; COOPER, B. & BLOUIN, M. S. 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the

- wild. **Science** **318**(100): 100-103.
- AZEVEDO, C. S.; CALDEIRA, J. R.; FAGGIOLI, A. B. & CIPRESTE, C. F. 2016. Effects of different environmental enrichment items on the behavior of the endangered Lear's Macaw (*Anodorhynchus leari*, Psittacidae) at Belo Horizonte Zoo, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia** **24**(September): 204-210.
- AZEVEDO, C. S.; FERRAZ, J. B.; TINOCO, H. P.; YOUNG, R. J. & RODRIGUES, M. 2010. Time-activity budget of greater rheas (*Rhea americana*, Aves) on a human-disturbed area: The role of habitat, time of the day, season and group size. **Acta Ethologica** **13**(2): 109-117.
- BAUER, B.; PALME, R.; MACHATSCHKE, I. H.; DITTAMI, J. & HUBER, S. 2008. Non-invasive measurement of adrenocortical and gonadal activity in male and female guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). **General and Comparative Endocrinology** **156**(3): 482-489.
- BENÍTEZ-LÓPEZ, A.; ALKEMADE, R.; SCHIPPER, A. M.; INGRAM, D. J.; VERWEIJ, P. A.; EIKELBOOM, J. A. J. & HUIJBREGTS, M. A. J. 2017. The impact of hunting on tropical mammal and bird populations. **Science** **356**: 180-183.
- BOISSY, A.; MANTEUFFEL, G.; JENSEN, M. B.; MOE, R. O.; SPRUIJT, B.; KEELING, L. J.; AUBERT, A. 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. **Physiology and Behavior** **92**(3): 375-397.
- BROOM, D. M. 1986. Indicators of Poor Welfare. **British Veterinary Journal** **142**(6): 2-4.
- BROOM, D. M. 2011. A History of Animal Welfare Science. **Acta Biotheoretica** **59**(2): 121-137.
- BUSSO, J. M. & RUIZ, R. D. 2011. Excretion of steroid hormones in rodents : An Overview on Species Differences for new biomedical animal research models. In D. Kandarakis (Ed.), *Contemporary aspects of endocrinology* (pp. 375–396). INTECH Open Access Publisher, Contemporary.
- CARLSTEAD, K. & BROWN, J. L. 2005. Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. **Zoo Biology** **24**(3): 215-232.
- CHALLENGER, D. W. S. & MACMILLAN, D. C. 2014. Poaching is more than an enforcement problem. **Conservation Letters** **7**(5): 484-494.
- CHARDONNET, P.; DES CLERS, B.; FISHER, J. R.; GERHOLD, R.; JORI, F.; LAMARQUE, F.; LAMARQUE, F. 2002. The value of wildlife. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE** **21**(1): 15-51.
- CORADELLO, M. A.; MORAIS, R. N.; ROPER, J.; SPER-COSKI, K. M.; MASSUDA, T.; NOGUEIRA, S. S. C. & NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. 2012. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** **43**(2): 275-282.
- CZEKALA, N. M.; LANCE, V. A. & SUTHERLAND-SMITH, M. 1994. Diurnal urinary corticoid excretion

in the human and gorilla. **American Journal of Primatology** **34**(1): 29-34.

DANISZOVÁ, K.; MIKULA, O.; MACHOLÁN, M.; POSPÍŠILOVÁ, I.; VOŠLAJEROVÁ BÍMOVÁ, B. & HIADLOVSKÁ, Z. 2017. Subspecies-specific response to ACTH challenge test in the house mouse (*Mus musculus*). **General and Comparative Endocrinology** **252**: 186-192.

Dawkins, M. S.; Edmond, A.; Lord, A.; Solomon, S. & Bain, M. 2004. Time course of changes in egg-shell quality, faecal corticosteroids and behaviour as welfare measure in laying hens. **Animal Welfare** **13**: 321-327.

FÀBREGAS, M. C.; FOSGATE, G. T. & KOEHLER, G. M. 2015. Hunting performance of captive-born South China tigers (*Panthera tigris amoyensis*) on free-ranging prey and implications for their reintroduction. **Biological Conservation** **192**: 57-64.

FERREIRA, J. C. P.; FUJIHARA, C. J.; FRUHVALLD, E.; TREVISOL, E.; DESTRO, F. C.; TEIXEIRA, C. R.; PALME, R. 2015. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). **Plos One** **10**(12): 1-14.

FERREIRA, R. G.; MENDEL, M.; WAGNER, P. G. C.; ARAUJO, T.; NUNES, D. & MAFRA, A. L. 2016. Coping strategies in captive capuchin monkeys (*Sapajus* spp.). **Applied Animal Behaviour Science** **176**(January): 120-127.

GASKINS, L. A.; ACVB, D.; BERGMAN, L.; ACVB, D.; GASKINS, L. A.; ACVB, D.; ACVB, D. 2011. Sur-

veys of avian practitioners and pet owners regarding common behavior problems in psittacine birds surveys of avian practitioners and pet owners regarding common behavior problems in psittacine birds. **Bio-One Research Evolved** **25**(2): 111-118.

GOYMANN, W. 2005. 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** **1046**: 35-53.

GRAEFF, F. G. 2003. Bases biológicas do transtorno de estresse Biological basis of posttraumatic stress disorder. **Medicina** **25**(Supl I): 21-24.

GRAHAM, L. H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W. & SAVAGE, A. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology** **20**(December): 227-236.

GREENE, D. U.; GORE, J. A. & STODDARD, M. A. 2016. Reintroduction of the endangered Perdido Key beach mouse (*Peromyscus polionotus trissyllepsis*): fate and movements of captive-born animals. **Florida Scientist** **79**(1): 1-13.

HEISTERMANN, M.; PALME, R. & GANSWINDT, A. 2006. Response to novel food and the role of social influences in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) and Goeldi's Monkeys (*Callimico goeldii*). **American Journal of Pri-**

matology **68**(11): 257-273.

- ISAAC, V. J.; ALMEIDA, M. C.; GIARRIZZO, T.; DEUS, C. P.; VALE, R.; KLEIN, G. & BEGOSSI, A. 2015. Food consumption as an indicator of the conservation of natural resources in riverine communities of the Brazilian Amazon. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias** **87**(4) 2229-2242.
- KOOLHAAS, J. M.; DE BOER, S. F.; COPPENS, C. M. & BUWALDA, B. 2010. Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. **Frontiers in Neuroendocrinology** **31**(3): 307-321.
- KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; & BLOKHUIS, H. J. 1999. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** **23**(7): 925-935.
- LANE, J. 2006. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals? **Animal Welfare** **15**: 331-342.
- LASLEY, B. & KIRKPATRICK, J. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids 121 121. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** **22**(1): 23-31.
- MASON, G.; CLUBB, R.; LATHAM, N. & VICKERY, S. 2007. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? **Applied Animal Behaviour Science** **102**(3-4): 163-188.
- MASON, J. G. 1991. Stereotypies: a critical review. **Animal Behaviour** **41**(6): 1015-1037.
- MCPHEE, M. E. 2004. Generations in captivity increases behavioral variance: Considerations for captive breeding and reintroduction programs. **Biological Conservation** **115**(1): 71-77.
- MILLSPAUGH, J. J. & WASHBURN, B. E. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: Considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology** **138**(3): 189-199.
- MINTEER, B. A. & COLLINS, J. P. 2013. Ecological ethics in captivity: Balancing values and responsibilities in zoo and aquarium research under rapid global change. **ILAR Journal** **54**(1): 41-51.
- MOBERG, G. P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In J. Moberg & G. Mench (Eds.), *The Biology of Animal Stress* (pp. 1-21). Oxon/New York, UK/USA: CABI Publishing.
- MOCKRIN, M. H.; BENNETT, E. L. & LABRUNA, D. T. 2005. Wildlife farming: a viable alternative to hunting in Tropical forests? In *WCS Working Paper* (Vol. 23). New York: Wildlife Conservation Society.
- MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; & VEISSIER,

- I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior** **92**(3): 317-339.
- MORTON, D. J. E.; ANDERSON, C. M.; FOGGIN, M.; KOCK, M. & TIRAN, E. 1995. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. **The Veterinary Record** **136**: 60-63.
- MÖSTL, E.; MESSMANN, S.; BAGU, E.; ROBIA, C.; PLAME, R. & PALME, R. 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. **Journal of Veterinary Medicine Series A** **46**(10): 621-631.
- MÖSTL, E. & PALME, R. 2002. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology** **23**(1-2): 67-74.
- MUNRO, C.; STABENFELDT, G.; CRAGUN, J. R.; ADDIEGO, L. A.; OVERSTREET, J. W. & LASLEY, B. L. 1991. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry** **37**(6): 838-844.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; CARVALHO, H. & SILVA, H. FERNANDES, L. C. & Nogueira, S. S. C. 2012. Stress assessment in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). **Suiform Soundings** **11**(2): 21-27.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. & NOGUEIRA, S. S. C. 2004. Captive Breeding Programs as an Alternative for Wildlife Conservation in Brazil. In K. Silvius, R. Bodmer, & J. Fragoso (Eds.), *People in Nature: Wildlife Management and Conservation in Latin America* (1st ed., Vol. 1, pp. 171-190). Nova York: Press, Columbia University.
- NOGUEIRA, S. S. C.; CALAZANS, S. G.; COSTA, T. S. O.; PEREGRINO, H. & NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. 2011. Effects of varying feed provision on behavioral patterns of farmed collared peccary (Mammalia, Tayassuidae). **Applied Animal Behaviour Science** **132**(3-4): 193-199.
- NOGUEIRA, S. S. C. & NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. 2011. Wildlife farming: An alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? **Biodiversity and Conservation** **20**(7): 1385-1397.
- NOGUEIRA, S. S. C.; SOLEDADE, J.; POMPÉIA, S. & NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. 2011. The effect of environmental enrichment on play behaviour in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). **Animal Welfare** **20**(4): 505-514.
- NOGUEIRA, S. S. C.; LACERDA, Z.; MAGALHÃES, P. S. M.; NETO, J. P. S.; ABREU, S. A.; PEREGRINO, H. & LIMA, S. G. C. 2016. The use of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) vocalizations as welfare indicator. **Suiform Soundings** **15**: 77-85.
- NORRIS, D. O. & CARR, J. A. 2007. Synthesis, metabolism, and actions of bioregulators. In

- D. O. Norris (Ed.), *Vertebrate Endocrinology* (pp. 46–105). Sandi Diego, USA: Elsevier Academic Press.
- PALME, R. 2005. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences** **1046**: 75-80.
- PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H. & ISMAIL, M. N. 1996. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science** **43**: 43-63.
- PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M. & MÖSTL, E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and non-invasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences** **1040**: 162-171.
- PALME, R.; TOUMA, C.; ARIAS, N.; DOMINCHIN, M. F. & LEPSCHY, M. 2013. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift** **100**(9–10): 238-246.
- RIBEIRO, V. M. F.; SATRAPA, R.; DINIZ, J. V. A.; FÊO, H. B.; FLÓREZ, L. M. M.; SATRAPASATRAPA, R. A. & OBA, E. 2017. Synchronization of estrus in paca (*Cuniculus paca* L.): possible impacts on reproductive and productive parameters. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** **54**(1): 27-35.
- SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R. & BAMBERG, E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science** **42**(1–4): 515-526.
- SEAMAN, S. C.; DAVIDSON, H. P. B. & WARAN, N. K. 2002. How reliable is temperament assessment in the domestic horse (*Equus caballus*)? **Applied Animal Behaviour Science** **78**(2–4): 175-191.
- SELLINGER, R. L. & HA, J. C. 2005. The effects of visitor density and intensity on the behavior of two captive jaguars (*Panthera onca*). **Journal of Applied Animal Welfare Science** **8**(4): 233-244.
- SOUSA, M. B. C. & ZIEGLER, T. E. 1998. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. **American Journal of Primatology** **46**(2): 105-117.
- SQUIRES, E. J. 2003. **Applied animal endocrinology**. (CAB International, Ed.) (1st ed.). Wallingford, UK: Squires, Eli James.
- TÁRANO, Z. & LÓPEZ, M. C. 2015. Behavioural repertoires and time budgets of semi-free-ranging and captive groups of wedge-capped capuchin monkeys, *cebus olivaceus*, in zoo exhibits in Venezuela. **Folia Primatologica** **86**(3): 203-222.
- TAYLOR, W. 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. **Vitam. Horm** **29**: 201-285.

- THORELL, J. & LARSON, S. 1978. Radioimunoassay and related techniques. In *Methodology and Clinical Applications* (p. 289). Saint Louis, USA: Mosby Company.
- THUN, R. & SCHWARTZ-PORSCHKE, D. 1994. Nebennierenrinde. In F. Döcke (Ed.), *Nebennierenrinde* (1st ed., pp. 309–356). Jena Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag.
- TOUMA, C.; BUNCK, M.; GLASL, L.; NUSSBAUMER, M.; PALME, R.; STEIN, H. & LANDGRAF, R. 2008. Mice selected for high versus low stress reactivity: A new animal model for affective disorders. **Psychoneuroendocrinology** **33**(6): 839-862.
- TOUMA, C. & PALME, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences** **1046**(0): 54-74.
- VAN VLIET, N.; CORNELIS, D.; BECK, H.; LINDSEY, P.; NASI, R.; LEBECK, S. & JORI, F. 2016. Meat from the wild: extractive uses of wildlife and alternatives for sustainability. In R. MATEO, B. ARROYO, & J. T. GARCÍA (Eds.), *Current trends in wildlife research*. (p. 293). Suíça: Springer.
- WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U. & MONFORT, S. L. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology** **120**(3): 260-275.
- WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K. & STAVISKY, R. C. 1998. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American Journal of Physical Anthropology Suppl** **27**: 1-23.
- WILSON, D. E. & REEDER, D. A. M. 2005. **Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- YALOW, R. S. & BERSON, S. A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **Obesity Research** **4**(6): 583-600.

Recebido: 12/02/2018

Revisado: 19/02/2018

Aceito: 06/03/2018

