

# Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais

Eduardo Antunes DIAS<sup>1</sup>  
Cláudio Alvarenga de OLIVEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP

## Correspondência para:

EDUARDO ANTUNES DIAS  
Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH)  
Departamento de Reprodução Animal  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo  
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87  
Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira  
05508-000 - São Paulo - SP  
eantdias@usp.br

Recebido para publicação: 18/03/2003  
Aprovado para publicação: 11/12/2006

## Resumo

Para o presente estudo utilizaram-se amostras de excretas cloacais de 50 aves da família Psittacidae, previamente sexadas. Os andrógenos e estrógenos fecais foram extraídos com Tampão Fosfato Salino (PBS) e com uma solução PBS:Álcool Etílico (4:1) e a mensuração hormonal foi realizada em “kits” comerciais para radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). O sexo de cada ave foi confirmado utilizando como parâmetro o intervalo de confiança (95%) da média dos valores transformados dos índices do fator testosterona e seus metabólitos. Setenta por cento das aves tiveram o sexo confirmado pela técnica do radioimunoensaio. Os resultados encontrados demonstram a necessidade da realização de mais estudos para a determinação do sexo de aves monomórficas por meio de técnicas não invasivas.

## Palavras-chave:

Sexagem.  
Psitacídeos.  
Excretas cloacais.  
Esteróides sexuais.  
Radioimunoensaio.

## Introdução

A Família Psittacidae é constituída por 339 espécies de aves em todo o mundo<sup>1</sup>. Somente na América do Sul vivem mais de 100 espécies, sendo que 72 delas estão no Brasil<sup>2</sup>. Por esse fato, o nosso país já foi chamado de “Terra dos Papagaios” (*Brasilia sive terra papagallorum*) nos primeiros anos pós-descobrimto. Seus principais representantes são as araras e os papagaios, sendo esses últimos os mais populares e os mais estudados devido à suas habilidades na articulação de sons e na resolução de problemas. É justamente o tráfico ilegal dessas aves e a fragmentação dos seus *habitats*, ocasionados pelo avanço da fronteira agrícola e pela pressão da ocupação humana, que fazem com que muitas dessas espécies estejam ameaçadas de extinção. Das 38 espécies de psitacídeos citadas no “Threatened Birds of America”, 14 (36,84%) têm distribuição geográfica no Brasil<sup>3</sup>. Os casos mais críticos são: Ararinha-

azul (*Cyanopsitta spixii*), considerada extinta na natureza e com aproximadamente 60 indivíduos em cativeiro, sendo apenas 8 no Brasil<sup>4</sup>; Arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari*), com aproximadamente 246 indivíduos de vida livre na região conhecida como Raso da Catarina, ao nordeste do Estado da Bahia<sup>5</sup>; Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), que tem por volta de 4.500 indivíduos distribuídos na Serra do Mar, entre o sudeste do Estado de São Paulo e o leste do Estado do Paraná<sup>6,7</sup>.

O estudo endocrinológico propiciou uma nova maneira de se identificar o sexo das aves e até mesmo de traçar o perfil hormonal destas. As pesquisas iniciaram mensurando níveis plasmáticos de esteróides sexuais por meio do radioimunoensaio (RIA). Posteriormente, buscando-se uma abordagem não invasiva, menos estressante e menos traumática, os trabalhos concentraram-se em dosagens desses esteróides através das excretas cloacais<sup>8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18</sup>. Por meio da mensuração de metabólitos de esteróides

sexuais em aves, determina-se a relação entre hormônios femininos e masculinos, expressa pela razão estrógenos:andrógenos. Esses hormônios são usados como parâmetro por apresentarem grande importância durante o desenvolvimento e a maturação sexual<sup>19,20</sup>. Se o resultado dessa razão tiver valores altos, devido à alta concentração de estrógenos e baixa concentração de andrógenos, a ave será sexada como fêmea. Se o resultado for baixo (o inverso do primeiro), será sexada como macho.

Alguns fatores poderão influenciar os resultados, como a época reprodutiva e a maturação sexual. Papagaios com um ano e meio ainda não atingiram a maturidade sexual e social<sup>21</sup>. Vários estudos demonstram que os níveis dos principais esteróides gonadais aumentam durante o desenvolvimento sexual e durante a época reprodutiva<sup>22,23,24,25,26</sup>.

Governo, zoológicos, criadouros científicos, comerciais e conservacionistas têm um importante papel em programas de conservação e em planos de manejo reprodutivo para essas espécies. A correta determinação do sexo para a formação de casais objetivando a reprodução em cativeiro e visando uma posterior soltura monitorada dos descendentes na natureza é uma das principais medidas para que se obtenha sucesso nesses tipos de programas e planos. Igualmente relevante é a manutenção dos animais de vida livre<sup>27</sup>. Quando se toma todo o universo de espécies que compõem o grupo das aves, aproximadamente 30% delas não apresentam dimorfismo sexual externo<sup>8,28</sup>. Sendo a Família Psittacidae uma das que possui maior número de espécies com essa característica, torna-se pertinente o uso de técnicas para a determinação do sexo que tragam menor risco à vida da ave e que tenham resultados confiáveis.

## Materiais e Métodos

### Colheita das amostras

Foram utilizadas no experimento 50 aves nativas de 18 espécies diferentes da

família Psittacidae que já estavam sexadas por PCR (Polimerase Chain Reaction) e que se encontravam no Criadouro Conservacionista Rancho das Hortências, no Município de Tapiraí, Estado de São Paulo. Todos os animais possuíam identificação, sendo padronizado uma anilha na pata esquerda para fêmeas e na pata direita para machos. Algumas aves também foram identificadas por características físicas individuais. No decorrer do estudo, preferencialmente foram colhidas amostras de animais adultos com três anos ou mais, pois a maturidade sexual das aves tem influência na produção de hormônios sexuais.

As espécies estudadas foram: Aratinga-de-testa-vermelha (*Aratinga solstitialis auricapilla*); Papagaio-do-mangue (*Amazona amazonica*); Maitaca-de-maximiliano (*Pionus maximiliani*); Periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalmus*); Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*); Papagaio-papa-cacau (*Amazona festiva*); Maracanã-verdadeira (*Propyrrhura maracana*); Jandaia-sol (*Aratinga solstitialis jandaya*); Papagaio-galego (*Amazona xanthops*); Maitaca-de-cabeça-azul (*Pionus menstruus*); Periquito-estrela (*Aratinga aurea*); Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*); Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*); Papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*); Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*); Papagaio-campeiro (*Amazona ochrocephala*); Periquito-da-caatinga (*Aratinga cactorum*) e Periquito-rico (*Brotogeris tirica*) (Figura 1).

As amostras foram colhidas em março (aproximadamente 1/3 destas) e principalmente em novembro de 2001 (aproximadamente 2/3). Segundo os registros de nascimentos nesse criadouro, a época reprodutiva dessas aves engloba esse período. Cada ave teve um acompanhamento individual exclusivo e as excretas cloacais foram colhidas após a visualização da defecação. Na porção inferior de cada viveiro, foi colocada uma lona plástica para a retenção das excretas, que foram colhidas com o auxílio de espátulas plásticas limpas em álcool etílico 96% e descartadas após o uso. As excretas

foram acondicionadas em tubos de polipropileno KMA de 4 ml com tampas de rosca, foram devidamente identificados e posteriormente congeladas em um prazo máximo de 12h após a colheita a uma temperatura de -20°C.

#### **Solubilização dos metabólitos**

No Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH), as amostras foram liofilizadas em centrífuga refrigerada a vácuo (“speed-vac”) e armazenadas à temperatura de -20°C até o momento da solubilização. Isso se deve a necessidade de se retirar a influência da presença da água nas amostras, em função da variedade das espécies estudadas, e aumentar o tempo de conservação. As excretas cloacais apresentaram teor médio de umidade de aproximadamente 80%. Estas foram então dissolvidas em Tampão Fosfato Salino (PBS) com gelatina (0,0874 g de fosfato de sódio dibásico 12 H<sub>2</sub>O; 0,0216 g de fosfato de sódio monobásico 1 H<sub>2</sub>O; 0,004 g de azida de sódio; 0,036 g de cloreto de sódio; 0,004 g de agarose; 4 ml de água ultrapura; pH 7,0) em uma relação peso:volume de 1:8 (em média 0,5 g para 4 ml) e maceradas com o uso de um bastão de vidro, evitando-se a contaminação entre estas. Após esse processo, foram agitadas no “vortex” por 1 minuto e levadas para um homogeneizador de amostras sanguíneas, onde ficaram nesse processo “overnight”. Foram então agitadas no “vortex” por mais 1 minuto e centrifugadas a 1.155 x g por 20 minutos a 5°C. Reservou-se o sobrenadante e descartou-se o sedimento. O sobrenadante foi novamente centrifugado (1.155 x g por 20 minutos a 5°C), evitando-se assim partículas que tenham persistido à primeira centrifugação. Os metabólitos das amostras foram mensuradas pela técnica do radioimunoensaio e o resultado foi expresso em pg/g fezes secas (estrógenos) ou ng/g fezes secas (andrógenos).

#### **Mensuração dos metabólitos**

Os metabólitos dos estrógenos e

andrógenos foram mensurados em duplicata por meio de “kits” comerciais de radioimunoensaio para Testosterona - fase sólida (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostic Division, Costa Mesa, CA 92626) e Estrógenos Totais – duplo anticorpo (ICN Pharmaceuticals, Inc. Diagnostic Division, Costa Mesa, CA 92626). Os ensaios foram realizados segundo o protocolo do fabricante.

#### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados através do aplicativo Guided Data Analysis do programa The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000, nº serial GTA-31722-232).

Esses foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. O próprio aplicativo emprega vários tipos de testes estatísticos com essa finalidade, sem especificar qual foi utilizado. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (Inverso da Raiz Quadrada – 1/RQ X) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Foi realizado também o cálculo com o intervalo de confiança 95% para a média das aves do grupo do Criadouro, com os seus dados transformados para a verificação do sexo dos animais. Não foi comparado o método de sexagem por meio de metabólitos fecais com a técnica da PCR, pois essa última foi realizada por um laboratório particular.

Para a descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os desvios padrões dos dados originais e as variâncias dos dados transformados, quando necessária a transformação. Os testes foram fixados em  $p < 0,05$  para a rejeição da hipótese de nulidade.

## **Resultados e Discussão**

É importante enfatizar o fato de que as aves do Criadouro Conservacionista Rancho das Hortências estavam em sua

maioria acasaladas e adaptadas aos recintos ao ar livre, em consequência do longo período nessa situação.

Em relação à dominância, algumas aves podem desenvolver esse comportamento, levando a subserviência para com outros indivíduos, inclusive entre animais do mesmo sexo. É o que parece ter acontecido com dois machos de papagaio-de-peito-roxo dos viveiros 46 (Andrógeno [1/raiz quadrada]= 0,966) e 49 (Andrógeno [1/raiz quadrada]= 1,386). Seus esteróides sexuais tiveram níveis compatíveis com os níveis das fêmeas. Em grupos de papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), os machos ocupam posições sociais mais altas do que as fêmeas (WEINHOLD, 1998 apud SEIBERT; CROWELL-DAVIS, 2001)<sup>29</sup>. Em outro estudo com um grupo de calopsitas, os machos demonstraram comportamento mais agressivo que o das fêmeas e as associações entre as aves não foi ao acaso, mas seguiu preferências individuais que se refletiram sobre o comportamento reprodutivo<sup>29</sup>. Essa informação é de extrema importância, visto que a maioria dos acasalamentos em criadouros de psitacídeos é realizada de maneira forçada. Em vida livre, durante a época reprodutiva os papagaios vivem em pequenos grupos composto pelo casal e seu(s) filhote(s), mas fora dessa época, as aves tendem a ser fortemente sociais e gregárias e o tamanho do bando pode crescer significativamente (GILARDI; MUNN, 1998 apud MEEHAN; GARNER; MENCH, 2003)<sup>21</sup>. A adaptação ao local também pode afetar o comportamento das aves e conseqüentemente as relações entre os indivíduos e a sua reprodução. O tipo de construção do ninho, o enriquecimento ambiental e o pareamento isossexual de psitacídeos juvenis podem diminuir o desenvolvimento de anormalidades de comportamento associado a posturas no chão do recinto, à agressão, ao medo, à vocalização excessiva e ao arrancamento de penas<sup>30,31</sup>.

Em nenhuma das situações analisadas, a média dos níveis de estrógenos das fêmeas

teve diferença significativa quando comparada com a média dos níveis de estrógenos dos machos (fêmeas= 997,23 pg/g fezes±807,94; machos= 1114,70 pg/g fezes±1237,18; p=0,9364). Esse resultado difere da maioria dos casos relatados em literatura. Para Tell e Lasley<sup>28</sup>, “Em cacatuas, parece que as fêmeas excretam significativamente níveis mais altos de todas as formas de estrógenos que os machos”. Tal fato pode ser justificado pela baixa atividade gonadal das fêmeas quando comparado com os machos, fazendo com que seus níveis estrogênicos decrescessem aos níveis dos machos e até mesmo permanecessem abaixo desses.

Já em relação aos níveis de testosterona e seu metabólito, existiu diferença significativa na comparação entre os machos e as fêmeas (machos = 29,268 ng/g fezes±80,64, fêmeas= 1,195 ng/g fezes±1,33; p=0,0002). Esses dados comprovam que nesse experimento, os níveis androgênicos entre machos e fêmeas tiveram uma participação decisiva na determinação do sexo das aves do grupo do Criadouro.

Papagaios, no geral, possuem baixos índices reprodutivos em cativeiro. Para um grande número de espécies de papagaios, incluindo aquelas que estão ameaçadas de extinção na natureza, a taxa reprodutiva é baixa e a importação legal ou o contrabando de indivíduos de vida livre ainda continua sendo a alternativa mais barata<sup>32</sup>.

Na sexagem das aves, utilizou-se o intervalo de confiança (95%) da média com base nos valores transformados do fator Andrógeno. A porcentagem de acerto foi de 70% (fêmea<sup>3</sup>0,78; macho<sup>≤</sup>0,68; valores entre esse intervalo não determinaram o sexo). Os valores do limite inferior e do limite superior do fator Estrógeno, tanto para machos quanto para fêmeas, se sobrepuseram por não existir diferença significativa entre eles. Na literatura, a porcentagem de acerto na determinação do sexo de psitacídeos com base no fator Razão foi de 63,5%<sup>8</sup>. Em outro estudo, foi obtido 70% de acerto na determinação do sexo com

VIVEIRO	AVE	SEXO	ESTRÓGENO (pg/ g fezes)	ANDRÓGENO (ng/ g fezes)	ANDRÓGENO (1/Raiz Quadrada)
Suspenso 2	Aratinga-de-testa-vermelha	macho	585,34	11,33	0,297
Suspenso 5	Papagaio-do-mangue	macho	1371,4	17,93	0,236
Suspenso 5	Papagaio-do-mangue	fêmea	554,39	0,49	1,428
Suspenso 18	Papagaio-do-mangue	macho	397,96	0,82	1,104
Suspenso 18	Papagaio-do-mangue	fêmea	908,91	0,52	1,386
Suspenso 6	Maitaca-de-maximiliano	macho	2023,96	2,55	0,626
Suspenso 27	Maitaca-de-maximiliano	fêmea	2225,7	1,3	0,877
Suspenso 27	Maitaca-de-maximiliano	fêmea	3797,4	6,61	0,388
Suspenso 32	Maitaca-de-maximiliano	macho	1328,93	14,5	0,262
Suspenso 32	Maitaca-de-maximiliano	fêmea	1094,54	1,41	0,842
Suspenso 7	Periquitão-maracanã	fêmea	491,98	0,55	1,348
Suspenso 22	Periquitão-maracanã	fêmea	759,13	2,61	0,618
Suspenso 48	Periquitão-maracanã	macho	679,98	0,87	1,072
Suspenso 48	Periquitão-maracanã	fêmea	415,42	0,5	1,414
Suspenso 14	Papagaio-verdadeiro	macho	975,39	5,8	0,415
Suspenso 23	Papagaio-verdadeiro	macho	1737,94	259,39	0,062
Suspenso 23	Papagaio-verdadeiro	macho	6113,11	347,31	0,053
Suspenso 10	Papagaio-papa-cacau	macho	3507,57	12,92	0,278
Suspenso 57	Papagaio-papa-cacau	fêmea	209,38	0,51	1,40
Suspenso 11	Maracanã-verdadeira	fêmea	626,4	0,52	1,386
Viveiro pequeno	Maracanã-verdadeira	macho	672,5	0,76	1,147
Suspenso 15	Jandaia-sol	fêmea	287,5	0,72	1,178
Suspenso 19	Jandaia-sol	macho	1396,58	6,15	0,403
Suspenso 19	Jandaia-sol	fêmea	940,34	0,6	1,290
Suspenso 16	Papagaio-galego	fêmea	660,06	0,65	1,240
Suspenso 16	Papagaio-galego	fêmea	995,74	0,9	1,054
Suspenso 34	Papagaio-galego	macho	291,28	0,52	1,386
Suspenso 34	Papagaio-galego	fêmea	518,62	0,87	1,072
Suspenso 20	Maitaca-de-cabeça-azul	macho	2089,99	34,2	0,170
Suspenso 35	Maitaca-de-cabeça-azul	macho	283,22	1,13	0,940
Suspenso 35	Maitaca-de-cabeça-azul	macho	202,26	0,52	1,386
Suspenso 35	Maitaca-de-cabeça-azul	fêmea	921,07	0,79	1,125
Suspenso 24	Periquito-estrela	fêmea	1796,94	1,04	0,980
Gaiola 5	Periquito-estrela	macho	243,48	0,51	1,400
Suspenso pequeno 8	Periquito-estrela	fêmea	695,83	2,52	0,629
Suspenso 28	Maracanã-nobre	macho	716,16	3,61	0,526
Suspenso 37	Maracanã-nobre	fêmea	2124	2,0	0,707
Suspenso 29	Papagaio-de-cara-roxa	macho	771,33	6,69	0,386
Suspenso 45	Papagaio-chauá	macho	818,93	5,11	0,442
Suspenso 45	Papagaio-chauá	fêmea	1123,63	0,51	1,4
Suspenso 46	Papagaio-de-peito-roxo	macho	529,37	1,07	0,966
Suspenso 46	Papagaio-de-peito-roxo	macho	462,93	45,95	0,147
Suspenso 46	Papagaio-de-peito-roxo	macho	557,41	3,73	0,517
Suspenso 49	Papagaio-de-peito-roxo	macho	549,49	0,52	1,386
Suspenso 49	Papagaio-de-peito-roxo	macho	643,94	4,67	0,462

Figura 1– Relação de psitacídeos estudados com os respectivos resultados da mensuração dos metabólitos hormonais com os valores não transformados (pg/ g fezes e ng/ g fezes) e transformados (1/Raiz Quadrada), sendo que a cor verde indica a confirmação do sexo, a cor vermelha indica erro na confirmação do sexo e a cor azul indica a incapacidade na confirmação do sexo. São Paulo, 2002

aves de vários gêneros e espécies<sup>18</sup>. Assim sendo, sempre é importante lembrar que cada local comporta-se de maneira muito particular devido à padronização do manejo.

### Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo

nos permitem chegar as seguintes conclusões:

1.É possível determinar o sexo de psitacídeos por radioimunoensaio de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais;

2.A determinação do sexo de psitacídeos no grupo das aves do Criadouro, utilizando-se o fator Andrógeno foi correta em 70% das situações.

### Psittacine sex determination by radioimmunoassay (RIA) of sex steroids using fecal samples

#### Abstract

For the current study, it were used fecal samples from 50 psittacines, previously sexed by PCR from blood cells. The fecal androgens and estrogens metabolites were extracted with PBS (Phosphate Buffer Saline) or PBS:Ethil Alcohol (4:1) and measured by comercial radioimmunoassay kits at the “Laboratório de Dosagens Hormonais” of the “Departamento de Reprodução Animal” of the “Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia” of the “Universidade de São Paulo”. The sex determination of the birds were performed using the confidence interval (95%) for transformed androgens values. 70% of birds had the sex confirmed by radioimmunoassay. The results showed that further studies for sex determination on monomorphic birds by non-invasive techniques are necessary.

#### Key-words:

Sex determination.  
Psittacines.  
Feces.  
Sexual steroids.  
RIA.

#### Referências

1 AUSTIN JR, O. L. **Families of birds**. New York: Golden Press, 1971. 200 p.

2 SICK, H. Ordem Psitaciforme. In: **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 351-382.

3 LISTA oficial das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. 2.9 Psitaciformes. **RENTAS**. Disponível em: < <http://www.rentas.org.br/index.php?action=listaoficial&mn=6&titulo=Lista%20de%20animais%20ameaçados&idioma=pt> >. Acesso em: 27 dez. 2002.

4 IBAMA dissolve comitê de recuperação da ararinha-azul. **IBAMA** – terça-feira 16/07/2002. Fonte: IBAMA. Disponível em: < [http://www.saudeanimal.com.br/noticia\\_ararinha.htm](http://www.saudeanimal.com.br/noticia_ararinha.htm) >. Acesso em: 27 dez. 2002.

5 CENSO do IBAMA mostra que a população de araras-azuis cresceu. **Folha On Line**. 11/06/2002 – 12h56min. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u3953.shtml> >. Acesso em: 28 dez. 2002.

6 COLLAR, N. J.; GONZAGA, L. P.; KRABBE, N.; MADROÑO NIETO, A.; NARANJO, L. G.; PARKER III, T. A.; WEGE, D. C. **Threatened birds of Americas:**

the ICBP/IUCN Red Data Book. Cambridge, UK: International Council of Bird Preservation, 1992. 1150 p.

7 PROJETO de conservação do papagaio-de-cara-roxa. **SPVS** – Sociedade de pesquisa em vida selvagem e educação ambiental. Comunicações PG1. Disponível em: < <http://www.spvs.org.br/projetos/papagaio.doc> > . Acesso: 28 dez. 2002.

8 BERCOVITZ, A. B.; CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. A new method of sex determination in monomorphic birds. **Journal of Zoology and Animal Medicine**, v. 9, p. 114-124, 1978.

9 BERCOVITZ, A. B.; COLLINS, J.; PRICE, P.; TUTTLE, D. Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive Bald Eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). **Zoo Biology**, v. 1, p. 111-117, 1982.

10 BISHOP, C. M.; HALL, M. R. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. **Journal of Zoology (London)**, v. 224, p. 649-668, 1991.

11 COCKREM, J. F.; ROUNCE, J. R. Faecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentration in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 35, p. 433-443, 1994.

12 COCKREM, J. F.; ROUNCE, J. R. Non-invasive

- assessment of the annual gonadal cycle in free-living kakapo (*Strigops habroptilus*) using fecal steroid measurements. **The Auk**, v. 112, n. 1, p. 253-257, 1995.
- 13 CZEKALA, N. M.; LASLEY, B. L. A technical note on sex determination in monomorphic birds using faecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**, v. 17, p. 209-211, 1977.
- 14 HIEBERT, S. M.; RAMENOFSKY, M.; SALVANTE, K.; WINGFIELD, J. C.; LEE GASS, C. Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 235-247, 2000.
- 15 LEE, J.; TELL, L.; LASLEY, B. A Comparison of Sex Steroid Hormone Excretion and Metabolism by Psittacine Species. **Zoo Biology**, v. 18, p. 247-260, 1999.
- 16 LEE, J. V.; WHALING, C. S.; LASLEY, B. L.; MARLER, P. Validation of an enzyme immunoassay for measurement of excreted estrogen and testosterone metabolites in the white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys oriantha*). **Zoo Biology**, v. 14, p. 97-106, 1995.
- 17 PATZL, M.; HOCHLEITHNER, M. Sexing in monomorphic birds through faecal steroid measurement. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FECAL STEROID MONITORING IN ZOO ANIMALS, 1., 1992, Holland. **Proceedings...** Holland: Royal Rotterdam Zoological and Botanical Gardens, 1992. p. 71.
- 18 STAVY, M.; GILBERT, D.; MARTIN, R. D. Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. **International Zoo Yearbook**, v. 19, p. 209-214, 1979.
- 19 JOHNSON, A. L. Reproduction in the Female. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1986a. p. 403-431.
- 20 JOHNSON, A. L. Reproduction in the Male. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1986b. p. 433-451.
- 21 MEEHAN, C. L.; GARNER, J. P.; MENCH, J. A. Isosexual pair housing improves the welfare of young Amazon parrots. **Applied Animal Behavior Science**, p. 1-16, 2003. Pré-print.
- 22 BRUGGEMAN, V.; D'HONDT, E.; BERGHMAN, L.; ONAGBESAN, O.; VANMONTFORT, D.; VANDESANDE, F.; DECUYPERE, E. The effect of food intake from 2 to 24 weeks of age on LHRH-I content in the median eminence and gonadotrophin levels in pituitary and plasma in female broiler breeder chickens. **General and Comparative Endocrinology**, v. 112, p. 200-209, 1998.
- 23 FRIGERIO, D.; MOESTL, E.; KOTRSCHAL, K. Excreted metabolites of gonadal steroid hormones and corticosterone in greylag geese (*Anser anser*) from hatching to fledging. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 246-255, 2001.
- 24 GUYOMARC'H, C.; GUYOMARC'H, J. C. Sexual development and free-running period in quail kept in constant darkness. **General and Comparative Endocrinology**, v. 86, p. 103-110, 1992.
- 25 JACQUET, J. M.; SAUVEUR, B. Photoperiodic control of sexual maturation in muscovy drakes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 189-195, 1995.
- 26 LEWIS, P. D.; PERRY, G. C.; MORRIS, T. R.; DOUTHWAITE, J. A. Effect of timing and size of photoperiod change on plasma FSH concentration and the correlation between FSH and age at first egg in pullets. **British Poultry Science**, v. 40, p. 380-384, 1999.
- 27 DRECHSLER, M. A model-based decision aid for species protection under uncertainty. **Biological Conservation**, v. 94, p. 23-30, 2000.
- 28 TELL, L. A.; LASLEY, B. L. An Automated Assay for Fecal Estrogen Conjugates in the Determination of sex in Avian Species. **Zoo Biology**, v. 10, p. 361-367, 1991.
- 29 SEIBERT, L. M.; CROWELL-DAVIS, S. L. Gender effects on aggression, dominance rank, and affiliative behaviors in a flock of captive adult cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 71, p. 155-170, 2001.
- 30 MARTIN, S. G.; MILLAM, J. R. Nest box selection by floor laying and reproductively naive captive cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 43, p. 95-109, 1995.
- 31 MEEHAN, C. L.; MENCH, J. A. Environmental enrichment affects the fear and exploratory response to novelty of young Amazon parrots. **Applied Animal Behavior Science**, v. 79, p. 75-88, 2002.
- 32 STONE, E. G.; MILLAM, J. R.; EL HALAWANI, M. E.; PHILLIPS, R. E.; REDIG, P. T. Determinants of reproductive success in force-re-paired cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 63, p. 209-218, 1999.