ALEXANDRE BASTOS FERNANDES LIMA

AVALIAÇÃO ENDOCRINOLÓGICA DA REPRODUÇÃO DE MURIQUIS DO SUL EM CATIVEIRO (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) POR MEIO DE DOSAGEM DE METABÓLITOS DE ESTERÓIDES FECAIS

São Paulo
2006

ALEXANDRE BASTOS FERNANDES LIMA

Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:
Prof.Dr.Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo
2006

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BASTOS, Alexandre Fernandes Lima

Título: Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais

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

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

ABSTRACT

BASTOS, A. F. L. **Endocrinological evaluation of southern muriquis' (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) reproduction in captivity by measurement of fecal steroids metabolites. [**Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais]. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

The reproductive endocrinology of the southern muriqui (*Brachyteles. arachnoides*) was evaluated through the dosage of fecal metabolites steroids for 04 adult females and fecal metabolites of testosterone and glucocorticoids for 04 adult males and 01 subadult male. The study was conducted over an eleven month period at two environmental conditions: a) an island of 600 $m^{2,}$ with natural vegetation, at Curitiba Zoo (PPC) and b) a large cage of 15,40X5,85X4,70m at Rio de Janeiro Primatological Centre (CPRJ). It was observed that females had large strogen interindividual variation and fecal progestins: three females did not show ovarian activity over a partial period of the study, while ovarian activity was observed for all sample periods for one female. Despite the detection of low levels of steroids, proceptive behaviour and copulations were observed. The PPC males showed significant levels of glicorticoids and testosteorne when compared to the CPRJ males ($p<0.05$). The subadult male exhibited the lowest level of testosterone metabolites and those differences were significant when compared to the adult males ($p<0.05$). For all males, copulations occurred when testosterone levels were highest and peaks of glucorticoids were linked to stressfull situations. This study have shown that the method used was effective for reproductive monitoring as well as for evaluating stressfull situations.

.

Key words: Endocrinology. Steroids. Metabolites. Primates. Stress.

RESUMO

BASTOS, A. F. L. **Avaliação endocrinológica da reprodução de muriquis do sul em cativeiro (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) por meio de dosagem de metabólitos de esteróides fecais**. [Endocrinological evaluation of southern muriquis (*Brachyteles arachnoides* – E. GEOFFROY, 1806) reproduction in captivity by measurement of fecal steroids metabolites]. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A endocrinologia reprodutiva do muriqui do sul *B. arachnoides* foi avaliada em quatro fêmeas adultas pela dosagem de metabólitos fecais de estrógenos e em quatro machos adultos e um macho subadulto pela dosagem de metabólitos de testosterona e glicocorticóides durante um período de onze meses em duas diferentes condições restritivas, ilha de 600m^{2,} Curitiba (PPC) e viveiro (15,40x5,85x4,70m) Rio de Janeiro (CPRJ). As fêmeas apresentaram grande variação individual nas concentrações de estrógenos e progestinas fecais ao longo do período de estudo, três não apresentaram atividade ovariana no período de outubro-dezembro e apenas uma apresentou atividade durante todos os períodos amostrados. Mesmo com níveis baixos de esteróides as fêmeas apresentaram comportamento perceptivo e cópulas. Os machos do PPC apresentaram níveis significativamente mais altos de glicocorticóides e níveis significativamente mais baixos de testosterona do que os machos do CPRJ ($p<0,05$) apresentaram. O macho subadulto apresentou níveis significativamente mais baixos para metabólitos de testosterona. Nos machos as cópulas ocorreram próximo às elevações das concentrações de testosterona. Em três situações grandes elevações dos níveis de glicocorticóides fecais puderam ser relacionadas a situações estressantes. Nosso estudo comprovou a eficácia do método empregado para monitoramento reprodutivo bem como para avaliar situações estressantes.

Palavras-chave: Endocrinologia. Esteróides. Metabólitos. Primatas. Estresse.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 19

2.1 OBJETIVO GERAL 19

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19

3 REVISÃO DA LITERATURA 20

3.1 O MURIQUI 20

3.2 A REPRODUÇÃO EM PRIMATAS 21

3.2.1 Aspectos reprodutivos das fêmeas 21

3.2.2 Aspectos Reprodutivos dos Machos 25

3.3 SAZONALIDADE 28

3.4 NUTRIÇÃO 29

3.5 ESTRESSE 31

3.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DO ESTRESSE 34

3.7 ESTEREOTIPIAS 35

3.8 AVALIAÇÃO POR MÉTODOS NÃO INVASIVOS 36

4 MATERIAL E MÉTODO 39

4.1 ANIMAIS 39

4.2 CENTRO DE PRIMATOLOGIA DO RIO DE JANEIRO (CPRJ) 39

4.3 PASSEIO PÚBLICO DE CURITIBA (PPC) 42

4.4 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS 44

4.5 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO HORMONAL 44

4.6 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DE ESTERÓIDES FECAIS 44

4.7 DOSAGEM HORMONAL 46

4.8 VALIDAÇÃO 47
4.9 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA 48
4.10 RECUPERAÇÃO 48
4.11 COLETAS DE DADOS COMPORTAMENTAIS 50
4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS 50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1 RECUPERAÇÃO 52
5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ENSAIOS 52
5.3 VALIDAÇÃO DO ENSAIO 54
5.4 FÊMEAS 55
5.4.1 Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) 58
5.4.1.1 Fêmea Adulta -- FRJ1 58
5.4.1.2 Fêmea adulta – FRJ2 61
5.4.1.3 Fêmea adulta -- FC1 64
5.4.1.4 Fêmea adulta -- FC2 67
5.5 MACHOS 70
5.5.1 Passeio Público de Curitiba (PPC) 77
5.5.1.1 Macho adulto - MC1 77
5.5.1.2 Macho adulto - MC2 80
5.5.1.3 Macho subadulto - MC3 82
5.5.2 CPRJ 83
5.5.2.1 Macho Adulto - MRJ1 83
5.5.2.2 Macho adulto Jovem - MRJ2 86
6 CONCLUSÕES 90
REFERÊNCIAS 98

A Minha Mãe

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Cláudio Alvarenga de Oliveira por ter me aceitado como seu orientado e pela cega confiança que depositou em mim desde início.

À Cláudia do Nascimento, por me apresentar aos professores Cláudio e Marcelo e dando assim o pontapé inicial o para essa nova etapa.

Ao Maurício Talebi Gomes, pela amizade por apresentar aos Muriquis, e por insistir bravamente para que eu voltasse à academia.

A Priscila Viau Furtado do LDH pelo o apoio e aprendizado que foram fundamentais na etapa final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães pelo incentivo e orientação.

Ao Prof. Dr. Alcides Pissinatti do CPRJ, à Maria Lucia Faria Gomes do Passeio Público de Curitiba e por terem permitido que o executasse este trabalho, à Gabriela e Sônia pelo apoio no CPRJ.

À Luciene Popp pela amizade e por ter me dado total acesso aos animais do Passeio Público de Curitiba e a Oneida e ao Tonico enfim todos do Passeio que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

Aos amigos Fábio Iurk e família por terem me hospedado e suportado na minha estadia em Curitiba.

Ao Daniel Mellek por ajudar que minha estadia em Curitiba fosse bem mais divertida.

À Profa.Dra. Patrícia Izar pela dicas na coleta de dados comportamentais.

À Tatiana pela amizade e por ter me ajudado na elaboração do projeto inicial.

Ás estagiárias Priscila, Tuanne, etc . que me ajudaram no trabalho de Curitiba.

Alice Parreira minha melhor amiga e que foi fundamental em todas as etapas desse processo.

Á Marie-Odile pela força e por me ajudar me ajudar nas recuperações.

A Laura pelo estimulo certo dado justamente no momento em que eu mais precisava.

Aos amigas e amigos do LDH. pela força e companheirismo na hora das alegrias e também na hora do desespero.

A Todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do VRA, em especial à Harumi, por desvencilhar o novelo da burocracia.

À FAPESP pelo auxílio pesquisa;

Ao Cnpq pela bolsa concedida.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior diversidade biológica de primatas do planeta. Atualmente, são reconhecidos 16 gêneros e 110 espécies. (RYLANDS; MITTERMEIER; RODRIGUEZ LUNA, 1997), das quais 04 (espécies) são classificadas entre os primatas mais ameaçados do mundo[1]. É premente a utilização de técnicas de investigação científica focadas em parâmetros fisiológicos, comportamentais e ecológicos que possam gerar resultados aplicados diretamente às estratégias de conservação destas espécies.

A endocrinologia da conservação pode simplesmente ser como "os estudos endócrinos que podem contribuir para a conservação das espécies" (BERGER et al., 1999; COCKREM; SEDDON, 1994). É uma abordagem multidisciplinar cujo objetivo precípuo é a redução das perdas globais de biodiversidade, através do conhecimento das características reprodutivas, taxas de reprodução e perfis endocrinológicos de espécies ameaçadas (COCKREM, 2005). Estes estudos devem portanto ser priorizados visando que a ciência possa contribuir para a crítica situação de desaparecimento da diversidade biológica global (DA FONSECA et al., 2002).

Vivemos em um momento onde a perda de biodiversidade é critica, e estima-se que mil espécies sejam extintas por ano no planeta (WILSON, 2002). Talvez sejamos responsáveis pela maior redução desta biodiversidade de toda a historia da vida na terra, e o impacto humano chega a ser maior até mesmo do que aquele causado pelas grandes hecatombes (BAILLIE et al., 2004). As principais ameaças à biodiversidade são a destruição e fragmentação de habitats, a sobre-exploração dos recursos naturais (incluindo a extração de espécies vegetais nativas e caça ilegais),

[1] Sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*); Macaco-prego de peito amarelo (*Cebus xanthosternus*); Mico-leão-de-cara-preta (*Leontopithecus caissara*) e Muriqui-do-norte (*Brachytles hypoxanthus*).

a invasão por espécies exóticas, a poluição, a contaminação de mananciais hídricos e até mesmo as mudanças climáticas (BAILLIE et al., 2004).

Globalmente, observa-se que ao redor de um quarto das espécies de mamíferos, um oitavo das espécies de aves e um terço das espécies de répteis são considerados como ameaçadas de extinção, totalizando 4170 espécies sob risco de extinção, classificadas como criticamente ameaçadas, ameaçadas e vulneráveis (DA FONSECA et al., 2002). Estimativas gerais sobre o número de espécies que se encontram atualmente em risco de desaparecerem antes de serem conhecidas ou estudadas pela ciência, apontam para um total de 70.000 a 240.000 espécies, incluindo os microorganismos (CHAPMAN et al., 2000).

Entre os diferentes ambientes afetados, as florestas tropicais estão sob maior risco, com uma perda anual estimada ao nível global de 76.000-92.000 Km^2 e de aproximadamente de 25.540 km^2 somente no Brasil (BROOKS et al., 2002). Entre as principais causas responsáveis pela redução das espécies de primatas, ressaltam-se a deflorestação, fragmentação de habitats, a caça e o tráfico de animais (ERWIN, 1982). No Brasil a situação mais critica ocorre no Bioma Mata Atlântica, reduzido hoje a uma fração de apenas 7% de sua cobertura original, com elevados níveis de fragmentação em toda a sua área de ocorrência (BROOKS et al., 2001; BROOKS et al., 2002; MYERS et al., 2000).

Atualmente considera-se que existam duas espécies de muriquis: O muriqui do norte (*Brachyteles hypoxanthus*), atualmente classificado como criticamente ameaçado de extinção e recentemente listado entre os 25 primatas mais ameaçados do mundo (MITTERMEIER et al., 2006). É todavia encontrado em pequenas áreas privadas ou em populações isoladas que não ultrapassam 1000 indivíduos (STRIER et al., 2006) e o muriqui do-sul (*Brachyteles arachnoides*), atualmente classificado

como ameaçado de extinção. Apesar de frequentemente citado como ocorrendo em grandes populações e sob potencial maior proteção em natureza, estudos em andamento demonstram preliminarmente que suas populações selvagens podem estar seriamente reduzidas. Estima-se que a maior população selvagem de muriqui-do-sul ocorra na região sul do Estado de São Paulo, no Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB), abrigando entre 500-800 animais (MITTERMEIER et al., 1987; PACAGNELLA, 1985; STRIER, 1999)

É extremamente reduzido o contingente populacional de Brachyteles sp. em cativeiro (*ex-situ*) e estas são insuficientes para respaldar quaisquer estratégias de conservação em ambiente natural (*in-situ*), como a translocação ou a reintrodução de indivíduos, similarmente aos procedimentos adotados desde a década de 80 para o Gênero *Lentopithecus*[2].

Nos últimos anos, vários esforços têm sido feitos visando à conservação dos muriquis, tanto na escala governamental quanto no âmbito da sociedade civil. A criação do Comitê Internacional para a Conservação do Muriqui visando reunir os pesquisadores e mantenedores de *Brachyteles sp*. para elaborar estratégias de conservação *in-situ* e *ex-situ* representa um notório avanço e demonstra uma preocupação das esferas públicas (federais, estaduais e municipais) e privada (organizações não governamentais conservacionistas). Por exemplo, para o muriqui-do-sul, encontra-se atuante no Estado de São Paulo a Associação Pró-Muriqui, com foco na investigação científica da espécie aplicada a sua conservação e do Bioma Mata Atlântica (TALEBI, 2004).

---

[2] TALEBI, M. Conservation research of southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) in São Paulo State, Brazil. . **Neotropical Primates**, no prelo.

A escolha de espécies para programas de reprodução em cativeiro depende de uma serie de critérios, e geralmente grupos representantes de megafauna carismática, principalmente as espécies-bandeira, são as eleitas devido ao benefícios que podem gerar para conservação dos ambientes e ecossistemas que habitam. Possuem um maior apelo popular e geram um maior impacto na consciência pública sobre os riscos da perda de biodiversidade; contribuem para o estabelecimento de programas da conservação de todas as espécies presentes nessas localidades (KLEIMAN, 1992).

Adicionalmente, os estudos focados nos aspectos reprodutivos de espécies ameaçadas deveriam constituir a base para a criação de um protocolo adequado de manejo *ex-situ*, objetivando portanto otimizar as taxas reprodutivas e contribuir para a formação de um plantel de indivíduos que permitam a manutenção da variabilidade genética da espécie em programas de conservação *ex-situ* e *in-situ*, por exemplo, o manejo de metapopulações (KLEIMAN, 1985).

Estes estudos sob condições controladas possibilitam ainda a avaliação dos parâmetros fisiológicos reprodutivos, bastante dificultados e pouco factíveis de execução logística em ambiente natural, auxiliando ainda no conhecimento de como os organismos se adaptam a diferentes condições ambientais (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004).

A mensuração de concentrações hormonais por métodos não invasivos, especialmente a mensuração de esteróides e seus metabólitos em urina ou fezes, são os métodos mais utilizados (BERGER et al., 1999). A mensuração de esteróides fecais possibilita a avaliação da atividade dos eixos hipotalâmico-pituitário–gonadal (HPG) e hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) sem a necessidade de manejar os animais para coleta de amostras de sangue (ZIEGLER; MATTERI; WEGNER, 1993;

ZIEGLER et al., 1997; ZIEGLER et al., 1996). Torna-se importante notar que procedimentos para a coleta de sangue, devido ao seu caráter invasivo, afetam diretamente os resultados obtidos, bem como são praticamente inviáveis de serem realizados em ambiente natural (ZIEGLER; WITTWER, 2005).

Desde a década de 80 estudos demográficos, e comportamentais de longo prazo têm sido conduzidos com o muriqui do norte, e estão em andamento com o muriqui-do-sul (TALEBI, 2005). Entretanto, sob o ponto de vista endocrinológico, são inexistentes informações abordando muriquis do sul.

O presente trabalho visa avaliar o status reprodutivo dos animais mantidos sob duas diferentes condições restritivas e esclarecer aspectos da fisiologia reprodutiva do muriqui do sul.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são descritos a seguir:

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente o estado reprodutivo de indivíduos de muriqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*) sob condições restritivas em dois ambientes diferenciados, ambiente com vegetação natural e sem grades, recinto grande com grades.

Avaliar o diagnóstico do potencial reprodutivo, através da quantificação dos níveis de esteróides e seus metabólitos reprodutivos verificando se há presença de ciclo ovariano, ovulação ou gestação nas fêmeas.

Avaliar o estresse através da avaliação comportamental e sua relação com os níveis de cortisol fecais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se o ciclo ovariano das fêmeas interfere no nível de testosterona e cortisol dos machos de muriquis.

Verificar se ocorre alteração nos níveis de testosterona e glicorticóides fecais em machos de muriquis.

Verificar se as falhas reprodutivas podem ser atribuídas ao estresse crônico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura é apresentada a seguir.

3.1 O MURIQUI

Apresentando peso corporal de aproximadamente 15 Kg para machos e 12 Kg para fêmeas (NISHIMURA ET AL., 1988) o muriqui é a maior espécie de primata neotropical e o maior mamífero endêmico do Brasil. O gênero *Brachyteles* pertence á Família *Atelidae*, Sub-Família *Atelinae*, e apresenta duas espécies: *Brachyteles arachnoides*, (muriqui-do-sul) que ocorre nos estados de São Paulo, Paraná e Sul do Estado do Rio de Janeiro *e Brachyteles hypoxanthus* (muriqui-do-norte) que habita os estados do Espírito Santo e Minas Gerais (COIMBRA-FILHO, 1972; DESA ET AL., 1993; LEIGH; JUNGERS, 1994; POPE, 1998).

Os muriquis vivem em grandes grupos multi-macho, multi-fêmea com até mais de 50 indivíduos contendo adultos, subadultos e jovens de varias idades (AGUIRRE, 1971; STRIER, 1996). Contudo na maior parte do tempo o grupo não apresenta uma unidade coesa, ocorrendo o sistema de fissão-fusão, onde os machos formam uma subunidade coesa dentro do grupo e as fêmeas são mais dispersas (MENDES, 1990). Apresentam pouco dimorfismo sexual e o sistema reprodutivo é promiscuo, sendo que uma fêmea pode copular com vários machos sucessivamente no mesmo dia. Muriquis apresentam longos períodos de desenvolvimento, com dados de indivíduos selvagens indicando início da puberdade aproximadamente aos nove anos (STRIER, 1986; STRIER, 1999) apesar desse período ser drasticamente reduzido em cativeiro (PISSINATTI et al., 1994).

Os muriquis do sul na natureza se alimentam de uma grande quantidade de itens alimentares como frutos, folhas, floresm caules, raízes e nectar (STRIER, 1991; TALEBI, 2003). Durante quase duas décadas, o muriqui foi considerado como o primata mais folívoro das Américas, com exceção de Alouatta sp. (ROSENBERGER; STRIER, 1989). Estes resultados decorreram do trabalho de Strier no ambiente de floresta fragmentada da Estação Biológica de Caratinga. Recentemente foi demonstrado que a disponibilidade do alimento no ambiente aparenta ser o principal fator determinante das preferências alimentares observadas. O muriqui-do-sul, quando estudado em ambiente de floresta contínua do Parque Estadual Carlos Botelho demonstrou incorporar preferencialmente frutos em sua dieta, quando estas estão disponíveis para consumo (TALEBI; BASTOS; LEE, 2005).

3.2 A REPRODUÇÃO EM PRIMATAS

Serão abordados a seguir aspectos da fisiologia reprodutiva de fêmeas e machos.

3.2.1 Aspectos reprodutivos das fêmeas

Todos os primatas exibem um ciclo ovariano compreendendo fases de crescimento folicular, ovulação e de atividade do corpo lúteo. A expressão destes eventos cíclicos, porém, varia consideravelmente entre as espécies. Existem diferenças na duração do ciclo ovariano e suas fases, sob influência ou não da sazonalidade e na ocorrência de menstruação (HODGES, 1987).

Apesar da variação na duração dos ciclos, basicamente, a regulação hormonal do ciclo ovariano é similar para todas as espécies. A secreção pulsatil de hormônio gonadotrófico (GnRH) produzido pelo hipotálamo estimula a secreção

hipofisária de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) que por sua vez regulam diretamente a função ovariana. Esse mecanismo é a retro-controlado pelos esteróides. A secreção pulsatil de LH e em menor escala FSH variam de alta freqüência e baixa amplitude durante a fase folicular a baixa freqüência e alta amplitude durante a fase luteal e são reconhecidos como sendo o maior componente do controle gonadotrófico do ciclo ovariano em primatas. O início do ciclo ovariano é marcado por uma pequena, mas significante elevação dos níveis circulantes de FSH que ocorre durante a regressão do corpo lúteo, esse aumento funciona como gatilho para o desenvolvimento folicular.

Durante a fase folicular alguns folículos destinados a ovular emergem de uma gama de pequenos folículos antrais que crescem formando estruturas pré-ovulatóse rias. Dentre estes folículos apenas um torna dominante e os outros conseqüentemente atrésicos. Ocorre então um pico de LH e a dá-se a ovulação (HODGES, 1987).

A reprodução do muriqui do norte é sazonal, há uma maior concentração de nascimentos no período do inverno, porém é possível observar nascimentos e cópulas durante todo ano a duração do ciclo estral foi determinada em 21,0 ± 5,4 dias (n=20) e da gestação 216,4 ± 1,5 dias (STRIER; ZIEGLER, 1997).

Fêmeas de muriqui geralmente iniciam e terminam os encontros sexuais e nunca são ameaçadas ou forçadas pelos machos. Em todos os primatas do novo mundo estudados até o momento não há uma elevação pré-ovulatoria de metabólitos de estrógenos na urina e fezes, mas sim um aumento sustentado de estrona e de estradiol (E2) na fase luteal do ciclo, exibindo um perfil similar ao da excreção de progesterona (P4) (ZIEGLER et al., 1996).

Há uma forte evidencia de que os perfis excretórios de metabólitos fecais de estrógenos sâo atrasados em uma grande variedade de espécies de primatas, por exemplo, em *Macaca* sp: (SHIDELER et al., 2001); *Papio* sp (WASSER; STARLING, 1988); *Callithrix jacchus* e *Saguinus oedipus* (HEISTERMANN et al., 1989; HEISTERMANN; TARI; HODGES, 1993) e *Ateles geoffroyi* (CAMPBELL et al., 2001). Entretanto este atraso na excreção de E2 foi mais elevado no muriqui (STRIER; ZIEGLER, 1997). Em fêmeas de muriqui tanto cativas quanto selvagens o aumento sustentado de P4 ocorre consistentemente 4 a 6 dias antes do início da elevação de E2, além disso, o pico de LH nas fêmeas cativas ocorre no mesmo dia do aumento sustentado de P4 fecal .(ZIEGLER et al., 1997).

A excreção fecal de P4 no mesmo tempo do pico de LH pode indicar que a P4 é excretada sem extensiva conjugação e reabsorção pelo intestino (ZIEGLER et al., 1997). E de fato a P4 é excretada livre a uma taxa de 85,7%, menor, porém do que E2 que é excreta a uma taxa de 98% em fêmeas de muriquis (ZIEGLER; WITTWER, 2005).

O atraso na excreção de estradiol em muriquis pode similarmente ser afetado por sua dieta bem como por outros fatores não ligados diretamente a dieta como circulação entero-hepática, reabsorção de metabólitos e fermentação bacteriana, visto que o muriqui apresenta um grande ceco e também uma grande variação no tempo de passagem intestinal, variando entre 01.5 – 36.3 horas, com variações de acordo com a idade (TALEBI, 2003) e composição da dieta (TALEBI, 2006). Diferenças na excreção de esteróides ovarianos podem refletir além de diferenças de idade, aspectos relacionados com a dominância ou com a fertilidade dos animais (BELLEM; MONFORT; GOODROWE, 1995).

Devido a este atraso na excreção de estradiol, o início do aumento de progestinas foi considerado a melhor estimativa do dia da ovulação nos muriquis (STRIER; ZIEGLER, 1997; ZIEGLER et al., 1997) De fato a síntese ovariana de progesterona pode aumentar antes da ovulação de fato horas após o aumento das gonadotrofinas (ESPEY; LIPNER, 1994). Devido a essas condições o dia da amostra que precede o aumento de progesterona é considerado a melhor estimativa para o dia da ovulação no muriqui (STRIER; ZIEGLER, 1997; ZIEGLER et al., 1997), o período peri-ovulatorio foi definido conservadoramente como 3 dias antes e 3 dias depois da ovulação estimada (STRIER; ZIEGLER, 1997). Neste mesmo trabalho Strier encontrou grandes variações nos níveis de metabólitos fecais tanto intra como inter individuais. Variações estas também encontradas em um grande número de estudos com primatas do novo e velho mundo, ilustrando a importância de se avaliar os animais individualmente (BELLEM; MONFORT; GOODROWE, 1995; CAMPBELL et al., 2001; WASSER et al., 1994; WASSER; MONFORT; WILDT, 1991).

Nas fêmeas de muriquis um limiar mínimo de E2 é necessário para o retorno ao ciclo no pós parto e concepção, uma variação nos níveis pré-ciclicos de E2 é consistente (STRIER; ZIEGLER, 1997). *Ateles geoffroyi* apresentou um ciclo tipicamente menstrual, com os níveis séricos de progesterona aumentando 24 a 96 horas antes do pico de estradiol, sendo que picos secundários de E2 apareceram em intervalos variados com níveis variando em diferentes ciclos no mesmo animal e entre os animais, as fêmeas mais novas apresentaram maiores níveis hormonais. (HERNANDEZ-LOPEZ et al., 1998) isto deve ocorrer também nos muriquis dada a grande proximidade filogenética entre estas espécies.

Recentes estudos em vida livre com os muriquis do sul indicam marcantes diferenças tanto na estrutura social quanto intervalo entre partos em relação aos

muriquis do norte. (COLES; TALEBI, 2004), contudo são ausentes dados precisos com relação à fisiologia reprodutiva do muriqui do sul.

3.2.2 Aspectos Reprodutivos dos Machos

A regulação hormonal a reprodução dos machos inicia-se no hipotálamo que produz neuro-hormônios tais como Gnrh, que por sua vez atuam em receptores na adenohipófise estimulando a produção de peptideos hormonais principalmente LH e FSH. O LH atua principalmente nas células de Leydig e estimulando a produção de esteróides e o FSH atua principalmente na estimulação de inibina e ABP nas células de Sertoli. Contudo muitos outros hormônios e fatores de crescimento possuem grande importância da regulação da função testicular (DESJARDINS, 1981).

A testosterona é o principal estrógeno testicular e sua função vai muito além da função reprodutiva. A atividade endócrina testicular é iniciada no feto logo após a diferenciação sexual gonadal, promovendo sua masculinização e desenvolvimento do sistema reprodutor, a diferenciação sexual fenotípica e a masculinização do hipotálamo (GOY; MCEWEN, 1980) . Diferenças sexuais no comportamento sexual e agressividade são atribuídas, em parte, a presença de esteróides durante certos períodos críticos ainda no útero o antes da puberdade; (BRONSON; DESJARDINS, 1971; QUADAGNO; BRISCOE; QUADAGNO, 1977). A testosterona interfere no comportamento fazendo com que esses animais expressem o comportamento masculino típico, tais como comportamento copulatório e agressividade. (ALBERTSSON-WIKLAND et al., ; BARDIN; CATTERALL, 1981; BERMOND et al., 1982) Porém altos níveis de testosterona impõem altos custos energéticos e fisiológicos. Devido ao aumento energeticamente dispendioso do tecido muscular (BARDIN, 1996; ELIA; LIVESEY, 1992) consequentemente a testosterona possui um

importante papel nas decisões de alocação energética, mediando à barganha entre o investimento na reprodução e sobrevivência (BRIBIESCAS, 1996; , 2001; ELIA, 1992). Em adição a esses custos metabólicos, altos níveis de testosterona aumentam suscetibilidade a doenças (OLSEN; KOVACS, 1996); (ZUK; MCKEAN, 1996); (MUEHLENBEIN; WATTS; WHITTEN, 2004; ZUK; MCKEAN, 1996). Baseado em trabalhos com aves, Wingfield et al. (1990) propôe que em vista desses custos, a estratégia de manter altos níveis de testosterona não seria uma boa estratégia evolutiva em espécies cuja reprodução é sazonal.

Machos de um grande número de espécies de primatas exibem mudanças sazonais nos níveis de testosterona, com picos ocorrendo na estação reprodutiva, muitas vezes este aumento é acompanhado por um aumento na agressividade e nos níveis de cortisol (STRIER; ZIEGLER; WITTER, 1999). Em vida livre Strier (STRIER; ZIEGLER; WITTWER) observou que não há uma variação sazonal nos níveis de testosterona, o que é consistente com os baixos índices de agressão observados para a espécie mas não obstante enfraquece a hipótese da existência de sazonalidade reprodutiva.

A relação entre testosterona e comportamento foi estudada e uma grande quantidade de espécies de primatas. Estudos com lêmures Lemur catta, (CAVIGELLI; PEREIRA, 2000),red-fronted lemurs, Eulemur fulvis rufous, (OSTNER; KAPPELER; HEISTERMANN, 2002), sifakas ,Propithecus verrauxi, (BROCKMAN; WHITTEN, 1996), squirrel monkeys ,Saimiri sciureus, (COE; LEVINE, 1995) , rhesus macaques (BERNSTEIN; ROSE; GORDON, 1977), mandrills (Papio sphinx, (SETCHELL; DIXSON, 2001), e chimpanze Pan troglodytes, (MULLER; WRANGHAM, 2004b), entre outros indicou que testosterona está relacionada ao comportamento agressivo, especialmente no contexto reprodutivo.

Diferenças na testosterona relacionada ao ranking de dominância pode ser mediado pela agressão, animais com alto nível hierárquico freqüentemente exibem altas freqüências de comportamento agressivo (e x., sifaka, (BROCKMAN et al., 2001); chimpanzés, (MULLER; WRANGHAM, 2004a).

A testosterona foi positivamente associada com a dominância em: saimiris (COE et al., 1983) lemur cinza (PERRET, 1992), gorila das montanhas *Gorilla gorilla beringei*, (ROBBINS; CZEKALA, 1997), 1997), sifakas (BROCKMAN et al., 2001), mandrils, *Mandrillus sphinx*, (SETCHELL; DIXSON, 2001), bonobos (*Pan paniscus*, (MARSHALL; HOHMANN, 1990), e chimpanzé (MUEHLENBEIN; WATTS; WHITTEN, 2004); (MULLER; WRANGHAM, 2004a), embora esse efeito não seja universal (Japanese macaques, *Macaca fuscata*, (MARSHALL; HOHMANN, 1990), 1974; macaco de cheiro (STEKLIS et al., 1986); macacos da cauda enrrolada, Nieuwenhuijsen et al., 1987; muriquis, *Brachyteles arachnoids*, (STRIER; DIB; FIGUEIRA, 2002), 1999; e bonobos, (SANNEN; VAN ELSACKER; EENS et al., 2004).

A ausência de diferenças individuais nos níveis de testosterona usualmente caracteriza populações em circunstâncias onde a agressão é baixa e a dominação hierárquica ou são ausentes ou não despóticas (STOOPS et al., 1999).

O macho do muriqui apresenta um grande volume testicular o que pode indicar competição espermática, já que nessa espécie uma das mais marcantes características é justamente baixa freqüência de comportamento agonístico e de competição por fêmeas receptivas (MENDES, 1990).

3.3 SAZONALIDADE

O termo sazonalidade é usado para denotar qualquer tendência para de agrupamento temporal de atividades reprodutivas, desde discretas estações até picos sazonais (LINDBURG, 1987). Seguindo este conceito, a estação de nascimentos ou a sazonalidade de nascimentos, pode ser definida como um discreto período do ano onde todos os nascimentos estão confinados e deve haver alguns períodos do ano onde não ocorra nascimentos (LANCASTER; LEE, 1965). O pico de nascimentos é o período do ano para o qual há uma alta proporção de nascimentos (LANCASTER; LEE, 1965). A sazonalidade reprodutiva de uma espécie ocorre quando ocorre uma estação de nascimentos definida e espécies que não são sazonais não apresentam uma época onde os nascimentos se concentrem. Sicronicidade de nascimentos refere-se quando há uma sobreposição de eventos pelas fêmeas de um grupo, mas não entre grupos (sincronicidade intra-grupal) ou entre espécies de uma mesma comunidade de primatas (sincronicidade inter-especifica).

A duração do fotoperíodo diurno tem sido experimentalmente comprovada como um importante fator “gatilho” da reprodução em alguns primatas (AUJARD; PERRET; VANNIER, 1998) bem como a pluviosidade, que indiretamente promove efeitos na vegetação e abundância de alimentos. A disponibilidade de comida de alta qualidade é conhecida com sendo um fator desencadeador da ovulação em inúmeras espécies (BRONSON, 2004). O padrão mais comumente encontrado nos primatas e que a concepção coincida com o início da estação seca, e dessa forma com o decréscimo de disponibilidade de alimento (GOLDIZEN et al., 1988). Dentro de uma unidade social de primatas o sincronismo de nascimentos pode além de ser da causada pela sazonalidade propriamente dita, ser também promovida por

ferormônios, apesar de evidências sugestivas da ocorrência deste mecanismo em mico-de-cheiro selvagens (BOINSKI, 1987) e macacos-aranha em cativeiro (EISENBERG; MUCKENHIRN; RUDRAN, 1972).a maioria das populações de primatas vivem em um ambiente sazonal e conseqüentemente apresentam padrões irregulares de nascimentos através das estações.

Dentre os fatores ecológicos, a disponibilidade de energia tem sido relada como de maior importância. Três estratégias alternativas podem ser demonstradas em: redução do estresse energético materno pelo ajuste do pico de lactação com o pico da disponibilidade de alimento, para reduzir a mortalidade infantil pelo desmame durante o pico de disponibilidade de comida ou com o intuito de estocar recursos durante o pico de alimentação em forma de gordura para liberar durante o pico de lactação (LEE; BOWMANN, 1995; LEE; FOLEY, 1993).

Há, entretanto evidencias indiretas em babuínos (BERCOVITCH, 1991; BERCOVITCH; ZIEGLER, 1989) e muriquis (STRIER; ZIEGLER, 1997) de que a sazonalidade de nascimentos pode ser uma conseqüência secundária de influências relacionadas entre a nutrição com a ovulação e o tempo da concepção, levando por exemplo em Langures a picos de nascimentos durante estação seca, quando disponibilidade e qualidade de comida e é baixa (ZIEGLER et al., 2000).

A pressão de predação é outro importante fator e parece ser mais fortemente relacionado com a sincronicidade de nascimento do que com a sazonalidade (TREVES, 2001)

3.4 NUTRIÇÃO

A nutrição é considerada como o fator que mais influencia a ocorrência de eventos reprodutivos. (LEE; BOWMANN, 1995). É bem estabelecido que a reprodução é

bastante sensível ao status nutricional. A subnutrição causa impactos negativos em vários aspectos da reprodução, incluindo o comportamento sexual (GILL; RISSMANN, 1997) pois provoca um atraso no início da maturação sexual e em animais sexualmente maduros, interrompe o ciclo estral e prolongam o anestro puerperal (HILEMAN; PIERROZ; FLIER, 2000).

A influência negativa da subnutrição no eixo hipotalãmico hipofisário gonadal é primariamente realizada através da redução da liberação de LH na pituitária, presumidamente com reflexo do decréscimo do GnRH hipotalâmico (BRONSON, 2004). O estado nutricional da fêmea pode ter efeito substancial na função ovariana e na ovulação em primatas cativos (TARDIF et al., 2001) e uma relação semelhante provavelmente exista em primatas em vida livre (RICHARD, 1985).

Diferenças na dieta entre primatas selvagens e cativos podem ser responsáveis por diferenças na endocrinologia reprodutiva (OFTEDAL, 1995). Por exemplo, fêmeas de Muriquis em cativeiro com filhotes de seis meses de idade ovularam e copularam, enquanto em natureza as fêmeas de muriqui não reiniciam a atividade sexual, por pelo menos dois anos pós-parto (STRIER; ZIEGLER, 1997). A dieta dos Muriquis cativos varia consideravelmente da dieta dos animais selvagens, sendo que em cativeiro, por exemplo, Curitiba, os animais provavelmente tenham acesso a um maior nível de proteína da dieta. Desta forma, apesar do perfil de excreção dos esteróides sexuais de muriquis em condições restritivas serem similares aos muriquis selvagens, um alto teor de proteína dietética talvez venha a contribuir para o retorno precoce da atividade sexual no pós-parto dos muriqui nestas condições (STRIER; ZIEGLER, 1997; , 2000).

3.5 ESTRESSE

Existe pouco consenso na definição do estresse. Uma definição comumente usada é a ruptura ou o risco de ruptura da homeostase, causados por influências do ambiente externo através dos estímulos que promovem a resposta do estresse, denominados como agentes estressores. Este processo desencadeia uma série de respostas do organismo na tentativa de recuperar o equilíbrio interno, a fim de superar as condições adversas (CLARKE; MASON; MOBERG, 1988; RAY; SAPOLSKY, 1992; SAPOLSKY, 1983; SAPOLSKY, 1987; SAPOLSKY, 2001; , 2005; WASSER; SEWALL; SOULES, 1993).

Sob efeito dos agentes estressores, o organismo reage ativando um complexo repertório de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais que, quando inadequadas, excessivas e/ou prolongadas, podem afetar o comportamento e ter conseqüências adversas nas funções fisiológicas, tais como crescimento, metabolismo, circulação, resposta imunológica, resposta inflamatória e conseqüentemente diminuindo a aptidão do indivíduo para a reprodução. Uma grande quantidade de hormônios como, por exemplo, os glicocorticóides, as catecolaminas e a prolactina estão envolvidos no processo de estresse (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004; SANNEN; VAN ELSACKER; HEISTERMANN et al., 2004; YOUNG; BROWN; GOODROWE, 2001).

Causas de falha reprodutiva são freqüentemente atribuídas à incompatibilidade comportamentais, perda da variabilidade genética ou o estresse causado por condições inadequadas de manejo e recintos (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003). Em fêmeas o estresse tem sido implicado na redução das taxas reprodutivas em Babuínos (SAPOLSKY, 1983) e sagüis (JOHNSON et al., 1990) interferindo adversamente na função ovariana, no desenvolvimento embrionário, e

na sobrevivência infantil (BAHR et al., 2000). Em machos o stress pode suprimir a libido, a secreção de testosterona, e a espermatogênese, conseqüentemente reduzindo a fertilidade (GONCHAROV et al., 1979).

Em fêmeas de mamíferos, os efeitos supressivos do stress na fisiologia reprodutiva e comportamento tipicamente possui três componentes: interrupção da ovulação, distúrbio na maturação uterina necessária a implantação e a inibição do comportamento proceptivo e receptivo (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003). Ao nível endócrino a liberação de β-endorfina possui um efeito inibitório intenso sobre a liberação de GnRH, promovendo um declínio das concentrações de GnRH no sistema porta hipofiseal–pituitário em questão de segundos (DOBSON et al., 2003). Adicionalmente, há um decréscimo da sensibilidade da pituitária aos efeitos estimulatórios do GnRH, não só reduzindo grandemente a quantidade de LH secretado como principalmente alterando a sua freqüência pulsátil (DOBSON et al., 2003). Finalmente, os glicocorticóides agem nos ovários diminuindo sua responsividade ao LH. Isto tem sido reportado em varias espécies e é parcialmente devido ao decréscimo do número de receptores de LH e este decréscimo é induzido pela atividade dos glicocorticóides (NEGRO-VILAR, 1993; SUTER; SCHWARTZ, 1985). O resultado é um estagio folicular estendido e período do ciclo ovariano mais longo e irregular. O distúrbio na maturação uterina é ocasionado durante o stress devido a dois mecanismos: 1) declínio de progesterona, que normalmente é responsável pela preparação de parede uterina para implantação durante a fase luteal; 2) secreção stress-induzida de prolactina antagonizando os efeitos anabólicos da progesterona no útero. (NEGRO-VILAR, 1993).

Em varias espécies, o estresse diminui o comportamento proativo das fêmeas designado como o aumento da probabilidade de interações sexuais, bem como a

receptividade aos machos, já que os andrógenos adrenais aumentam o comportamento proceptivo e receptivo em fêmeas de primatas, e há alguma evidencia de supressão induzida por estresse da secreção de tais andrógenos. (KAREN L. BALES, 2004).

No macho o stress pode interromper a reprodução de três amplas maneiras: pela inibição dos do eixo gonadal; impedimento da função erectil; e “damping” esfriando o comportamento proceptivo e receptivo (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003) Ao nível endócrino os mecanismos que intermedeiam a inibição da reprodução são bastante similares aos das fêmeas. Como na fêmea a liberação estresse induzida de β-endorfina tem um efeito inibitório na liberação de Gnrh, cujas concentrações no sistema porta hipofiseal-pituitario caem dentro de segundos (DELITALA; DEVILLA; ARATA, 1981; MASALA et al., 1979). Em adição há o declínio da sensibilidade da pituitária ao GnRH, reduzindo grandemente a quantidade de LH secretada. Estudos sugerem que a secreção induzida pelo estresse de prolactina é a maior responsável por isso. Finalmente, nas fêmeas os glicocorticóides agem no nível das gônadas para diminuir a responsividade ao LH resultando no declínio nos níveis de testosterona desde minutos até horas como resposta a uma variedade de agentes estressores físicos e psicológicos.

Surpreendentemente, a diminuição nos níveis de testosterona é raramente suficiente para ter claramente efeitos adversos na fertilidade dos machos. O fator mais perturbador na reprodução em machos é a disfunção erétil induzida pelo estresse, mediado por uma complexa interconexão entre a ativação do sistema nervoso autônomo. Conseqüentemente, o estresse pode bloquear a capacidade para uma ereção no primeiro momento (incapacidade de estabelecer o tônus

parassimpático), ou causar ejaculação precoce (acelerando a transição para o tônus simpático) (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003).

Embora a capacidade do estresse interromper a reprodução em machos é bem documentada, os mecanismos envolvidos são poucos entendidos além de sua mediação na supressão dos níveis de testosterona. Finalmente, em contraste com as fêmeas, há pouca evidencia que os agentes estressores alterem a libido em machos (WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003).

Embora o estresse crônico seja claramente responsável por causar falhas reprodutivas não se sabe se o estresse agudo tem o mesmo efeito, de fato alguns autores sugerem efeitos positivos (DOBSON et al., 2003). A injeção de ACTH em cachaços e garanhões produziu um aumento nos níveis de testosterona concomitante ao aumento de cortisol (LIPTRAP; RAESIDE, 1983). Alem disso o comportamento de copula é associado ao aumento agudo nos níveis de cortisol bem como nos de testosterona em touros, cachaços e garanhões.

3.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DO ESTRESSE

O bem-estar animal é um tema complexo e certamente necessita ser abordado por uma vasta gama de parâmetros: fisiológicos, endocrinológicos e comportamentais. Vários fatores ambientais influenciam o comportamento dos primatas em cativeiro. Por serem mantidos em condições restritivas, muitas vezes, inadequadas (ambientes empobrecidos e/ ou de pequenas dimensões), os primatas são muitas vezes privados de estímulos apropriados para a expressão de seu repertório comportamental natural (REINHARDT, 1996) Estudos demonstraram que animais mantidos em ambiente sub-ótimos desenvolvem um amplo espectro de comportamentos anormais, como por exemplo a diminuição de atividades

comportamentais quando comparados àqueles mantidos em ambientes de grandes dimensões físicas.(O'NEILL, 1991)

O histórico de vida também influencia o repertório comportamental de primatas em cativeiro. Animais com grande incidência de comportamentos anormais em cativeiro geralmente tem uma história de privação social (MALLAPUR, 2005). Manter animais isolados ou em composições de grupo que são inapropriados para a espécie, resulta na redução do comportamento exploratório e social e também estimula o aparecimento de comportamentos anormais (ANDERSON; CHAMOVE, 1985).

3.7 ESTEREOTIPIAS

Estereotipias são definidas como o comportamento repetitivo invariante sem objetivo ou função definida (LAWRENCE; TERLOUW, 1993). Os surtos de estereotipia parecem ser parcialmente dependentes de estímulos externos e uma vez iniciados tornam-se independentes do estímulo que o originou e os animais parecem ter dificuldade em parar (FELDMAN; GREEN, 1967; SMITH, 1980). Estereotipias possuem vasta gama de formas de manifestação e duração dependendo da espécie e do indivíduo (MARRINER; DRICKAMER, 1994). Vários fatores ambientais podem deflagrar surtos de comportamento estereotipado como frustração, expectativa da alimentação ou situações claramente estressantes, por ex contenção, medo ou a simples ausência de estímulos (MASON, 1991).

Estudos do comportamento animal fornecem pistas de que o indivíduo em questão esteja sob estresse (MALLAPUR, 2005), contudo podem falhar em demonstrar se as condições sob as quais os animais estão submetidos realmente comprometem o bem estar animal. Muitas vezes a presença de estereotipias

funcionam como um reforço positivo funcionando como um conforto psicológico para o animal, excluindo-se, obviamente, as estereotipias cujos os danos são óbvios, como auto-flagelação (MASON, 1991).

Embora o estudo do comportamento constitua uma maneira não invasiva e bastante sensível de avaliar o stress, a melhor compreensão dos aspectos fisiológicos que compõem a resposta ao estresse podem ser aperfeiçoados pelo conhecimento subjacente da resposta hormonal. De fato, os fatores estressores nem sempre induzem a mudanças comportamentais e nestas situações o stress pode ser avaliado baseado a partir de dados fisiológicos (BROOM; JOHNSON, 1993).

3.8 AVALIAÇÃO POR MÉTODOS NÃO INVASIVOS

As coletas de sangue constituem o método mais tradicional para a execução de análises endócrinas. Embora a mensuração direta dos hormônios no sangue forneça uma representação mais acurada da dinâmica temporal dos eventos endócrinos (SHIMIZU, 2005) este método possui a desvantagem da necessidade de captura e contenção do animal para a venopunção. Por outro lado, as avaliações pela urina e fezes oferecem a vantagem de permitir o monitoramento hormonal de longo prazo principalmente quando as coletas de sangue são impraticáveis. Além disso, as concentrações de metabólitos hormonais excretados são duas a quatro vezes mais altas do que os esteróides presentes no sangue. (HEISTERMANN et al., 1996).

A extração e dosagem de hormônios esteróides fecais é um poderoso método não invasivo, que vem sendo bastante utilizado, pois priva os animais do estresse causado pela contenção física e/ou química e pode ser aplicado em estudos longitudinais em cativeiro ou em vida livre (SHIMIZU, 2005). Este método permite o

conhecimento do ciclo ovariano, pois identifica as fases em que o animal se encontra, possibilitando correlações hormonais e comportamentais, provendo as bases para o diagnóstico da função reprodutiva e o desenvolvimento de tecnologias de reprodução artificial. Com relação aos níveis de cortisol este método permite avaliar uma resposta adrenocortical a uma gama de possíveis estressores (WASSER et al., 2000).

Estudos sobre a endocrinologia reprodutiva em primatas não humanos foram realizados com *Callithrix jacchus, Saguinus fuscicollis* e *S. oedipus* (HEISTERMANN; TARI; HODGES, 1993), *Macaca fascicularis* (MATSUMURO et al., 1999; SHIDELER et al., 2001) e *Brachyteles arachnoides* (STRIER; ZIEGLER, 1994) *Leontopithecus rosalia* (RIBEIRO, 1994); *Gorilla gorilla* (BELLEM; MONFORT; GOODROWE, 1995; SAVAGE; BAKER, 1996); *Pithecia pithecia* (SAVAGE et al., 1995), *Pan paniscus* (HEISTERMANN et al., 1996) *Leontopithecus chrysomelas* (CHAOUI; HASLER-GALLUSSER, 1999) *Cebus apella* (GUIMARÃES, 1999); *Macaca fuscata* (FUJITA et al., 2001), Ateles geoffroyi (CAMPBELL et al., 2001) entre outros. Todos utilizaram técnicas de radioimunoensaio ou enzimoiminoensaio para a dosagem hormonal, chegando a resultados de alta confiabilidade, mostrando serem métodos bastante seguros, eficientes e confiáveis para estudos endócrinos com primatas.

Devido ao atraso no tempo de excreção os metabólitos hormonais nas fezes em relação à secreção no sangue, a mensuração dos níveis de hormônios nas fezes são pouco afetadas pelas coletas de amostras, e representam o método ideal para mensurar indicadores hormonais de estresse crônico. Entretanto problemas têm sido apontados no uso da mensuração de glicocorticóides para avaliação do stress. A variabilidade inter-individual tem sido avaliado, por exemplo, em gatos, cães, com

diferenças individuais significativas nos níveis basais de cortisol (SCHATZ; PALME, 2001).

Apesar disso, a utilização da dosagem de metabólitos fecais não está livre de apresentar problemas. Esteróides fecais possuem um tempo de atraso em sua excreção que usualmente ultrapassa às 12 horas e esse tempo é muito variável dependendo da espécie, da idade, do sexo e da dieta. Devido a isso vezes é possível que se perca principalmente variações hormonais de curto prazo. Outro fator a ser levado em consideração é que os metabólitos ao serem excretado via bile nos intestinos são alterados pela ação bacteriana, muitas vezes desconjugados e são novamente absorvidos pela circulação entero-hepática e assim causando um atraso ainda maior no seu aparecimento nas fezes. Diferentes espécies metabolizam os hormônios de forma diferente o que nos impõe a necessidade de conhecer quais são e em quais porcentagens eles estão presentes nas fezes. Já que os kits comerciais comumente usados nas dosagens hormonais são desenvolvidos para dosagens de hormônio livre no sangue e são muito específicos. Por isso para se ter segurança de que o anticorpo empregado está dosando o principal metabólico ou família de metabólitos mais comumente encontrados nas fezes de determinada espécie é de fundamental importância da validação fisiológica do método a ser empregado para cada kit ou anticorpo a ser usado. (GRAHAM et al., 2001).

4 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho são descritos a seguir.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados dois machos e duas fêmeas adultas, e um macho juvenil mantido em cativeiro no Passeio Público de Curitiba – Paraná e dois casais adultos mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.

Animais	Localidade	Sexo	Categoria	Idade
MC1	Curitiba	Macho	Adulto	Desconhecida
MC2	Curitiba	Macho	Adulto	≅ 10 anos
MC3	Curitiba	Macho	Subadulto	≅ 5 anos
MRJ1	CPRJ	Macho	Adulto	≅ 15 anos
MRJ2	CPRJ	Macho	Adulto	≅ 8 ano
FC1	Curitiba	Fêmea	Adulta	Desconhecida
FC2	Curitiba	Fêmea	Adulta	≅ 10 anos
FRJ1	CPRJ	Fêmea	Adulta	≅ 14 anos
FRJ2	CPRJ	Fêmea	Adulta	≅ 5 anos

Quadro 1 - Lista os animais, a localidade, a categoria etária e a idade dos indivíduos utilizados neste estudo. São Saulo – 2006

4.2 CENTRO DE PRIMATOLOGIA DO RIO DE JANEIRO (CPRJ)

A Sede está situada nas coordenadas geográficas de 22°32'14 de Latitude Sul e 42°58'55" de Longitude Oeste, a 48 metros de altitude e distante 86 km da capital do estado.

Localiza-se numa região classificada como de Clima Tropical Quente, com temperatura média superior a 18°C; subtipo Superúmido. A variação máxima do fotoperíodo entre o CPRJ e Passeio Público de Curitiba (PPC) é de 12 minutos.

A figura 1 representa o fotoperíodo para ambas as regiões, evidenciando a pouca diferença entre o período de luminosidade entre os dois ambientes.

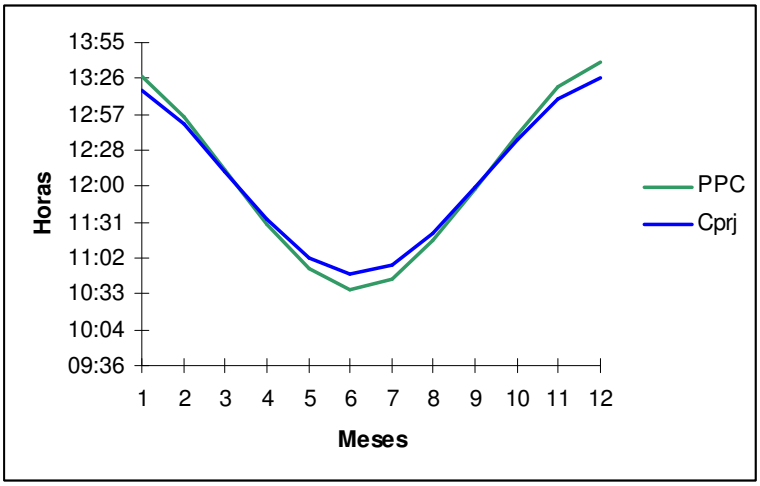


Figura 1 - Comprimento dos dias durante o ano de 2005 em Curitiba (PPC) e no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) - São Paulo -2006

Os animais são mantidos em dois recintos: 1) uma grande gaiola com 15,40 x 5,85 x 4,70 m preenchida com poleiros de madeira para que os animais possam se exercitar, e provida de uma pequena área de cambiamento (3,85 x 3,50 x 2,50 m) para alimentação e facilitar a contenção (Figura 2) e 2) um recinto de 3.80 x 3.50 x 2.50

A alimentação é oferecida duas vezes ao dia. Às 7:00hs é oferecida uma mistura de pão leite ração e vitaminas, cujas sobras são retiradas 10:00hs e as 12:00hs são oferecidas frutas (banana, maça, jaca, etc.) cujas sobras são retiradas às 16:00hs. Vale ressaltar que durante alguns períodos o CPRJ apresentou dificuldades na obtenção de alimento e a dieta ficou bastante empobrecida. Folhas de espécies arbóreas encontradas no CPRJ são oferecidas durante todo o período do dia. A água é oferecida *ad libitum*.

Figura 2 - Recinto grande do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro

Figura 3 - Recinto menor do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ)

4.3 PASSEIO PÚBLICO DE CURITIBA (PPC)

Curitiba localiza-se nas coordenadas 25º25'04" Sul de latitude e longitude 49º14'30" Oeste. Sua altitude varia, aproximadamente, entre 900 e 1000m acima do nível do mar, o que garante um clima entre suavemente frio, com alguns dias frios e outros amenos no inverno. No verão as temperaturas são geralmente amenas, com alguns dias relativamente quentes. A temperatura média anual é de 16ºC.

Os animais são mantidos em uma ilha oval com 600m^2 (figura 4) de área e 100 indivíduos de diferentes espécies arbóreas sendo que muitas delas servem de alimentação complementar aos animais. Na ilha há uma área telada com 3,5m de altura, 4,55m de comprimento e 4,10m de largura. Contígua á tela há uma pequena casa de madeira com 2,75m de altura, 1,54m de largura e 4,10m de comprimento a qual fica suspensa a 80cm do solo. Esta estrutura serve de cambiamento para facilitar capturas (Figura 5).

A alimentação é oferecida duas vezes ao dia. Ás 10:00hs aproximadamente são oferecidos: proteína animal (ovos, frango cozido, e bolinho de carne), verduras e legumes cozidos (milho cozido, abóbora cozida, espinafre, acelga etc.) e pão. Às 15:00hs aproximadamente são oferecidas frutas frescas (banana, melancia, uvas, goiaba, abacate, melão, maracujá, laranja e etc.). A água é oferecida *ad libitum*.

Figura 4 - Vista aérea da ilha dos muriquis (600m^2) no passeio Público de Curitiba

Figura 5 - Área do cambiamento da ilha dos muriquis no Passeio Público de Curitiba

4.4 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

As amostras fecais foram coletadas em períodos contínuos de 20 a 26 dias entre 6:00 e 14:00 horas de três a cinco vezes por semana em quatro visitas em cada instituição durante 11 meses (Quadro 2). Logo após a colheita, cada amostra foi acondicionada em saco plástico tipo “zip” devidamente identificado e armazenada em freezer a -20ºC até ser processada.

	Coletas			
Instituição	**Primeira**	**Segunda**	**Terceira**	**Quarta**
Curitiba	14/10/04 - 5/11/04	5/01/05 - 26/01/05	16/4/05 - 9/05/05	1/8/05 - 23/8/05
CPRJ	23/11/04 - 12/12/04	25/02/05 - 23/3/05	17/6/05 - 29/6/05	11/9/05 - 5/10/05

Quadro 2 - – Períodos de coletas no Passeio Público de Curitiba e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro - CPRJ. São Paulo – 2006

4.5 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO HORMONAL

Visando homogeneizar o teor de umidade das fezes e para garantir sua melhor conservação, as amostras foram secas num liofilizador a vácuo (Savant Instrument Speedvac Rotary Evaporator, Forma Scientific Inc., OH, EUA) antes de qualquer procedimento analítico.

4.6 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DE ESTERÓIDES FECAIS

Dois métodos foram empregados para extração dos metabólitos fecais. Para as fêmeas foi utilizada a metodologia descrita por Ziegler (2005) (Figura 6), uma alíquota de 0,1g da amostra seca, foi transferida para um tudo de ensaio de vidro devidamente identificado, no qual foram adicionados 2,5ml de etanol 50% e 2,5ml de água destilada. Após isso os tubos foram fechados com tampa de borracha e

homogeneizados durante 15 minutos em aparelho Multi Vortex (VWR Scientific products, VX – 2500), depois centrifugado por 15 minutos (2500 r.p.m). Os sobrenadantes foram colocados em tubos tipo eppendorf e armazenados em freezer a -20°C até o momento das dosagens.

Para os machos foi utilizada a metodologia descrita por Graham et al. (2001) (Figura 7), uma alíquota de 0,2g de fezes seca foi transferida para um tudo de ensaio de vidro devidamente identificado no qual foram adicionados 5ml de etanol 80% (80% etanol: 20%água). A mistura foi homogeneizada por 1 minuto em aparelho tipo Multi Vortex (VWR Scientific products, VX – 2500). Em seguida as amostras foram homogeneizadas em misturador mecânico por um período de 15 horas. Foram então centrifugadas a 2500 r.p.m. (rotações por minuto) durante 15 minutos e então transferidas para tubos tipo eppendorf armazenados em freezer a -20°C até a realização da próxima etapa.

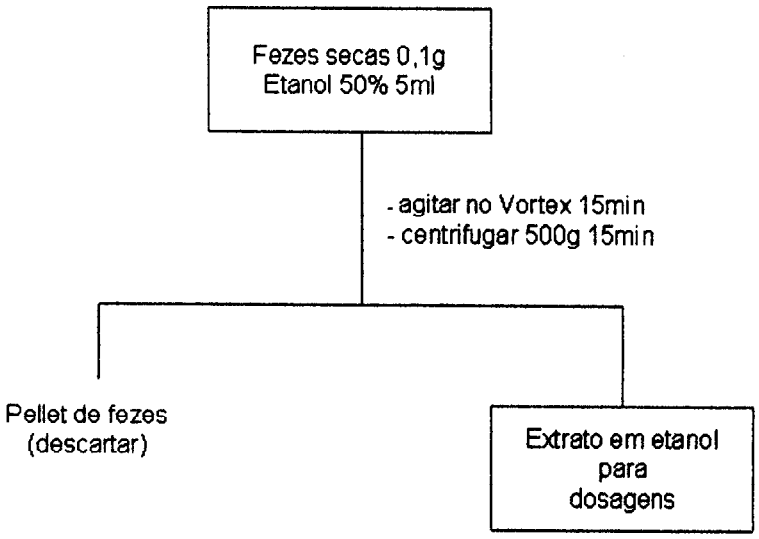


Figura 6 - Fluxograma do protocolo de extração de esteróides de fezes (Ziegler 2005)

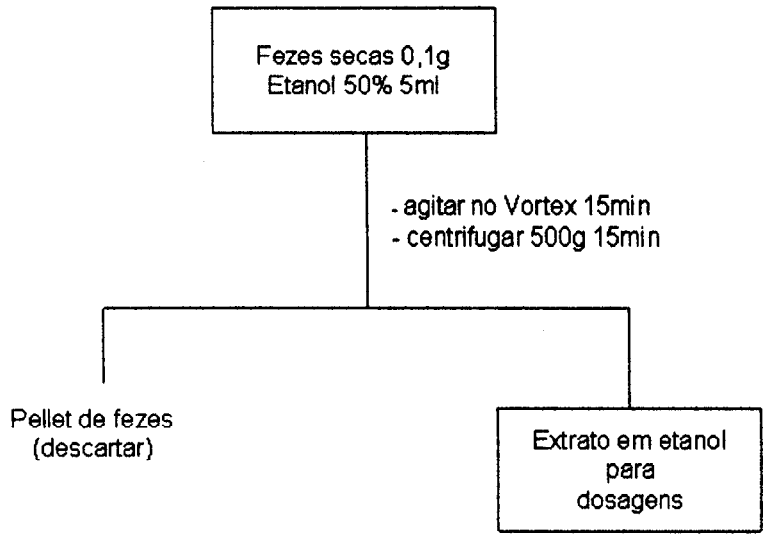


Figura 7 – Fluxograma do protocolo de extração de esteróides fecais (Graham 2001)

4.7 DOSAGEM HORMONAL

Para dosagem dos metabólitos de testosterona, estrógenos e das progestinas fecais utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (COAT-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona (P4), estradiol (E2) e Testosterona (T) no soro humano. Para dosagem da corticosterona foi utilizado conjunto diagnóstico comercial de duplo Anticorpo (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA - antiga ICN).

Estes conjuntos diagnósticos utilizam como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e apresentam pouca reação-cruzada com os metabólitos específicos para cada hormônio estudado. Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina empregada no LDH

As amostras foram diluídas em solução tampão de (gelatina [NaPO4(13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g) e água destilada (1000ml), pH 7,0]) em proporções que variaram de 1/4 a 1/500 dependendo do hormônio a ser dosado. Os valores dos metabólitos hormonais foram corrigidos para peso e diluição e expressos em nanogramas por gramas de fezes secas (ng/g f.s.) para progestinas, metabólitos de testosterona e estrógenos e micrograma por grama de fezes secas (µg/g f.s) para metabólitos de glicocorticóides utilizando a seguinte equação:

$$CF = \frac{C \times Vfe \times D \times [1 + (1-R)]}{Pi} \quad / 1000$$

CF = concentração final;
C = concentração fornecida pelo RIE;
Vfe = volume das fezes ao final da etapa de extração;
D = diluição empregada;
R = taxa da recuperação obtida para cada hormônio extraído.
Pi = peso inicial

4.8 VALIDAÇÃO

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC MEDLAB® e MP Biomedicals para uso em extrato de fezes de muriqui utilizando-se o método de paralelismo utilizando matriz integra. Foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão). A esta amostra adicionamos valores conhecidos de P4, E2, T e Corticosterona a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão fornecida pelo conjunto diagnóstico. Este método indica se o extrato fecal (matriz) interfere na reação do antígeno (hormônio marcado e hormônio da amostra) com o anticorpo do conjunto diagnóstico comercial utilizado.

Os valores da curva assim obtida foram correlacionados com os valores da curva padrão do conjunto diagnóstico. A comparação foi realizada pelo coeficiente de regressão linear, elevado ao quadrado ($r=R^2$) para expressão apenas de valores positivos e do coeficiente de correlação de Pearson. O ensaio foi validado quando os coeficientes de correlação foram próximos de 1 ou 100%.

4.9 VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA

A validação fisiológica foi feita através da comparação dos níveis hormonais com as observações de cópulas para os hormônios reprodutivos e de eventos sabidamente estressantes para os glicocorticóides.

4.10 RECUPERAÇÃO

A eficiência, ou poder de recuperação, de um protocolo de extração avalia-se contando o quanto ele recupera da radioatividade conhecida acrescentada a cada amostra fecal.

Para determinar a eficiência do protocolo de Ziegler e Wittver (2005) um pool de 5g foi formado com alíquotas retiradas de 10 amostras de fezes de machos e 10 amostras de fezes de fêmeas. Para cada hormônio, o protocolo de extração foi realizado em 4 alíquotas do pool. Em cada alíquota foram acrescentados imediatamente após a pesagem 100µl de hormônio marcado radioativamente com Trício, [1,2,6,7,16,17 – 3H] Progesterone, code TRK641, ou [1,2,6,7 - 3H] Testosterone, code TRK921, ou [1,2,6,7 - 3H] Cortisol, codeTRK407, Amersham® ou [2,4 – 3H], Estradiol, Sigma® depositados diretamente nas fezes com a ponteira da pipeta. A seguir executou-se o protocolo nas quatro alíquotas.

Duas alíquotas de 100µl de cada extrato foram transferidas para tubos contendo 3ml de líquido de cintilação (Optiphase `Hisafe´ 3, Perkin Elmer, Finlândia) e estes levados para contagem durante cinco minutos no contador de radiação beta (Tri Carb Liquid Scintillation Analyzers 2100TR-Packard Instrument CO., USA) do Laboratório de Endocrinologia do Tecido Adiposo do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Na mesma ocasião, eram levados ao contador tubos (n = 4 x 2) com 100µl de extrato obtido do mesmo pool e pelo mesmo protocolo, porém sem adição de hormônio triciado, e 100µl de um dos hormônios marcados, também diluídos em 3ml de líquido de cintilação, para determinação da atividade em cpm do hormônio acrescentado nas fezes.

Para avaliar quanto da radioatividade mensurada provinha de fontes externas ao extrato fecal (contaminações ambientais diversas, ruído do detector cromatográfico), um tubo-controle contendo unicamente líquido de cintilação (“blank”) foi levado ao contador. A contagem em cpm obtida com esse tubo “blank” foi subtraída das contagens obtidas para cada amostra.

A porcentagem de recuperação foi calculada para cada alíquota pela comparação da atividade média obtida após a extração com a atividade teórica (não extraída) aplicando-se a fórmula seguinte:

$$\text{Porcentagem} = \frac{\text{Atividade em cpm do extrato X Volume total do extrato (µl)}}{\text{Atividade em cpm de 100µl de hormônio marcado}}$$

Ou seja:

$$\% = \frac{\text{cpm extrato X 5000}}{\text{cpm total}}$$

4.11 COLETAS DE DADOS COMPORTAMENTAIS

Os dados comportamentais foram obtidos pelo método de “todas as ocorrências” (ALTMANN, 1974), onde todas as ocorrências de cópulas e tentativas de cópulas foram registradas (ALTMANN, 1974) e pelo método *Ad libitum* para descrição dos comportamentos raros, onde todas as interações relacionadas ao comportamento reprodutivo e comportamentos anormais ou estereotipados foram descritos.

4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Devido a grande heterogeneidade dos animais estudados e das marcantes diferenças individuais nos níveis dos metabólitos fecais os resultados e discussão foram abordados individualmente. Para cada animal foram determinados os níveis de pico para cada hormônio considerando-se 2 Desvios padrões (DP) para progestinas, glicocorticóides e testosterona e 1,5DP para estrógenos .

Os gráficos são apresentados em escalas diferentes para uma melhor visualização dos eventos hormonais e sua correspondência com os eventos comportamentais (CAMPBELL, 2001; SHIMIZU, 2005; STRIER; ZIEGLER, 1997; WASSER et al., 1993) Devido ao reduzido número de fêmeas estudadas (n=4) e a grande heterogeneidade dos resultados foi realizada para fêmeas apenas estatística descritiva sendo os valores expressos em medianas, valores mínimos e máximos, médias (x) e erros padrões das médias (EPM) e desvio padrão (DP) para cada fêmea estudada e valores expressos em $x \pm$ EPM..

Devido à diferença do número de amostras coletadas para cada individuo e os resultados não atenderem as premissas necessárias à realização de testes estatísticos paramétricos, optou-se pela utilização de testes não paramétricos. Para os machos (n=5) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para determinação de diferenças entre os níveis hormonais individuais e pós teste de Dunn para comparação entre os indivíduos e teste de Mann-Whitney (U-test) para comparar os diferentes ambientes. Para todos os cálculos estatísticos foram retirados os valores de pico. Para avaliar a correlação entre os valores de testosterona e glicocorticóides utilizou-se o teste de Spearman.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados e discutidos individualmente.

5.1 RECUPERAÇÃO

As porcentagens de recuperação foram 105,34 ± 3,34% para o estradiol, 92,16 ± 2,50% para a progesterona, 86,10 ± 12,98% para a testosterona e 111,38 ± 10,44% para o cortisol.

A eficiência do protocolo de Graham et al. (2001) foi avaliada por Chelini (2006) para progesterona, testosterona e cortisol, em oito espécies entre as quais três de primatas, com resultados superiores a 85% na grande maioria dos casos.

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ENSAIOS

O controle de qualidade dos ensaios de RIE foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio, que foi inferior a 11,04% e inter-ensaio, inferior a 4,69%. A sensibilidade mínima detectada foi de 1,45pg/ml nos ensaios para estrógenos fecais, de 0,005ng/ml para progestinas fecais, de 1,4ng/dl para testosterona e 1,58ng/ml (Tabelas 1 a 4).

Tabela 1 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de progestinas fecais - São Paulo – 2006

	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	1,5362	22,216	1,6219	23,176	15745	31507	50%	213,50	0,68%	96,3(0,01)	3,84%	2,99%
2	0,44697	19,725	0,44612	20,862	13428	26631	50%	158,5	0,60%	95,7(0,05)	0,13%	3,96%
3	0,6205	19,689	0,53126	20,575	15139,5	28812,5	53%	66,00	0,23%	95,2(0,05)	10,96%	3,11%
4	0,45747	19,79	0,49833	19,809	21799	41714	52%	153,00	0,37%	95,6(0,005)	6,05%	0,07%
CV Inter ensaio	0,765285	20,355	0,7744025	21,1055							0,84%	2,56%

Tabela 2 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de estrógenos fecais. São Paulo - 2006

	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	23,917	1884,7	21,44	1887,3	10632,5	24189,5	44%	198,00	0,82%	88,6(2,79)	7,72%	0,10%
2	14,98	2097,6	13,324	1918,8	11420	26076,5	44%	136,50	0,52%	90,8(2,32)	8,27%	6,30%
3	21,975	1674,1	22,352	1486,8	10297,5	22028,5	47%	195,00	0,89%	92,4(1,49)	1,20%	8,38%
4	17,179	1907,1	20,087	1705,8	9483	20101	47%	129,50	0,64%	89,2(1,45)	11,04%	7,88%
5	10,99	1862	9,6064	1821,6	95540	200954,5	48%	185,00	0,09%	91,8(1,51)	9,50%	1,55%
CV Inter ensaio	17,8082	1885,1	17,36188	1764,06							1,79%	4,69%

Tabela 3 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de corticosterona fecais. São Paulo – 2006

	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	55,966	990,09	54,096	1042,2	10536,5	17385,5	61%	443,50	2,55%	90,1(1,58)	2,40%	3,63%
2	55,54	975,2	53,62	920,6	9145,5	15932	57%	287,50	1,80%	89,7(2,58)	2,49%	4,07%
CV Inter ensaio	55,753	982,645	53,858	981,4							2,44%	0,09%

Tabela 4 - Controle de qualidade obtido nos ensaios de testosterona fecais. São Paulo – 2006

	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	22,064	747,63	24,817	812,72	8857	21889	40%	135,50	0,62%	95,2(1,40)	8,30%	5,90%
2	20,321	842,12	23,278	836,27	10328	27790,5	37%	164,50	0,59%	92,0(4,51)	9,59%	0,49%
CV Inter ensaio	21,1925	794,875	24,0475	824,495							8,92%	2,59%

5.3 VALIDAÇÃO DO ENSAIO

Os valores das curvas obtidas a partir das diluições do hormônio marcado em um “pool” de amostras fecais para os metabólitos de estrógenos, progestinas, glicocorticoides e testosterona apresentaram alta e significativa correlação com as curvas padrões dos conjuntos diagnósticos (Figuras 8 a 11). Os valores de $r=R^2$ foram 0,98 para os metabólitos fecais de estrógenos e 0,99 para as progestinas fecais. Em ambos os casos $p<0,0005$.

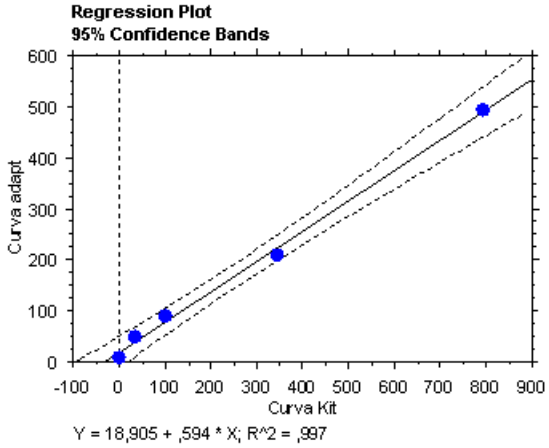


Figura 8 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estrógenos fecais. São Paulo – 2006

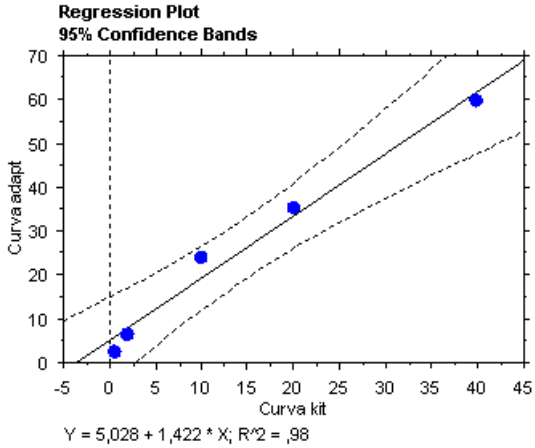


Figura 9 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progestinas fecais São Paulo – 2006

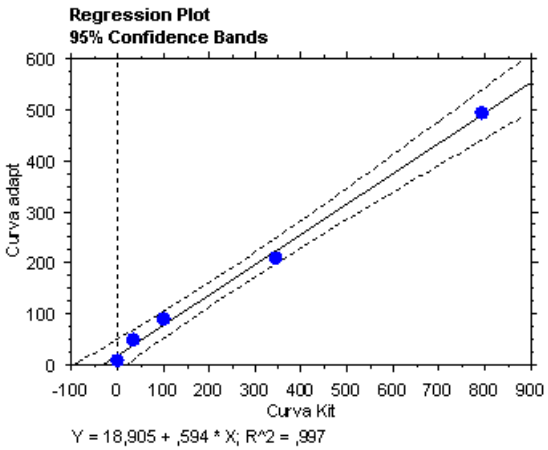


Figura 10 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para testosterona fecais. São Paulo - 2006

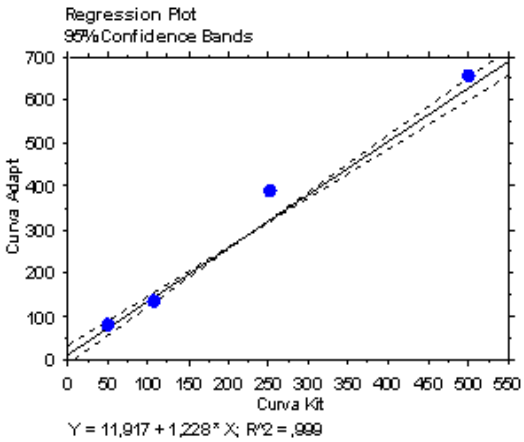


Figura 11 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para glicocorticóides fecais. São Paulo – 2006

5.4 FÊMEAS

Ao todo foram extraídas e dosadas 227 amostras. As médias, desvios padrões (DP), erros padrões da média (EPM), valores mínimos, máximos e medianas para as quatro fêmeas são expressos para os metabólitos fecais de progestinas (Tabela 5) e estrógenos (Tabela 6).

Tabela 5 -Médias , desvio padrão (DP), erros padrões da média (EPM), valores mínimos,máximos e medianas das concentrações de progestinas fecais (ng/g fezes secas) em fêmeas de Muriqui (*Brachyteles arachnoides*). - São Paulo - 2006

Animal	Média	DP	EPM	Mediana	Mínimo	Máximo
FC1	$5,82 \times 10^3$	$6,15 \times 10^3$	$0,84 \times 10^3$	$4,17 \times 10^3$	0.05×10^3	$20,34 \times 10^3$
FC2	$16,04 \times 10^3$	$22,43 \times 10^3$	$3,20 \times 10^3$	$0,98 \times 10^3$	$0,07 \times 10^3$	$80,46 \times 10^3$
FRJ1	$26,04 \times 10^3$	$29,85 \times 10^3$	$3,73 \times 10^3$	$14,25 \times 10^3$	$0,18 \times 10^3$	$105,23 \times 10^3$
FRJ2	$3,30 \times 10^3$	$4,04 \times 10^3$	0.52×10^3	$1,18 \times 10^3$	$0,03 \times 10^3$	$145,56 \times 10^3$

Tabela 6 – Médias, desvio padrão (DP), erros padrões da média (EPM), valores mínimos, máximos e medianas das concentrações de estrógenos fecais (ng/g fezes secas) em fêmeas de Muriqui (*Brachyteles arachnoides*). - São Paulo - 2006.

Animal	Média	DP	EPM	Mediana	Mínimo	Máximo
FC1	$2,97 \times 10^3$	$3,99 \times 10^3$	0.54×10^3	$1,58 \times 10^3$	$0,005 \times 10^3$	$15,16 \times 10^3$
FC2	$8,84 \times 10^3$	$18,70 \times 10^3$	$2,67 \times 10^3$	$0,19 \times 0^3$	$0,002 \times 10^3$	$71,57 \times 10^3$
FRJ1	$8,54 \times 10^3$	$14,51 \times 10^3$	$1,81 \times 10^3$	$1,28 \times 10^3$	$0,011 \times 10^3$	$57,70 \times 10^3$
FRJ2	0.77×10^3	$1,81 \times 0^3$	0.23×0^3	$0,11 \times 10^3$	$0,004 \times 10^3$	$11,92 \times 10^3$

Nos gráficos (Figura 12 e 13) abaixo são representadas as médias das concentrações de metabólitos de progestinas estrógenos fecais por animal e por período de coleta.

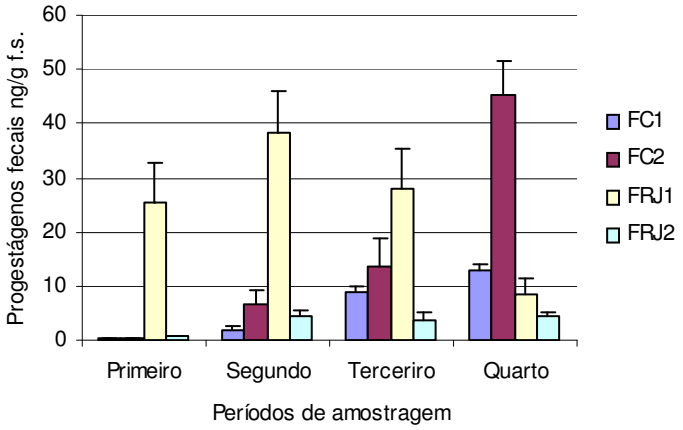


Figura 12 - Médias dos níveis de progestinas fecais por animal por período de coleta - São Paulo – 2006

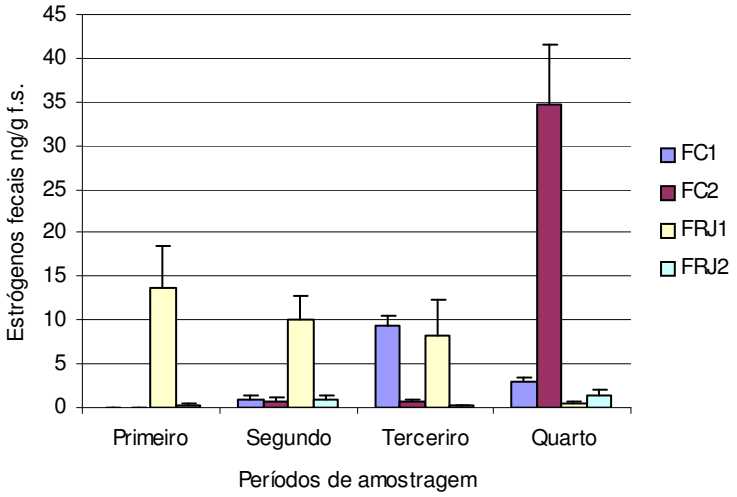


Figura 13 - Médias dos níveis de estrógenos fecais por animal por período de coleta São Paulo – 2006

Analisando os gráficos acima podemos observar a variação das concentrações hormonais em cada período de amostragem. No primeiro período apenas FRJ1 apresentou níveis médios altos para ambos os hormônios, todas as outras fêmeas não apresentaram concentrações médias indicativas de atividade ovariana. Os animais FC1 e FC2 apresentaram níveis crescentes de progestinas, enquanto FRJ1 apresentou níveis decrescentes alcançando a menor média (8,38±2,85x10^3ng/g f.s), no último período de coleta (set./out.). A fêmea FRJ2 mostrou, a partir do segundo período de coleta, um aumento nas concentrações médias de progestinas que permaneceram no mesmo patamar até o fim do período de estudo. A fêmea FC1 apresentou um aumento das concentrações médias de estrógenos no terceiro período e a fêmea FC2 apresentou concentrações médias elevadas de estrógenos no último período (34,66± 6,83x10^3ng/g f.s). A fêmea FRJ1 apresentou níveis decrescentes de progestinas durante os quatro períodos de amostragem alcançando concentrações médias muito baixas (0,56±0,19 x10^3ng/g f.s.) no último período de amostragem. FRJ2 apresentou médias baixas em todos os períodos.

5.4.1 Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ)

Esta secção apresenta os resultados e discussão específicos para as fêmeas do CPRJ:

5.4.1.1 Fêmea Adulta -- FRJ1

Esta fêmea nasceu no CPRJ em 30 de outubro de 1991. Filha de um macho *B. arachnoides,* (MRJ1) com uma fêmea de *B. hipoxanthus*.

Apesar de copular com MRJ1, mesmo bem antes desse estudo e em todas as coletas de dados no presente estudo, nunca foram observados gestação ou nascimentos.

Esta fêmea apresentou os maiores níveis médios (±EPM) de progestinas ($26,04x10^3 \pm 3,73x10^3$ng/g f.s.) e níveis médios altos também para estrógenos ($8,540.5x10^3 \pm 1,81x10^3$ng/g f.s.). Desde o início das coletas ela apresentou comportamento reprodutivo proceptivo, apresentando expressão facial de cópula “grimace” e copulando em todos os períodos amostrados.

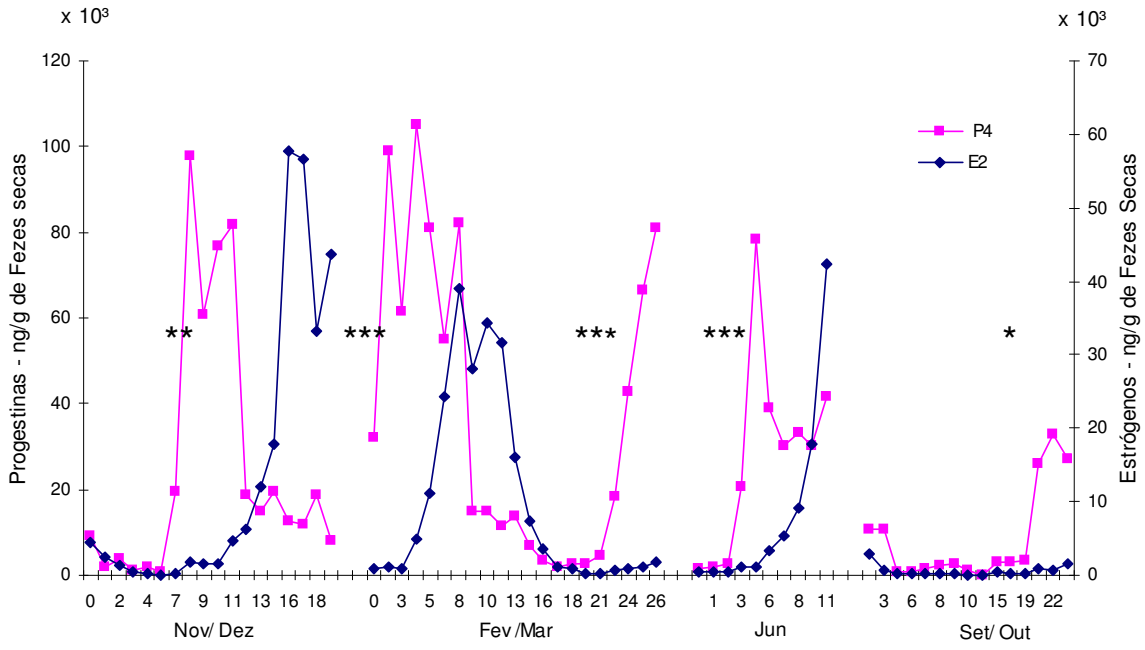


Figura 14 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos fecais de progestinas e estrógenos fecais da fêmea FRJ1 durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos pretos representam as cópulas observadas.-São Paulo - 2006

Analisado o perfil de metabólitos de progestinas e estrógenos (Figura 14) foi possível observar um ciclo completo com intervalo entre cópulas de 21 dias nos meses de Fev/Mar. Os períodos de receptividade sexual variaram de 1 a 3 dias e o período proceptivo iniciou-se 2 a 3 dias antes das cópulas. Foi possível observar uma fase luteínica de 4 dias no primeiro período e 7 dias na segundo período e uma fase folicular de 4 dias no segundo período de amostragem.

Em Set./Out. essa fêmea apresentou níveis hormonais mais baixos, mas mesmo assim copulou. Entretanto, neste momento foi observado o menor período de receptividade apenas 1 dia e uma longa fase com níveis de progestinas e estrógenos baixos de 14 dias. Nos primeiros dias da coleta ela estava visivelmente magra e apática, movimentava-se muito pouco permanecendo a maior parte do tempo descansando, mas foi melhorando seu ritmo de atividade no decorrer do

período de coleta. Neste período ela apresentou uma estranha opacidade no cristalino (Figura 15) de causa não identificada.

Figura 15 - FRJ1 em 15/03/2005 (A) e 29/09/2005 (B) apresentando acentuada opacidade do cristalino seta

Com relação ao ciclo ovariano observado, considerando o intervalo entre as cópulas, pudemos encontrar uma grande semelhança aos padrões descritos para espécie *B. hypoxanthus* (STRIER; ZIEGLER, 1994; , 1997; ZIEGLER et al., 1997).

Este animal apesar de copular seguidamente com MRJ1 nunca reproduziu. É difícil determinar as causas de falha reprodutiva dessa fêmea uma vez que ela apresentava ciclos ovarianos completos e comportamento reprodutivo normal. Devido ao fato dessa fêmea ser híbrida podemos sugerir que a causa de sua infertilidade seja uma esterilidade do híbrido e, portanto de origem genética. Em um macho híbrido foi sugerida a esterilidade de animais híbridos, pois não foi encontrado nenhum espermatozóide em cortes histológicos dos testículos, apesar de serem encontrados espermatogônias e espermatócitos primários, não foram

identificados esperrmatócitos secundários nem espermátides (DIXSON; PISSINATTI; ANDERSON, 2004). Contudo estudos mais profundos para esclarecer a existência de esterilidade do híbrido para fêmeas oriundas do cruzamento de *B. hypoxanthus* com *B. arachnoides* devem ser conduzidos.

A fêmea FRJ1 apresentou comportamento estereotipado, dando várias voltas no recinto. Tais surtos aconteciam principalmente antes das refeições, porém eram curtos e raramente passavam de 10 min. Ela também possuía uma locomoção característica e bem diferente dos outros animais. Não obstante, a estereotipia desta fêmea parece estar relacionada à ansiedade de alimentação e parece exercer certo conforto psicológico (MASON, 1991). Os animais de Curitiba também apresentaram aumento da locomoção nos períodos que precediam a alimentação principalmente uma fêmea subadulta que não foi objeto desse estudo, porém os outros animais também apresentavam um aumento da locomoção principalmente quando havia atraso na alimentação.

5.4.1.2 Fêmea adulta – FRJ2

Animal de procedência desconhecida deu entrada na instituição 06/02/2002 com idade estimada entre 8 meses e 1 ano.

No dia 03/11/2004 apresentou parto distócico com feto muito grande que veio a óbito no momento do parto. Na ocasião ela apresentou lacerações na região vulvar e precisou de tratamento medicamentoso. No dia 01/12/2004, portanto um mês após o parto já foi observada copulando com o macho MRJ1.

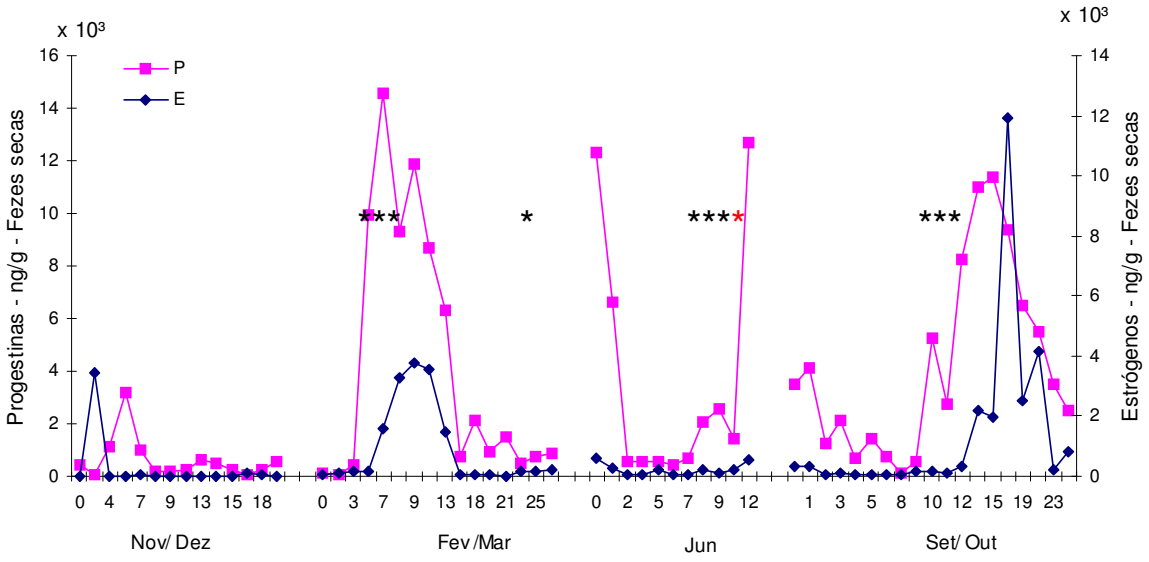


Figura 16 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos fecais de progestinas e estrógenos da fêmea FRJ2, durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos vermelhos representam as tentativas de cópula e os asteriscos pretos as cópulas observadas - São Paulo - 2006

Ao analisarmos seu perfil hormonal (Figura 16) podemos ver que o animal apresentou os níveis médios hormonais mais baixos. Média (± EPM) de 3,30,46±0,52 x10^3ng/g f.s. para progestinas e 0,77±1,8x10^3ng/g f.s. para estrógenos. A despeito desses baixos níveis hormonais apresentou pelo menos um ciclo típico nos meses de Set/Out. com 4 dias de atraso dos estrógenos em relação às progestinas e um pico de estrógenos com valor máximo de 1,19 x10^3ng/g f.s µg/g. Nos meses de Nov./Dez apresentou as menores concentrações médias para progestinas (0,61±0,21x10^3ng/g f.s) e não apresentou perfil cíclico. Nos meses de Fev./Mar já apresentou um perfil cíclico com maiores níveis de progestinas (4,30±1,2x10^3ng/g f.s.), com um pico discreto de estrógenos (3,75x10^3ng/g f.s).

No mês de Junho apresentou um perfil cíclico de progestinas e baixos níveis de estrógenos, isto pode ser explicado pelo período reduzido de amostragem (12 dias). Talvez se fossem continuadas as coletas pudéssemos observar um aumento também nos níveis de estrógenos.

Apresentava um acentuado comportamento proceptivo sempre buscando contato com o macho MRJ1 apresentando a genitália e por muitas vezes tocando e puxando o pênis do macho. Tais comportamentos iniciaram-se 3 a 4 dias antes das cópulas e foram muito intensos.

É difícil explicar o porquê das baixas concentrações de metabólitos de estrógenos e progestinas dessa fêmea. Talvez o fato de ela ter apresentado um parto com nascimento de um natimorto logo antes do início desse trabalho possa explicar o perfil não cíclico encontrado na primeira amostragem. Contudo não é suficiente para explicar os baixos níveis encontrado durante todo o estudo. Mesmo se considerarmos as grandes variações individuais (BELLEM; MONFORT; GOODROWE, 1995; HEISTERMANN et al., 1996; MIYAMOTO et al., 2001; STRIER; ZIEGLER, 1997) em outros trabalhos que utilizam dosagem de esteróides fecais a diferença entre a fêmea FRJ2 e os outros indivíduos estudados é tão discrepante que apenas com um acompanhamento mais detalhado poderíamos esclarecer este achado.

Durante todo o estudo não observamos nenhum comportamento estereotipado.

5.4.2 Passeio Público de Curitiba (PPC)

Esta secção apresenta os resultados e discussão específicos para as fêmeas do PPC:

5.4.2.1 Fêmea adulta -- FC1

Oriunda de uma apreensão em Morretes ingressou na instituição em 10/09/1997, já adulta, e em 24/03/99 pesava 9,300 kg. A idade não foi estimada.

Desde sua chegada deu a luz a quatro filhotes (Quadro 3).

Amimal	Data do Nascimento	Sexo do Filhote
FC1	16/04/1999	Fêmea
FC1	05/10/2000	Macho
FC1	25/06/2002	Fêmea
FC1	07/01/2004	Macho
FC2	28/06/2004	Indeterminado

Quadro 3 - Ocorrência de nascimentos da fêmea FC1 e FC2 no Passeio Público de Curitiba. São Paulo – 2006

Seus dados hormonais mostram o retorno à atividade ovariana cíclica, nos meses de Out./Nov. (Figura 17). Os níveis médios de progestinas foram muito baixos de $0,25 \pm 0,06 \times 10^3$ng/g f.s. e de $0,02 \pm 0,003 \times 10^3$ng/g f.s. de estrógenos, a despeito dessas baixas concentrações hormonais no dia 22 do período de coleta ela apresentou comportamento proceptivo “grimace” (Figuras 18 e 19).

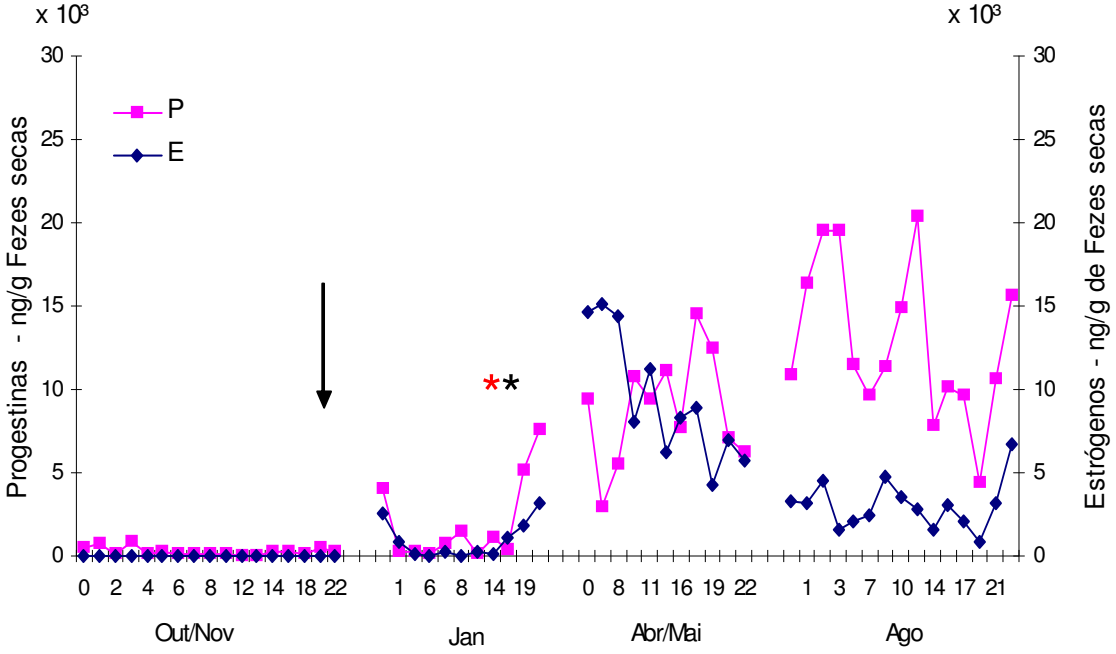


Figura 17 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos fecais de progestinas e estrógenos da fêmea FC1, durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos vermelhos representam as tentativas de cópula e os asteriscos pretos as cópulas observadas A seta indica presença de comportamento proceptivo. São Paulo, 2006

Apesar dos baixos níveis hormonais apresentados também no mês de janeiro apresentou comportamento proceptivo “grimace” com uma cópula ocorrendo no dia 21/01/2005, quatro dias antes do início da elevação dos níveis das progestinas. Nos meses de abr./mai. ela já apresenta elevações substanciais nos níveis de estrógenos (9,45±1,16ng/gx103 f.s) e progestinas (13,74±5,16103ng/g f.s), sendo que os níveis de estrógenos apresentam uma tendência de queda e as progestinas uma elevação sustentada, neste período ela não apresentou comportamento proceptivo nem foi atrativa para os machos. No mês de agosto ela apresentou os níveis médios mais altos de progestinas (12,80±1,21x103ng/g f.s.) apresentando um padrão sustentado, não cíclico, tanto para progestinas quanto para estrógenos (3,05± 0,37x103ng/g f.s). Também não apresentou comportamento proceptivo nem foi atrativa para os machos.

Figura 18 – Foto da fêmea FC1 apresentando expressão facial de cópula (grimace) indicativo de receptividade , na foto ela está segurando o pênis do macho MRJ1

Figura 19 – Foto da fêmea FC1 apresentando expessão facial de cópula (grimace) indicativo de recptividade

Durante todo período do estudo ela foi vista amamentando. O período de lactação pode ser dividido em duas fases: a primeira fase é caracterizada por total inatividade ovariana; e uma segunda onde já se observa atividade ovariana, porém caracterizada por ciclos inférteis em que as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona permaneceram em níveis basais ou muito baixos, seguido de um período de infertilidade residual com a presença de ciclos menstruais e cópula (RECABARREN et al., 2000).

A elevação sustentada prolongada das concentrações de progestinas e estrógenos fecais foi claramente indicativa de prenhez em macacos aranhas (CAMPBELL et al., 2001). Os níveis hormonais dos dois últimos períodos de coleta podem assim sugerir gestação o que condiz com a ausência de comportamento sexual neste período, ainda que os níveis de esteróides estivessem altos em relação ao período de out./nov. Níveis estes que chegaram a ser 49 e 115 vezes mais altos, para progestinas e estrógenos respectivamente.

5.4.2.2 Fêmea adulta -- FC2

Oriunda de uma apreensão em Morretes ingressou na instituição em 10/09/1997 já adulta e pesando 8,600 kg. A idade não foi estimada, mas pela aparência foi considerada jovem. Em 28/06/2004 pariu um filhote natimorto.(Quadro).

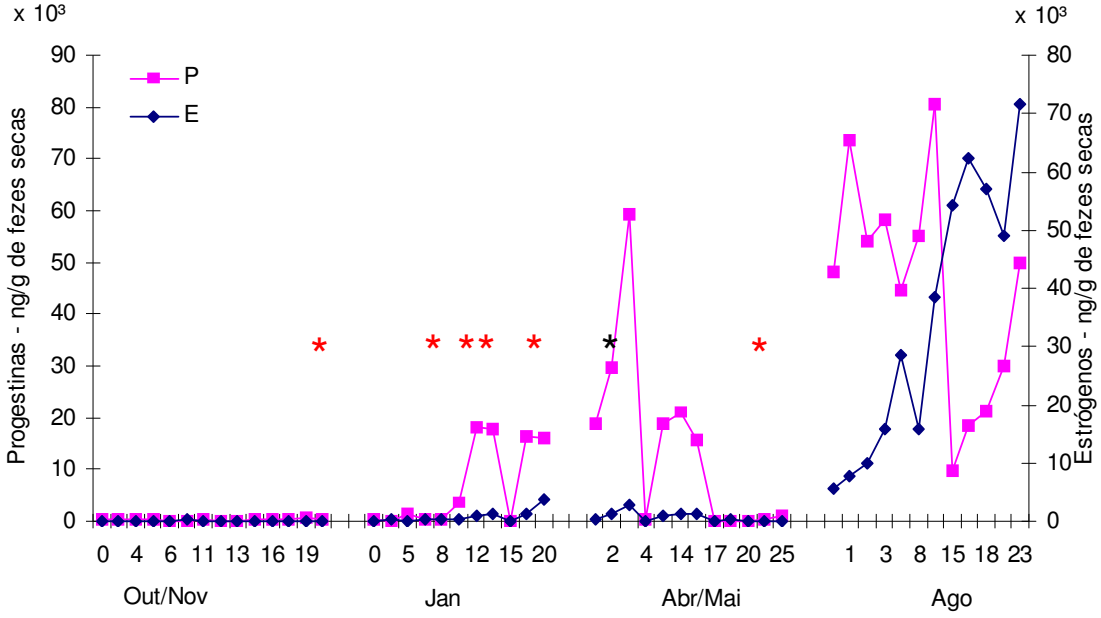


Figura 20 -Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos fecais de progestinas e estrógenos da fêmea FC1, durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos vermelhos representam as tentativas de cópula e os asteriscos pretos as cópulas observadas A seta indica presença de comportamento proceptivo. São Paulo, 2006

Pelo perfil hormonal (Figura 20) podemos observar que em Out./Nov. ela não apresentou nenhum padrão cíclico com níveis médios muito baixos 0,067±0,01210^{3}ng/g f.s, 0,24±0,0310^{3}ng/g f.s, para estrógenos e progestinas respectivamente. Em Janeiro já podemos observar um indício de atividade ovariana com o surgimento de elevações nas concentrações de progestinas e aumento nas concentrações médias de estrógenos. Seus níveis de esteróides vão aumentando no decorrer das coletas, apresentando em agosto níveis bastante altos 517 e 184 vezes mais altos do que as médias dos meses de out./nov. para estrógenos e progestinas respectivamente. Neste mês apresentou um perfil cíclico, porém atípico com o aumento sustentado de estrógenos de no mínimo 20 dias, sendo que o ciclo descrito para espécie é de 21,0 ± 5,4.

A fêmea FC2 teve um filho natimorto em 28/06/2004, e talvez por isso ainda não estivesse totalmente restabelecida a atividade ovariana o que pode explicar a os

dados encontrados no primeiro período de coleta. Contudo isto parece não ser suficiente para elucidar tal fato, com certeza outros fatores podem estar influenciando a função ovariana nesta fêmea. Um estudo mais aprofundado com um período maior de tempo é necessário para esclarecer se tal comportamento é realmente um padrão ou apenas um caso esporádico.

Em muriquis do norte as cópulas ocorrem em períodos que não estão estritamente relacionados aos períodos peri-ovulatórios (STRIER; ZIEGLER, 1997). Todas as fêmeas desse estudo copularam no período de 3 dias antes ou depois do dia que antecede o aumento sustentado de progestinas. Isto aconteceu mesmo quando os níveis eram muito baixos, indicando ausência de ovulação, o que pode indicar que também para o muriqui do sul cópulas possam ocorrem em ciclos anovulatórios. Nos muriquis do norte um limiar muito baixo de estrógenos parece ser necessário para a retomada da ciclicidade e concepção no pós-parto. (STRIER; ZIEGLER, 2005). Isto parece ser verdade também para a fêmea FC1.

O presente estudo mostrou um padrão bastante diverso do encontrado por Strier (1997) no que diz respeito à estação de concepção e acasalamento. Enquanto no Muriqui do norte a época de acasalamento ocorre nos meses de outubro a janeiro, no presente estudo três das quatro fêmeas estudadas não apresentaram atividade ovariana nesta época. É certo que a FC1 provavelmente apresentava aciclia lactacional, mas para as fêmeas FC2 e FRJ2 2 e 4 não está claro o porquê da ausência de atividade ovariana neste período. Se observarmos as datas de nascimentos em Curitiba (ver Tabela 3) pode-se notar que os nascimentos distribuíram-se durante todo o ano. Tais dados vêm corroborar a suspeita de que a sazonalidade encontrada no muriqui seja realmente relacionada às condições ambientais. (STRIER; MENDES; SANTOS, 2001)

Outro aspecto interessante de se notar é a presença de comportamentos tipicamente reprodutivos ("grimace" e cópulas) mesmo com níveis hormonais muito baixos. Achado similar ao reportado por Strier (1997)

5.5 MACHOS

No total foram extraídas e dosadas para metabólitos de testosterona 165 amostras fecais e 133 amostras fecais para metabólitos de glicocorticóides. As médias, erros padrões da média (EPM), desvios padrões (DP), valores mínimos, máximos e medianas para os cinco machos estão expressos na tabela 7 para os metabólitos fecais de testosterona totais e na tabela 8 para metabólitos de testosterona excluídos os valores de pico.

Tabela 7 - Médias, erros padrões, valores mínimos, máximos e medianas das concentrações de testosterona fecais (ng/g fezes secas) em fêmeas de Muriqui (*Brachyteles arachnoides*) - São Paulo - 2006

Animal	Média	DP	EPM	Mediana	Mínimo	Máximo
MRJ1	463.91	238.52	35.17	384.47	147.80	1209.08
MRJ2	726.55	356.48	86.46	756.07	66.22	1474.49
MC2	379.55	252.09	51.46	292.71	110.35	972.01
MC1	275.47	213.90	29.66	218.04	61.33	1485.37
MC3	131.89	65.38	12.82	103.84	40.65	299.10

Tabela 8 - Médias, erros padrões, valores mínimos, máximos e medianas das concentrações de testosterona fecais (ng/g fezes secas) excluído os valores de pico em machos de Muriqui (*Brachyteles arachnoides*). - São Paulo - 2006

Animais	Média	DP	EPM	Mediana	Mínimo	Máximo
MRJ1	418.97	169.90	25.91	378.55	147.80	929.59
MRJ2	679.80	309.72	77.43	731.95	66.22	1283.82
MC1	353.79	223.13	46.53	252.19	110.35	834.00
MC2	232.56	89.07	12.72	216.79	61.33	499.67
MC3	131.89	65.38	12.82	103.84	40.65	299.10

Nas tabelas 9 e 10 são expressos as médias, erros padrões da média (EPM), desvios padrões (DP), valores mínimos, máximos e medianas para os cinco machos

dos metabólitos fecais de glicocorticóides fecais totais e excluídos os valores de pico respectivamente.

Tabela 9 - Médias, erros padrões, valores mínimos, máximos e medianas das concentrações de glicocorticóides fecais (µg/g fezes secas) em machos de Muriqui (*Brachyteles arachnoides*) - São Paulo - 2006

Animais	X	DP	EPM	Mediana	Mínimo	Máximo
MRJ1	14.66	8.12	1.21	11.33	4.53	48.95
MRJ2	17.12	16.52	4.01	14.01	6.08	75.13
MC1	30.34	26.02	5.97	22.43	10.51	120.01
MC2	50.77	104.80	16.37	21.11	6.32	475.84
MC3	96.49	142.77	43.05	41.41	11.08	472.12

Tabela 10 - Médias, desvios padrões(DP) erros padrões da média(EPM) , valores mínimos, máximos e medianas das concentrações de glicocorticóides fecais (µg/g fezes secas) excluídos os valores de pico em machos de Muriqui (*Brachyteles arachnoides*) - São Paulo - 2006

Animais	X	DP	EPM	Mediana	Mínimo	Máximo
MRJ1	13.88	6.28	0.95	11.20	4.53	28.92
MRJ2	13.50	7.27	1.82	12.76	6.08	33.20
MC1	25.36	14.74	3.47	21.66	10.51	65.03
MC2	20.99	10.65	1.75	17.53	6.32	55.48
MC3	58.93	73.50	23.24	36.48	11.08	254.32

Comparando-se as médias dos resultados obtidos para cada localidade (excluído os picos) podemos observar que os machos do CPRJ apresentaram níveis de testosterona fecais significativamente maiores do que os machos de Curitiba (Mann-Whitney U-test, $p < 0.0001$) (Figura 21).

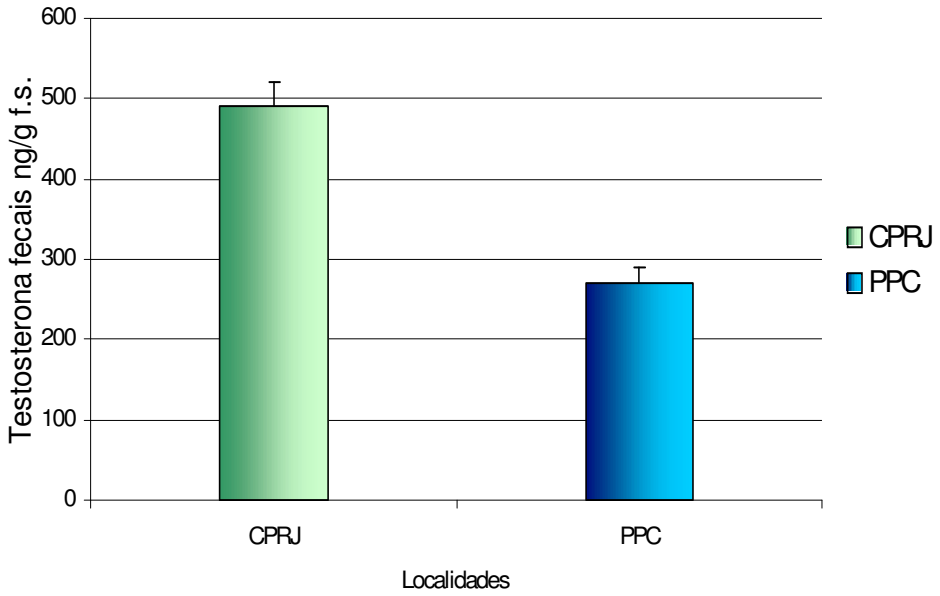


Figura 21 - Médias dos das dosagens de metabólitos de testosterona fecais para Centro de Primatologia do Rio de Janeiro CPRJ e Passeio Público de Curitiba (CTBA) - São Paulo – 2006

Comparando-se as médias dos níveis de metabólitos de testosterona fecais por indivíduo (Figura 23) podemos verificar que os machos do CPRJ (MRJ1 e MRJ2) não apresentaram diferença significativa em suas concentrações de testosterona fecais (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn), nem os machos de Curitiba (MC1 e MC2) apresentaram diferença significativa entre si (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn). Entretanto o MRJ2 apresentou níveis significativamente mais altos do que ambos os machos de Curitiba (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn). Os machos MRJ1 e MC1 não apresentaram diferença significativa em seus níveis de testosterona fecais (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn), mas. MRJ1 apresentou níveis significativamente mais altos do que MC2 (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn). MC3 apresentou os mais baixos níveis de T e foi significativamente menores do que os de todos os outros machos (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós teste de Dunn).

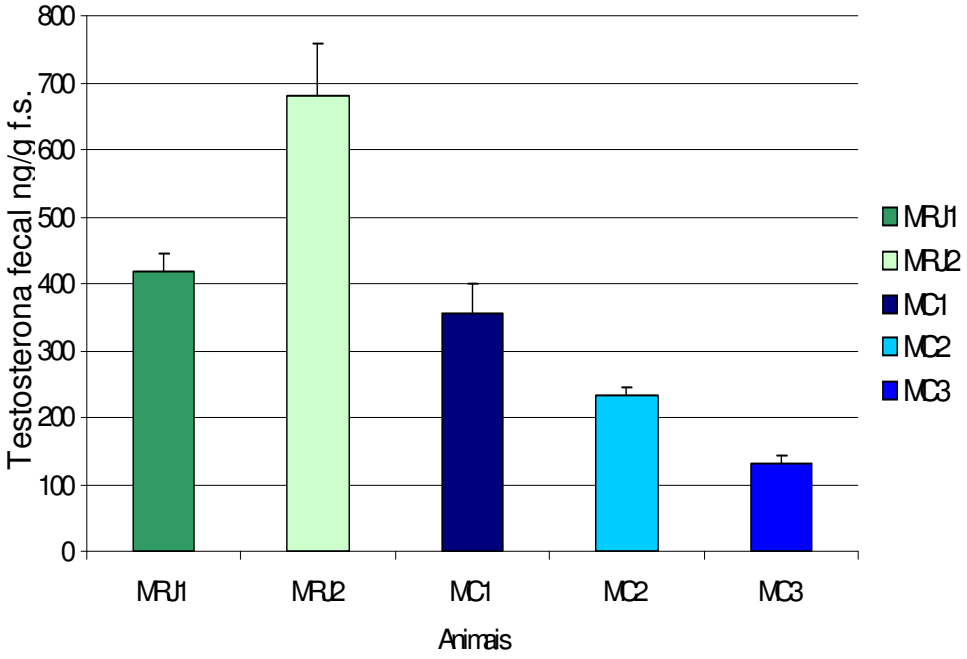


Figura 22 – Médias por animal das concentrações de metabólitos de testosterona fecais São Paulo -2006

Ao compararmos as médias das concentrações de testosterona fecais por período de coleta (Figura 23) podemos observar que o macho MRJ2 apresentou as maiores médias em todos os períodos amostrados e o macho MC3 apresentou as menores médias. O macho MRJ1 apresentou as segundas maiores médias de testosterona fecais sendo superado apenas por MC1 no segundo período de coleta. MC2 apresentou médias mais baixas do que todos os outros machos exceto MC3.

Não houve variação significativa entre os períodos para MRJ1, MRJ2 e MC2 (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn). O macho MC1 apresentou diferença significativa entre o primeiro e segundo período, mas não apresentou diferenças entre os demais períodos (Kruskal-Wallis $p<0,05$ pós-teste de Dunn).

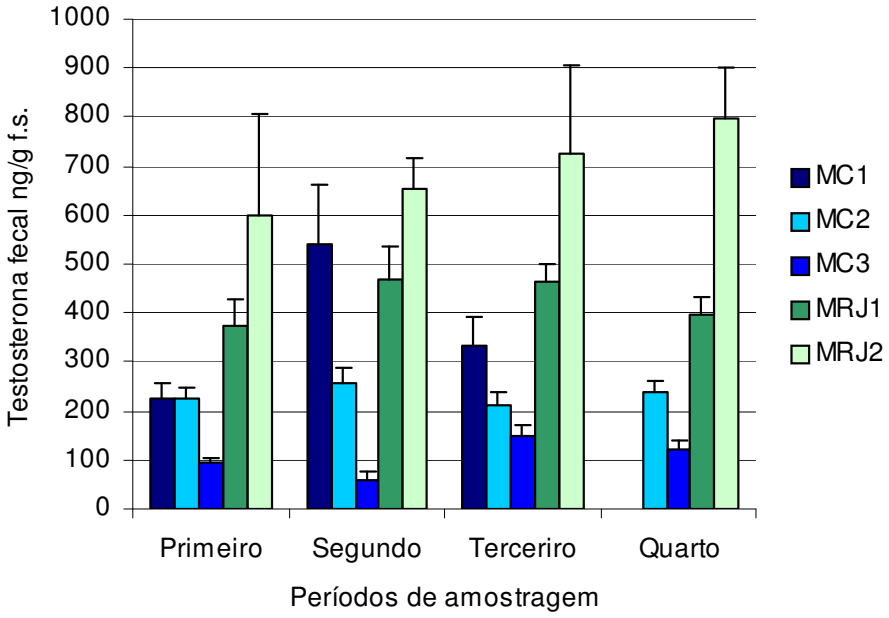


Figura 23 – Médias dos níveis de metabólitos de testosterona fecais por animal e por período de coleta São Paulo -2006

Comparando os níveis médios gerais de glicocorticóides fecais dos machos (valores totais excluindo-se os valores de pico) do CPRJ e PPC podemos observar que as médias do PPC foram significativamente mais altas do que as médias de CPRJ (Mann-Whitney U-test, $p < 0.0001$). (Figura 24).

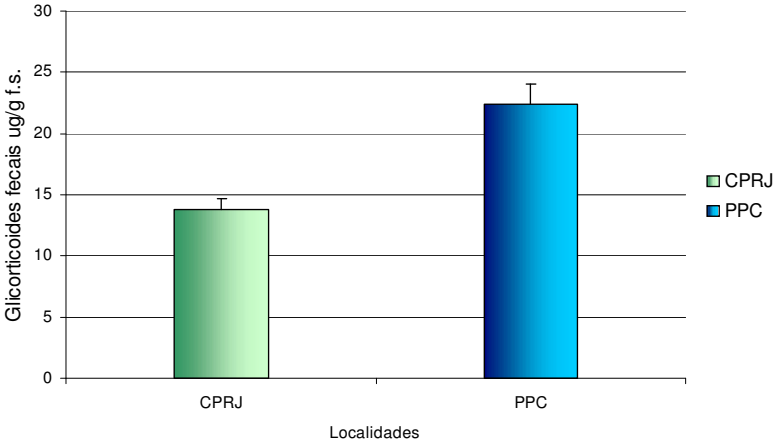


Figura 24 - Médias das dosagens de glicocorticóides (Gcf) fecais dos animais do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) comparado a medias dos animais do Passeio Público de Curitiba (PPC) São Paulo – 2006

Ao compararmos as médias das concentrações de glicocorticóides fecais por animal (valores totais excluindo-se os valores de pico) (Figura 25), constatamos que os machos do PPC (MC1 e MC2), não apresentaram diferença significativa entre si (Kruskal-Wallis p<0,05 pós-teste de Dunn), mas foram significantemente mais altos do que os machos do CPRJ (MRJ1 e MRJ2) (Kruskal-Wallis p<0,05 pós-teste de Dunn). Não houve diferença significativa dos níveis fecais de glicocorticóides entre os machos do CPRJ, (MRJ1 e MRJ2) (Kruskal-Wallis p<0,05 pós-teste de Dunn).

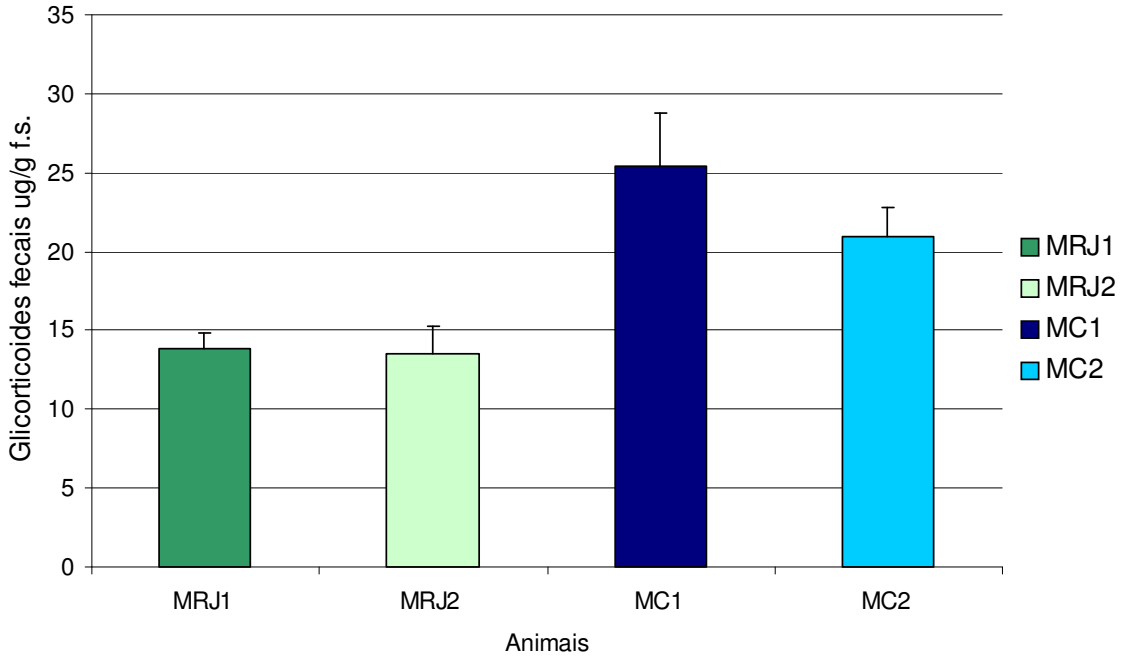


Figura 25 - Médias por animal dos níveis de metabólitos de glicocorticóides fecais - São Paulo -2006.

Ao compararmos os níveis de glicocorticóides fecais por período de amostragem (Figura 26) podemos observar que MC1 apresentou as maiores médias nos dois primeiros períodos de amostragem, sendo que no terceiro período não houve diferença significativa entre nenhum dos machos (Kruskal-Wallis p<0,05 pós-

teste de Dunn). O macho MRJ2 apresentou média alta no primeiro período e médias mais baixas nos períodos subseqüentes porem não foram significativamente diferentes (Kruskal-Wallis p<0,05 pós-teste de Dunn) O macho MC2 apresentou médias significativamente mais baixas apenas no terceiro período(Kruskal-Wallis p< 0,05 pós-teste de Dunn). E o macho MRJ1 apresentou pouca variação em suas médias em todos os períodos não havendo variação significativa entre os períodos (Kruskal-Wallis p< 0,05 pós-teste de Dunn).

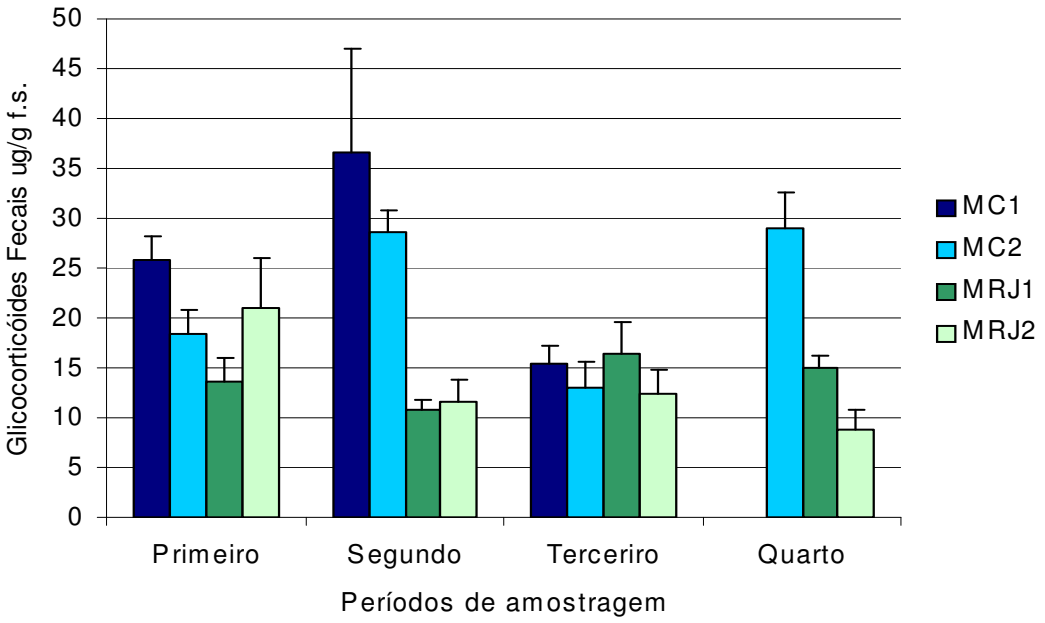


Figura 26 - Médias dos níveis de glicocorticóides fecais por animal e por período de coleta São Paulo – 2006

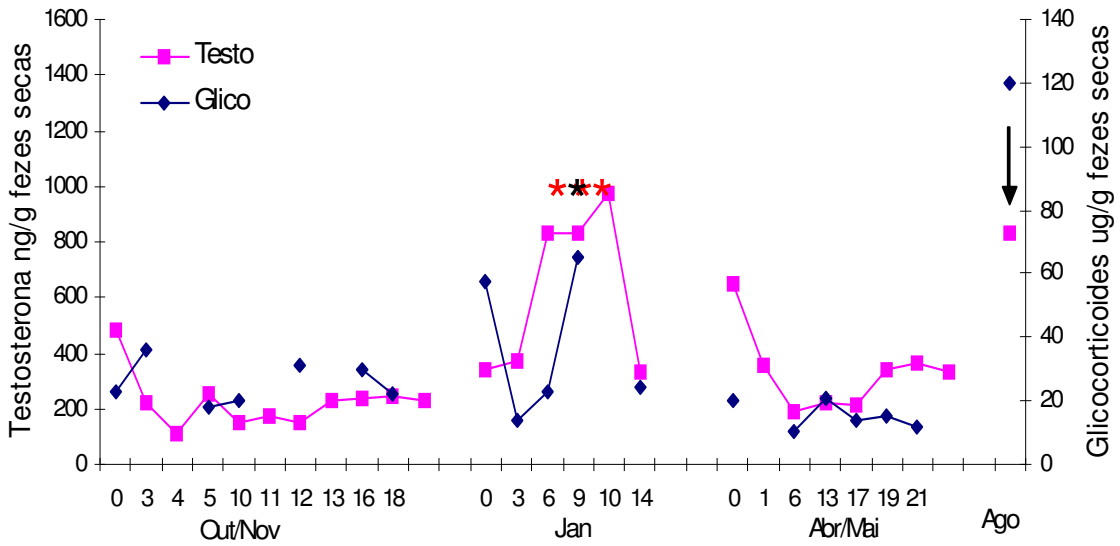
Apesar dos gráficos que representam os perfis dos machos analisados a seguir sugerirem uma correlação entre os níveis de glicocorticóides e testosterona fecais só foi possível detectar correlação significante o macho MRJ1 (Spearman p<0,05).

5.5.1 Passeio Público de Curitiba (PPC)

Os resultados específicos referentes a cada individuo bem como seu histórico são descritos e discutidos a seguir.

5.5.1.1 Macho adulto - MC1

Oriundo de uma apreensão em Morretes ingressou na instituição em 10/09/1997 já adulto e pesando 10 kg em 30/09/1999.



.
Figura 27 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos de testosterona e glicocorticóides fecais do macho MC1, durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos vermelhos representam as tentativas de cópula e os asteriscos pretos as cópulas observadas A seta indica o dia da ultima coleta - São Paulo -2006

Analisando o perfil de testosterona e glicocorticóides fecais do macho MC1 (Figura 27) podemos observar que há um aumento de ambos os hormônios no mês de janeiro (segunda coleta) e esse aumento é relacionado ao surgimento de

comportamento proceptivo (inspeções) e reprodutivo (cópulas e tentativa de cópulas).

Este macho durante os dias 17 e 18 de janeiro, que correspondem aos dias 6 e 7 do período de coleta apresentou forte comportamento proceptivo (Figura 28) seguindo e permanecendo muito próximo da FC2 e por várias vezes tentando copular (Figura 29). Entretanto não foram observadas cópulas entre MC1 e FC2, apesar de haver fortes indícios de que as cópulas realmente tenham acontecido (presença de plug espermático no solo). Logo após, nos dias 9 e 10 do mesmo período de coleta ele apresentou o mesmo comportamento com relação à fêmea FC1 quando foi observado cópula com ejaculação. Na coleta seguinte ao fim das atividades reprodutivas seus níveis voltaram ao mesmo patamar dos dias anteriores ao início do comportamento reprodutivo.

Cinco dias antes do início das coletas no mês de agosto o macho MC1 havia brigado com o macho MC2, foi preso no cambiamento e veio a óbito 29/09/2005. Na necropsia contatou-se um grave quadro de pneumonia que provavelmente foi a causa da morte, e que pela gravidade da lesão deve ter tido início antes do episodio de luta. As concentrações hormonais dosadas no dia antes de sua morte foram 3,9 vezes maiores do que sua média, evidenciando a relação entre o aumento de glicocorticóides fecais e a situação estressante.

Figura 28 – FoMacho adulto “MC1” inspecionando fêmea FC1

Figura 29 - Macho adulto MC1 tentando copular com a fêmea FC2

5.5.1.2 Macho adulto - MC2

Oriundo de uma apreensão em Morretes ingressou na instituição em 0/09/1997, já adulto. Foi, porém considerado jovem em 06/04/1999 quando pesava 8,600 kg.

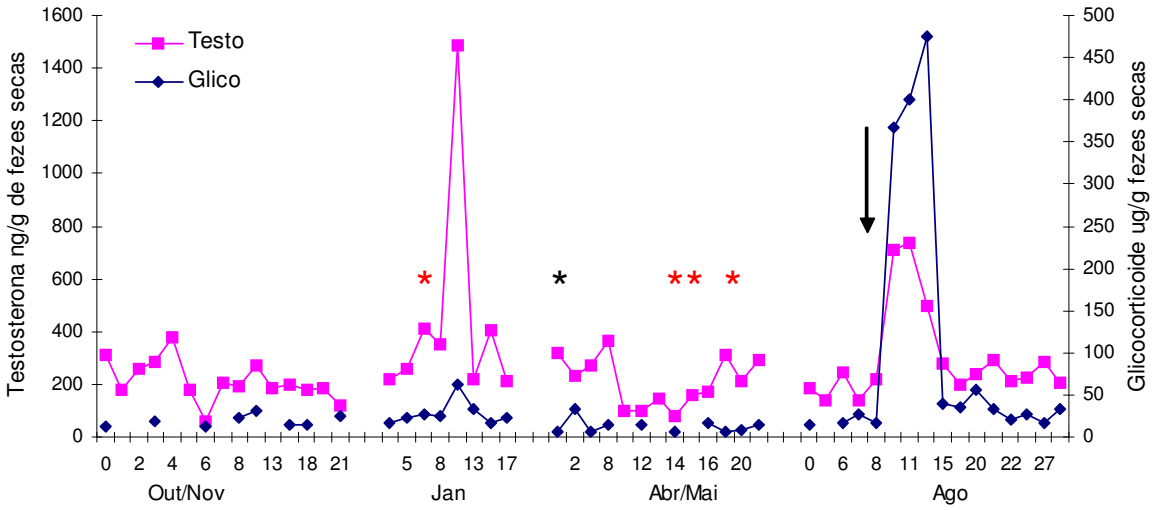


Figura 30 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos de testosterona e glicocorticóides fecais do macho MC2 , durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos vermelhos representam as tentativas de cópula e os asteriscos pretos as cópulas observadas A seta indica o dia da cirurgia. - São Paulo - 2006

Analisando o perfil de testosterona e glicocorticóides fecais do MC2 verificamos (Figura 30) que no mês de janeiro ele apresenta os maiores níveis médios (±EPM) de testosterona fecal (255,5±31,69ng/g f.s.) e de glicocorticóides fecais de (28,70±2,13µg/g f.s.) e um pico de testosterona fecal no 12º dia de coleta. Neste período a despeito da grande atividade reprodutiva do MC1, observamos o macho MC2 tentando copular com FC2 apenas uma vez e antes do período em que MC1 iniciou seu comportamento proceptivo. O macho MC2 afastava se de FC2 sempre que esta estava sendo seguida de perto por MC1. Todavia quando a FC2 não estava sendo seguida por MC1 ele a inspecionava, porém não tentava cópula e

logo se afastava. No período de abr./mai., correspondente ao terceiro período de coleta. O macho MC2, a despeito do comportamento sexual observado, apresentou níveis médios de testosterona e glicocorticóides fecais em níveis mais baixos (213,2±26,0ng/g f.s. e 13,01±2,39µg/g f.s. respectivamente). É interessante ressaltar que neste período o MC1 não apresentou muito interesse sexual pelas fêmeas, e que as tentativas de cópula observadas nos dias 14,15 e 20 foram com uma fêmea subadulta que não foi objeto desse estudo.

No dia 03/08/05 o animal foi contido e anestesiado para amputação do quinto dedo do membro posterior direito, em conseqüência de lesão ocasionada em uma luta com MC1. Na coleta subseqüente, dois dias após, já apresentava níveis altos de glicocorticóides fecais, 17,4 vezes mais altos do que a média, chegando a um pico máximo (475.838 µg/g f.s) 22,5 vezes maior do que a sua média (20.986±1.750µg/g f.s.).

Em primatas, a anestesia geral ou dissociativa com utilização de quetamina induz o estresse, entretanto esse estresse é parece ser mais relacionado à desorientação causada pela droga do que pelo efeito direto do anestésico no eixo pituitário adrenal. Em chimpanzés os níveis de glicocorticóides fecais conseguiram refletir 7 entre 8 eventos anestésicos com intervalo de dois dias, demonstrando grande potencial do uso glicocorticóides fecais para mensurar o estresse induzido pela anestesia (HEISTERMANN; PALME; GANSWINDT, 2006; UDELSMAN; CHROUSOS, 1988; WHITTEN; BROCKMAN; STAVISKY, 1998). Nossos dados validam o monitoramento do stress induzido pela anestesia com a metodologia empregada no presente estudo.

5.5.1.3 Macho subadulto - MC3

Nasceu no Passeio Público de Curitiba filho da FC1 em 05/10/2000.

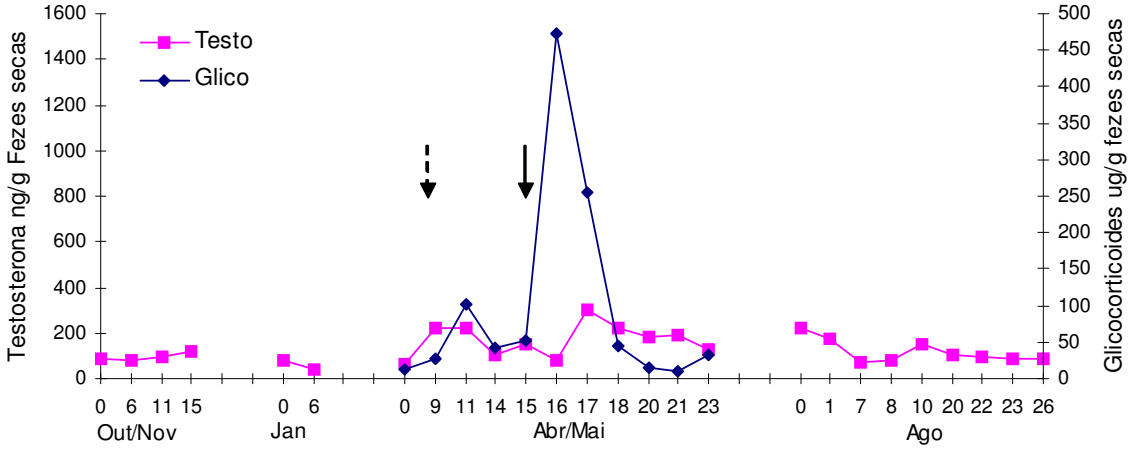


Figura 31 Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos de testosterona durante aos quatro períodos de coleta e de glicocorticóides fecais apenas durante o período abr./mai. do macho MC3, durante os quatro períodos de coleta. A seta pontilhada indica o dia em que foi observada a ferida e a seta contínua indica o dia da contenção mecânica - São Paulo - 2006

Ao analisarmos o perfil dos esteróides fecais (Figura 31) podemos verificar que o animal apresentou os níveis de testosterona significativamente mais baixos do que outros machos, o que realmente reflete sua condição de imaturidade sexual. Na ocasião, ele estava com 5 anos de idade e possuía um volume testicular bem reduzido em relação aos outros machos. Entretanto já começava a mostrar sinais de interesse sexual pelas fêmeas, pois foi possível observá-lo inspecionando as fêmeas quando elas estavam atrativas aos machos adultos.

No dia 25/05/2005 o animal apresentou uma ferida circular na base da cauda que coçava muito e chamava bastante a atenção dos outros animais principalmente

do MC1 que por várias vezes foi visto inspecionando a ferida, no dia 03/05/2005 o animal foi contido mecanicamente para avaliação da ferida.

Dois dias após o dia em que foi constatada a ferida houve uma resposta nos níveis de glicocorticóides fecais 1,7 vezes maior do que a média (58.93 µg/g f.s). Após a contenção mecânica os níveis foram (472.120 µg/g f.s) 8 vezes maiores do que a média evidenciando que os níveis de glicocorticóides fecais de fato refletiram a situação estressante.

Estes dados validam fisiologicamente a metodologia empregada neste estudo, pois mostram a relação dos níveis hormonais correspondendo a uma condição fisiológica conhecida.

5.5.2 CPRJ

Dois machos foram estudados no CPRJ.

5.5.2.1 Macho Adulto - MRJ1

Animal procedente da região de Eldorado/SP deu entrada na instituição em 05/01/1990 com idade aproximada de 8 meses e peso de 3,2 kg. Este animal foi confiscado pela policia florestal do estado de São Paulo e foi mantido por 2 meses no Parque Estadual Turístico Alto Ribeira, PETAR.

Analisando o perfil de metabólitos de testosterona e glicocorticóides fecais de MRJ1 (Figura 32) podemos observar que ocorreram elevações dos níveis de testosterona e glicocorticóides ocorreram simultaneamente aos períodos de acasalamento ou em períodos que antecedem as cópulas Figura. Suas médias por período de coleta não variaram muito para ambos os hormônios. No 16°dia de coleta houve um pico de glicocorticóides fecais (48,95µg/g f.s.) 3,5 maiores do que a média

(13,88µg/g f.s.), no entanto não foi observado nenhum fator estressante que possa ser uma causa provável para o surgimento desse pico.

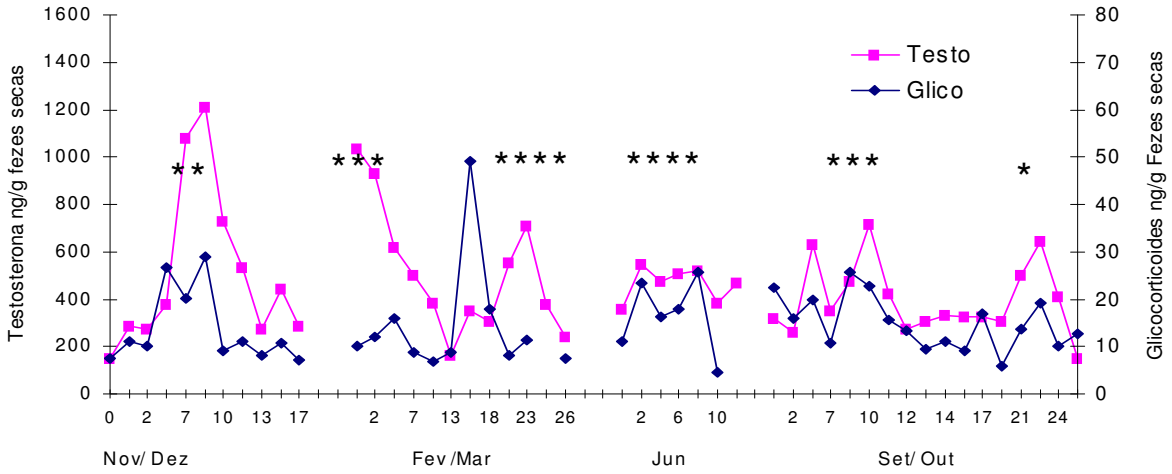


Figura 32 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos de testosterona e glicocorticóides fecais do macho MRJ1, durante os quatro períodos de coleta. Os asteriscos pretos indicam cópulas observadas - São Paulo - 2006

Em machos de várias espécies de primatas a exposição à fêmea em estro resulta em elevadas concentrações de testosterona e cortisol, *Macaca fascicularis* (GLICK, 1984), *Cebus apella* (LYNCH; ZIEGLER; STRIER, 2002), e *Saimiri sciurius* (MENDOZA; MASON, 1991). De fato os machos MC1 e MRJ1 apresentaram os maiores níveis de glicocorticóides e testosterona exatamente nos períodos de maior atividade sexual.

Ao contrário do esperado os machos de PPC apresentaram níveis mais altos de glicocorticóides fecais do que os machos do CPRJ, o que pode estar relacionado à competição e hierarquia. Estudos com roedores e primatas mostraram que subordinados e dominantes têm níveis basais de glicocorticóides mais altos do que animais mantidos isolados, sugerindo que os animais dominantes de fato apresentam estresse em sociedades hierárquicas. (BLANCHARD et al., 1977).

Apesar dos muriquis viverem em uma sociedade supostamente igualitária com baixos índices de comportamento agonístico na natureza (MENDES, 1986; STRIER, 1987) em cativeiro não há estudos prévios que corroborem essa afirmação. De fato, em nosso trabalho não foi observado nenhum episodio de luta entre MC1 e MC2, exceto pela luta que culminou na morte de MC1 e na amputação do dedo de MC2. Contudo tal ocorrência deu se uma semana antes do início das coletas sendo impossível saber quais circunstâncias particulares a deflagraram. Poderia ser uma luta para restabelecimento de hierarquia? Poderia ser uma forma de se eliminar doentes ou animais debilitados? Uma vez que MC1 apresentava um quadro de pneumonia? E neste caso teriam as fêmeas também teriam participado?

É inútil especular a respeito de tais circunstâncias. O fato é que considerando apenas os níveis hormonais, torna-se muito difícil chegar a uma conclusão. Situações já descritas neste trabalho podem nos levam a sugerir que ao menos no caso do grupo do PPC exista uma relativa competição entre os machos.

O paradigma padrão assume que primatas com baixo nível e hierárquico são sujeitos a altos níveis de estresse social ou nutricional. Conseqüentemente são caracterizados por alto nível cortisol e reduzido sucesso reprodutivo (DUNBAR, 1988). Este cenário não é adequado para um número grande de espécies e os achados são muitas vezes ambíguos. Entre macaco rhesus concentrações de cortisol não são relacionadas a um status social nem negativamente associado com concentrações de testosterona (BERCOVITCH, 1991); (CLARKE; CZEKALA; LINDBURG, 1995). Machos dominantes de lêmures (*Microcebus murinus*) têm significativamente concentrações mais altas de testosterona do que os subordinados, entretanto as duas classes de machos não apresentam diferenças nos níveis cortisol (PERRET, 1992). Em saimiris machos dominantes apresentam

concentrações mais altas de testosterona e cortisol do que machos subordinados.(BERCOVITCH; ZIEGLER, 2002; COE; LEVINE, 1995) contudo outros estudos não mostraram tal relação como exemplo em sagüis (GINTHER; ZIEGLER; SNOWDON, 2001) e muriqui (STRIER; DIB; FIGUEIRA, 2002). Isto posto, podemos concluir que a despeito da baixa agressividade dos muriquis, que pelo menos em cativeiro há fortes indícios de que possa haver alguma forma de hierarquia, mesmo que não claramente expressa e que de fato haja alguma forma de disputa social. Evidenciando que um ambiente com mais estímulos sociais possa levar a uma condição mais desafiadora, portanto mais estressante e isso pode ser refletido pelos níveis de metabólitos fecais de glicocorticóides.

5.5.2.2 Macho adulto Jovem - MRJ2

Animal procedente do CEMAS/SP deu entrada na instituição em 17/11/04 com idade aproximada de 7 anos. Durante todo período de coleta permaneceu no recinto menor.

Analisando o perfil de testosterona e glicocorticóides fecais (Figura 33) podemos observar nos dias 0 e 5 do primeiro período amostral, altos níveis de testosterona (1283,824ng/g f.s.) e um pico de glicocorticóides (75,128µg/g f.s.) que foram 5,5 vezes maiores do que a média excluídos os valores de pico.Já no segundo período amostral ele apresentou as menores médias de glicocorticóides que permaneceram baixas durante os períodos subseqüentes. Contudo seus níveis de testosterona fecais permaneceram altos durante todos os períodos.

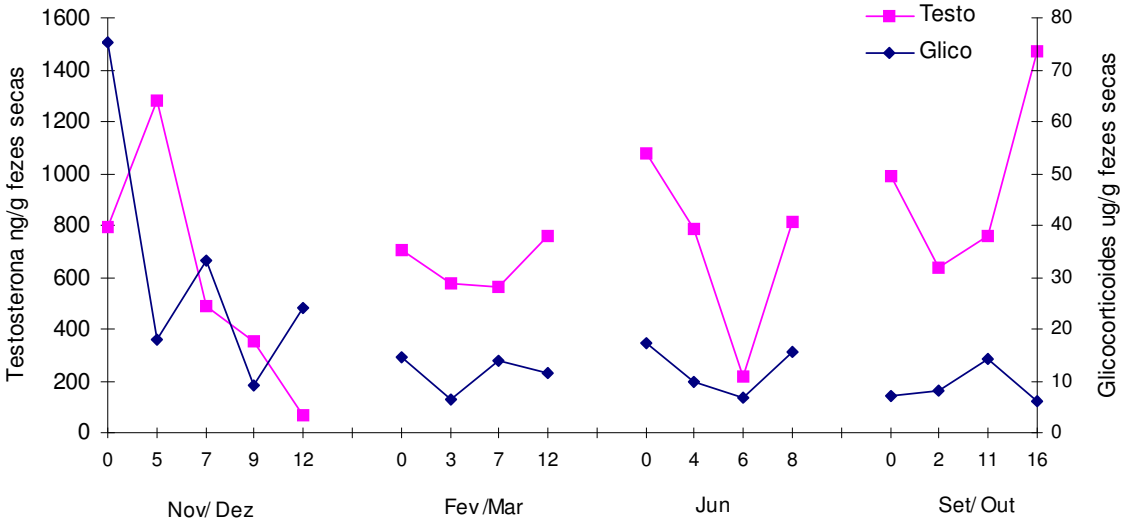


Figura 33 - Representação gráfica do perfil das concentrações de metabólitos fecais de testosterona e glicocorticóides fecais do macho MRJ2, durante os quatro períodos de coleta. São Paulo, 2006

Alguns trabalhos com primatas mostraram que jovens apresentam altos níveis de testosterona (BEEHNER et al., 2006; GESQUIERE et al., 2005), isto pode explicar os altos níveis de andrógenos encontrados em MRJ2, contudo tais variações podem ser espécie-específicas e vários trabalhos tem indicado uma grande variação individual. É esperado que os níveis hormonais desse macho caiam no decorrer de seu desenvolvimento. Contudo apenas com acompanhamento longitudinal é que poderíamos esclarecer tal fato.

Este animal apresentou comportamento estereotipado que surgia nos diferentes períodos do dia, mesmo quando ele tinha alimento disponível. Estes surtos podem ser explicados pelas condições às quais ele estava submetido (pequeno recinto e isolamento social), indicando que para este animal as condições de manutenção podem ser inadequadas a despeito dos baixos níveis de glicocorticóides fecais.

Talvez o histórico desse animal possa esclarecer o porquê dessa aparente falta de relação entre o comportamento e os níveis de glicocorticóides fecais. Era um animal muito dócil e quando eu entrava no recinto, ele logo se aproximava e procurava contato físico, impedindo minha saída, evidenciando a sua adaptação ao cativeiro e ao contato humano (Figura 34).

Figura 34 – Macho MRJ1 copulando com fêmea FRJ1

Figura 35 – Foto mostrando o macho MRJ2 segurando e a mão do pesquisador

6 CONCLUSÕES

- ✓ As fêmeas de muriquis copulam mesmo não tendo uma atividade ovariana cíclica.
- ✓ A mensuração de metabólitos de estrógenos e progestinas fecais permitiu diferenciar as fêmeas com ausência de atividade ovariana das fêmeas cíclicas.
- ✓ Há uma grande variação inter-individual dos esteróides fecais nas fêmeas.
- ✓ Ao contrário do esperado, os níveis de glicocorticóides dos animais do CPRJ foram menores do que os de Curitiba.
- ✓ Nos períodos de acasalamento observamos elevações nos níveis dos metabólitos de testosterona.
- ✓ Foi validado fisiologicamente o uso da metodologia empregada neste estudo para metabólitos de testosterona, glicocorticóides, estrógenos e progestinas.
- ✓ Níveis de glicocorticóides fecais podem ser utilizados para monitorar o estresse por mudança de ambiente, contenção física e química.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. C. **O mono (*Brachyteles arachnoides*)**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciencias, v.1. 1971. 53 p.

ALBERTSSON-WIKLAND, K.; ROSBERG, S.; LANNERING, B.; DUNKEL, L.; SELSTAM, G.; NORJAVAARA, E. Twenty-Four-Hour Profiles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone, Testosterone, and Estradiol Levels: A Semilongitudinal Study throughout Puberty in Healthy Boys. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 2, p. 541-549.

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, n., p. 227-267, 1974.

ANDERSON, J. R.; CHAMOVE, A. S. Early social experience and the development of self-aggression in monkeys. . **Biology.Behaviour**, v. 10 n., p. 147–157, 1985.

AUJARD, F.; PERRET, M.; VANNIER, G. Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 168, n. 7, p. 540-548, 1998.

BAHR, N. I.; PALME, R.; MOHLE, U.; HODGES, J. K.; HEISTERMANN, M. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, n. 3, Mar, p. 427-438, 2000.

BAILLIE, J. E. M.; BENNUN, L. A.; THOMAS M. BROOKS; BUTCHART, S. H. M.; CHANSON, J. S.; ZOE COKELISS; HILTON-TAYLOR, C.; HOFFMANN, M.; GEORGINA M. MACE; MAINKA, S. A.; POLLOCK, C. M.; ANA S.L. RODRIGUES; STATTERSFIELD, A. J.; STUART, S. N. **IUCN Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment**. Cambridge, UK. 2004

BARDIN, C. W. The Anabolic Action of Testosterone: Chicago University Press 1996.

BARDIN, C. W.; CATTERALL, J. F. Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1285, 1981.

BEEHNER, J.; BERGMAN, T.; CHENEY, D.; SEYFARTH, R.; WHITTEN, P. Testosterone predicts future dominance rank and mating activity among male chacma baboons. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 59, n. 4, p. 469-479, 2006.

BELLEM, A. C.; MONFORT, S. L.; GOODROWE, K. L. Monitoring Reproductive Development, Menstrual Cyclicity and Pregnancy in the Lowland Gorilla (Gorilla-Gorilla) by Enzyme- Immunoassay. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 26, n. 1, March, p. 24-31, 1995.

BERCOVITCH, F. B. Social Stratification, Social Strategies and reproductive success in primates. **Ethology and Sociobiology**, v. 12, n. 4, p. 315-333, 1991.

BERCOVITCH, F. B.; ZIEGLER, T. E. Reproductive Strategies and Primate Conservation. **Zoo Biology**, v., n., p. 163-169, 1989.

BERCOVITCH, F. B.; ZIEGLER, T. E. CURRENT TOPICS IN PRIMATE SOCIOENDOCRINOLOGY. **Annual Review of Anthropology**, v. 31, n. 1, p. 45-67, 2002.

BERGER, J.; TESTA, J. W.; ROFFE, T.; MONFORT, S. L. Conservation Endocrinology: a Noninvasive Tool to Understand Relationships between Carnivore Colonization and Ecological Carrying Capacity. **Conservation Biology**, v. 13, n. 5, p. 980-989, 1999.

BERMOND, B.; MOS, J.; MEELIS, W.; VAN DER POEL, A. M.; KRUK, M. R. Aggression induced by stimulation of the hypothalamus: effects of androgens. **Pharmacology Biochemistry Behaviour**, v. 16, n. 1, p. 41-5, 1982.

BERNSTEIN, I. S.; ROSE, R. M.; GORDON, T. P. Behavioural and hormonal responses of male rhesus monkeys introduced to females in the breeding and non-breeding seasons. **Animal Behaviour**, v. 25, n. 3, p. 609-14, 1977.

BLANCHARD, D. C.; SAKAI, R. R.; MCEWEN, B.; WEISS, S. M.; BLANCHARD, R. J. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. **Animal Behaviour,** , v. v. 25, n. 3, p. 715-24, 1977.

BOINSKI, S. Sex-Differences in the Foraging Behavior of Squirrel-Monkeys in a Seasonal Costa-Rican Habitat. **American Journal of Primatology**, v. 12, n. 3, p. 331-331, 1987.

BRIBIESCAS, R. G. Testosterone levels among Aché hunter/gatherer men: a functional interpretation of population variation among adult males. **Human Nature**, v. 7, n., p. 163–188, 1996.

BRIBIESCAS, R. G. Reproductive Ecology and Life History of the Human Male. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 44, n., p. 148–176, 2001.

BROCKMAN, D. K.; WHITTEN, P. L. Reproduction in free-ranging *Propithecus verreauxi*: Estrus and the relationship between multiple partner matings and fertilization. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 100, n. 1, May, p. 57-69, 1996.

BROCKMAN, D. K.; WHITTEN, P. L.; RICHARD, A. F.; BENANDER, B. Birth season testosterone levels in male Verreaux's sifaka, Propithecus verreauxi: insights into socio-demographic factors mediating seasonal testicular function. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, n. 2, p. 117-127, 2001.

BRONSON, E. H. Are humans seasonally photoperiodic? **Journal of Biological Rhythms**, v. 19, n. 3, Jun, p. 180-192, 2004.

BRONSON, F. H.; DESJARDINS, C. Steroid hormones and aggressive behavior in mammals. **The Physiology of Aggression and Defeat**, v., n., p. 43-63, 1971.

BROOKS, T.; HANNAH, L.; DA FONSECA, G. A. B.; MITTERMEIER, R. A. Prioritizing hotspots, representing transitions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 12, Dec, p. 673-673, 2001.

BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; KONSTANT, W. R.; FLICK, P.; PILGRIM, J.; OLDFIELD, S.; MAGIN, G.; HILTON-TAYLOR, C. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. **Conservation Biology**, v. 16, n. 4, Aug, p. 909-923, 2002.

BROOM, D.; JOHNSON, K. **Stress and animal welfare**: London:Chapman and Hall. 1993

CAMPBELL, C. J. Copulatory behavior of free-ranging black-handed spider monkeys (Ateles geoffroyi). **American Journal of Physical Anthropology**, v., n., p. 47-47, 2001.

CAMPBELL, C. J.; SHIDELER, S. E.; TODD, H. E.; LASLEY, B. L. Fecal analysis of ovarian cycles in female black-handed spider monkeys (Ateles geoffroyi). **American Journal of Primatology**, v. 54, n. 2, Jun, p. 79-89, 2001.

CAVIGELLI, S. A.; PEREIRA, M. E. Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (Lemur catta). **Hormones and Behavior**, v. 37, n. 3, May, p. 246-255, 2000.

CHAOUI, N. J.; HASLER-GALLUSSER, S. Incomplete sexual suppression in Leontopithecus chrysomelas: A behavioural and hormonal study in a semi-natural environment. **Folia Primatologica**, v. 70, n. 1, Jan-Feb, p. 47-54, 1999.

CHAPMAN, C. A.; BALCOMB, S. R.; GILLESPIE, T. R.; SKORUPA, J. P.; STRUHSAKER, T. T. Long-term effects of logging on African primate communities: a 28-year comparison from Kibale National Park, Uganda. **Conservation Biology**, v. 14, n. 1, Feb, p. 207-217, 2000.

CLARKE, A.; MASON, W. A.; MOBERG, G. P. Differentia; behavioral and adrenocortical responses to stress among three macaque species. **American Journal of Primatology**, v. 14, n., p. 37-52, 1988.

CLARKE, A. S.; CZEKALA, N. M.; LINDBURG, D. G. Behavioral and adrenocortical responses of male cynomolgus and lion-tailed macaques to social stimulation and group formation. **Primates**, v. 36, n. 1, p. 41-56, 1995.

COCKREM, J. F. Conservation and behavioral neuroendocrinology. **Horm Behav**, v. 48, n. 4, Nov, p. 492-501, 2005.

COCKREM, J. F.; SEDDON, P. J. Annual cycle of sex steroids in the yellow-eyed penguin (Megadyptes antipodes) on south island, New Zealand. **Gen Comp Endocrinol**, v. 94, n. 1, Apr, p. 113-21, 1994.

COE, C. L.; LEVINE, S. Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in the squirrel monkey. **American Journal of Primatology**, v. 35, n., p. 283-292, 1995.

COE, C. L.; SMITH, E. R.; MENDOZA, S. P.; LEVINE, S. Varying influence of social status on hormone levels in male squirrel monkeys: Spectrum Publications 1983.

COIMBRA-FILHO, A. F. Conservation and use of south american primates in Brazil. **International Zoo Yearbook**, v. 12, n., p. 14-15, 1972.

COLES, R. C.; TALEBI, M. G. Spatial relations in wild southern muriquis (*Brachyteles arachnoides*): choices of nearest neighbour and proximity. . **Folia Primatologica 75**, v., n. Supplement (1) p. 365, 2004.

DA FONSECA, G. A. B.; GASCON, C.; STEININGER, M. K.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, R. A.; LACHER, T. E. A global experiment under way. **Science**, v. 295, n. 5561, Mar 8, p. 1835-1835, 2002.

DELITALA, G.; DEVILLA, L.; ARATA, L. Opiate receptors and anterior pituitary hormone secretion in man. Effect of naloxone infusion. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 97, n. 2, p. 150-6, 1981.

DESA, R. M. L.; POPE, T. R.; STRUHSAKER, T. T.; GLANDER, K. E. Sexual Dimorphism in Canine Length of Woolly Spider Monkeys (Brachyteles-Arachnoides, Geoffroy,E. 1806). **International Journal of Primatology**, v. 14, n. 5, Oct, p. 755-763, 1993.

DESJARDINS, C. Endocrine signaling and male reproduction. **Biology Reproduction**, v. 24, n., p. 1-21, 1981.

DIXSON, A. F.; PISSINATTI, A.; ANDERSON, M. J. Observations on genital morphology and anatomy of a hybrid male muriqui (Genus Brachyteles). **Folia Primatologica**, v. 75, n. 2, p. 61-69, 2004.

DOBSON, H.; GHUMAN, S.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. **Reproduction**, v. 125, n. 2, Feb, p. 151-163, 2003.

DUNBAR, R. I. M. Primate Social Systems. v., n., p., 1988.

EISENBERG, J. F.; MUCKENHIRN, N. A.; RUDRAN, R. The relation between ecology and social structure in primates. **Science**, v. 176, n. 4037, p. 863-874, 1972.

ELIA, M. Organ and tissue contribution to metabolic rate. **Energy Metabolism: Tissue Determinants and Cellular Corollaries**, v., n., p. 61-79, 1992.

ELIA, M.; LIVESEY, G. Energy expenditure and fuel selection in biological systems: the theory and practice of calculations based on indirect calorimetry and tracer methods. **World Review of Nutrition and Diet**, v. 70, n., p. 68-131, 1992.

ERWIN, J. Primate Conservation: Needs and Means. **American Journal of Primatology**, v. 2, n., p. 1-2, 1982.

ESPEY, L.; LIPNER, H. **The Physiology of Reproduction**. Raven, New York. 1994

FELDMAN, R. S.; GREEN, K. F. Antecedents to behavior fixations. **Psychology Review**, v. 74, n. 4, p. 250-71, 1967.

FUJITA, S.; MITSUNAGA, F.; SUGIURA, H.; SHIMIZU, K. Measurement of urinary and fecal steroid metabolites during the ovarian cycle in captive and wild Japanese macaques, Macaca fuscata. **American Journal of Primatology**, v. 53, n. 4, Apr, p. 167-176, 2001.

GESQUIERE, L. R.; ALTMANN, J.; KHAN, M. Z.; COURET, J.; YU, J. C.; ENDRES, C. S.; LYNCH, J. W.; OGOLA, P.; FOX, E. A.; ALBERTS, S. C.; WANGO, E. O. Coming of age: Steroid hormones of wild immature baboons (Papio cynocephalus). **American Journal of Primatology**, v. 67, n. 1, Sep, p. 83-100, 2005.

GILL, C.; RISSMANN, E. Female sexual behavior is inhibited by short- and long-term food restriction. . **Physiology and Behavior**, v. 61:, n., p. 387–394., 1997.

GINTHER, A. J.; ZIEGLER, T. E.; SNOWDON, C. T. Reproductive biology of captive male cottontop tamarin monkeys as a function of social environment. **Animal Behaviour**, v. 61, n. 1, p. 65-78, 2001.

GLICK, B. B. Male endocrine responses to females: effects of social cues in Cynomolgus macaques. **American Journal of Primatology**, v. 6, n., p. 229–39, 1984.

GOLDIZEN, A. W.; TERBORGH, J.; CORNEJO, F.; PORRAS, D. T.; EVANS, R. Seasonal Food Shortage, Weight Loss, and the Timing of Births in Saddle-Back Tamarins (Saguinus fuscicollis). **The Journal of Animal Ecology**, v. 57, n. 3, p. 893-901, 1988.

GONCHAROV, N. P.; TARANOV, A. G.; ANTONICHEV, A. V.; GORLUSHKIN, V. M.; ASO, T.; CEKAN, S. Z.; DICZFALUSY, E. Effect of Stress on the Profile of Plasma Steroids in Baboons (Papio Hamadryas). **Acta Endocrinologica**, v. 90, n. 2, p. 372-384, 1979.

GOY, R. W.; MCEWEN, B. S. **Sexual differentiation of the brain**: MIT Press Cambridge, Mass. 1980

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

GUIMARÃES, M. A. B. V. **Ciclo ovariano do macaco-prego (Cebus apella, LINNAEUS, 1758): técnicas de extração e dosagem de progestinas fecais e hormônio luteinizante urinário**. (Doutorado Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univesidade de São Paulo, São Paulo, 1999. 63 p.

HEISTERMANN, M.; KLEIS, E.; PROVE, E.; WOLTERS, H. J. Fertility Status, Dominance and Scent Marking behavior of family housed female cotton top tamarins ({ISaguinus oedipus}) in the absence of their mothers. **American Journal of Primatology**, v. 18, n. 3, p. 177-189, 1989.

HEISTERMANN, M.; MOHLE, U.; VERVAECKE, H.; VANELSACKER, L.; HODGES, J. K. Application of urinary and fecal steroid measurements for monitoring ovarian function and pregnancy in the bonobo (Pan paniscus) and evaluation of perineal swelling patterns in relation to endocrine events. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 4, Oct, p. 844-853, 1996.

HEISTERMANN, M.; PALME, R.; GANSWINDT, A. Comparison of different enzymeimmunoassays for assessment of adrenocortical activity in primates based on fecal analysis. **American Journal of Primatology**, v. 68, n. 3, p. 257-73, 2006.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J. K. Measurement of Fecal Steroids for Monitoring Ovarian-Function in New-World Primates, Callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 1, Sep, p. 243-251, 1993.

HERNANDEZ-LOPEZ, L.; MAYAGOITIA, L.; ESQUIVEL-LACROIX, C.; ROJAS-MAYA, S.; MONDRAGON-CEBALLOS, R. The menstrual cycle of the spider monkey (Ateles geoffroyi). **American Journal of Primatology**, v. 44, n. 3, p. 183-195, 1998.

HILEMAN, S. M.; PIERROZ, D. D.; FLIER, J. S. Leptin, nutrition, and reproduction: Timing is everything. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 2, Feb, p. 804-807, 2000.

HODGES, J. K. The ovarian cycle and control of ovulation. **Journal of Zoology**, v. v. 213, n., 1987, p. p. 383-393, 1987.

JOHNSON, E. O.; KAMILARIS, T. C.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Effect of Social Stress on Pituitary-Adrenal-Function in a Small Primate. **Clinical Research**, v. 38, n. 2, Apr, p. A528-A528, 1990.

KAREN L. BALES, L. A. P. C. S. C. Sex differences and developmental effects of manipulations of oxytocin on alloparenting and anxiety in prairie voles. **Developmental Psychobiology**, v. 44, n. 2, p. 123-131, 2004.

KLEIMAN, D. G. Criteria for evaluation of zoo reseaech projects. **Zoo Biology**, v. 4, n., p. 93-98, 1985.

KLEIMAN, D. G. Behavior research in Zoos.Past, Present, and future. **Zoo Biology**, v. 11, n., p. 301-312, 1992.

LANCASTER, J. B.; LEE, R. B. The annual reproductive cycle in monkeys and apes. **Primate Behavior**, v., n., p. 486-513, 1965.

LAWRENCE, A. B.; TERLOUW, E. M. **A review of behavioral factors involved in the development and continued performance of stereotypic behaviors in pigs.** New York, USA, p. 1993

LEE, P. C.; BOWMANN, J. E. Influence of ecology and energetics on primate mothers and infants. In: Motherhood in humans and nonhuman primates. **(Eds: Pryce CR; Martin RD; Skuse D) S.Karger, Basel**, v. Ittingen, 1994, n., p. 47-58, 1995.

LEE, P. C.; FOLEY, R. A. Ecological energetics and extinction of giant gelada baboons. In: JABLONSKY, N. G. (Ed.). **The rise and fall of a primate genus**. Great Britain: Cambridge University Press, 1993. Ecological energetics and extinction of giant gelada baboons, p.487-498

LEIGH, S. R.; JUNGERS, W. L. A Reevaluation of Subspecific Variation and Canine Dimorphism in Woolly Spider Monkeys (Brachyteles Arachnoides) - Brief Communication. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 95, n. 4, Dec, p. 435-442, 1994.

LINDBURG, D. G. Seasonality of reproduction in primates. **Comparative Primate Biology**, v. 2, n., p. 167–218, 1987.

LIPTRAP, R. M.; RAESIDE, J. I. Effect of cortisol on the response to gonadotrophin releasing hormone in the boar. **Journal of Endocrinology**, v. 97, n., p. 75–81, 1983.

LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E.; STRIER, K. B. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, Cebus apella nigritus. **Hormones and Behavior**, v. 41, n. 3, May, p. 275-287, 2002.

MALLAPUR, A. Managing primates in zoos: Lessons from animal behaviour. **Current Science**, v. 89, n. 7, p. 1214-1219, 2005.

MARRINER, L. M.; DRICKAMER, L. C. Factors influencing stereotyped behaviour of primates in a zoo. . **Zoo Biology**, v. 13 n., p. 267– 275. , 1994.

MARSHALL, A. J.; HOHMANN, G. BRIEF REPORT Urinary Testosterone Levels of Wild Male Bonobos (Pan paniscus) in the Lomako Forest, Democratic Republic of Congo. **American Naturalist**, v. 136, n., p. 829-846, 1990.

MASALA, A.; DELITALA, G.; ALAGNA, S.; DEVILLA, L.; ROVASIO, P. P.; BORRONI, G. Effect of synthetic LH-RH and hCG administration on plasma testosterone, androstenedione, and estradiol 17beta levels in normal men and in patients with idiopathic oligospermia. **Int J Fertil**, v. 24, n. 1, p. 71-3, 1979.

MASON, G. J. Stereotypies and Suffering. **Behavioural Processes**, v. 25, n. 2-3, Dec, p. 103-115, 1991.

MATSUMURO, M.; SANKAI, T.; CHO, F.; YOSHIKAWA, Y.; YOSHIDA, T. A two-step extraction method to measure fecal steroid hormones in female cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). **American Journal of Primatology**, v. 48, n. 4, p. 291-298, 1999.

MENDES, F. D. C. Spacing and social behavior in the muriqui *(Brachyteles arachnoides)* E GEOFFROY 1806). v., n., p., 1986.

MENDES, F. D. C. **Afiliação e hierarquia no muriqui:o grupo matão de Caratinga**. (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990. 112 p.

MENDOZA, S. P.; MASON, W. A. Breeding readiness in squirrel monkeys: female-primed females are triggered by males. **Physiol Behav**, v. 49, n. 3, p. 471-9, 1991.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticold metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 138, n. 3, Sep 15, p. 189-199, 2004.

MITTERMEIER, R. A.; VALLADARES-PADUA, C.; RYLANDS, A. B.; EUDEY, A. A.; BUTYNSKI, T. M.; GANZHORN, J. U.; KORMOS, R.; AGUIAR, J. M.; WALKER, S. Primates in peril: The world's 25 most Endangered primates, 2004-2006 **Primate Conservation**, v. 20, n., p. 1-28, 2006.

MITTERMEIER, R. A.; VALLE, C. M. C.; ALVES, M. C.; SANTOS, I. B.; PINTO, C. A. M.; STRIER, K. B.; YOUNG, A. L.; VEADO, E. M.; CONSTABLE, I. D.; PACCAGNELLA, S. G.; LEMOS DE SA, R. M. Current Distribution of the muriqui in the Atlantic Forest Region of Eastern Brazil. **Primate Conservation**, v. 08, n., p. 143-149, 1987.

MIYAMOTO, S.; CHEN, Y.; KUROTORI, H.; SANKAI, T.; YOSHIDA, T.; MACHIDA, T. Monitoring the reproductive status of female gorillas (Gorilla gorilla gorilla) by measuring the steroid hormones in fecal samples. **Primates**, v. 42, n. 4, Oct, p. 291-299, 2001.

MUEHLENBEIN, M. P.; WATTS, D. P.; WHITTEN, P. L. Dominance rank and fecal testosterone levels in adult male chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. **American Journal of Primatology**, v. 64, n. 1, p. 71-82, 2004.

MULLER, M. N.; WRANGHAM, R. W. Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the ' challenge hypothesis '. **Animal Behaviour**, v. 67, n., Jan, p. 113-123, 2004a.

MULLER, M. N.; WRANGHAM, R. W. Dominance, cortisol and stress in wild chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 55, n. 4, p. 332-340, 2004b.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, Feb 24, p. 853-858, 2000.

NEGRO-VILAR, A. Stress and other environmental factors affecting fertility in men and women: overview. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 2, p. 59-64, 1993.

NISHIMURA, A.; DA FONSECA, G. A. B.; MITTERMEIER, R. A.; YOUNG, A. L.; STRIER, K. B.; VALLE, C. M. C. The Muriqui, Genus *Brachyteles*. In: WWF (Ed.). **Ecology and Behavior of Neotropical Primates**, v.2, 1988. The Muriqui, Genus *Brachyteles*

O'NEILL, P. L. E. A. Normalizing laboratory-reared rhesus macaque (*Macaca mulatta*) behavior with exposure to complex outdoor enclosures. . **Zoo Biol.,**, v. 10 n., p. 237–245 1991.

OFTEDAL, O. T. **The comparative nutrition of new world primates.** National Zoo. Washington, D.C., p. 1995

OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrinological Review**, v. 17, n. 4, p. 369-84, 1996.

OSTNER, J.; KAPPELER, P. M.; HEISTERMANN, M. Seasonal variation and social correlates of androgen excretion in male redfronted lemurs (Eulemur fulvus rufus). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 52, n. 6, Nov, p. 485-495, 2002.

PACAGNELLA, S. G. Censo de População de Monos-Carvoeiro (*Brachyteles arachnoides)* no Parque Estadual de Carlos Botelho, Estado de São Paulo. In: BIODIVERSITAS., F. (Ed.). **A Primatologia no Brasil 3**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 1985. Censo de População de Monos-Carvoeiro (*Brachyteles arachnoides)* no Parque Estadual de Carlos Botelho, Estado de São Paulo., p.225-234

PERRET, M. Environmental and social determinants of sexual function in the male lesser mouse lemur (Microcebus murinus). **Folia Primatol (Basel)**, v. 59, n. 1, p. 1-25, 1992.

PISSINATTI, A.; COIMBRA-FILHO, A. C.; RYLANDS, A. B.; SANTOS, J. L. **Comportamento reprodutivo de (*Brachyteles arachnoides*) sob condições ex-situ (Ceboidea-Primates).** p. 1-20. 1994

POPE, T. R. Genetic variation in remnant populations of the woolly spider monkey (Brachyteles arachnoides). **International Journal of Primatology**, v. 19, n. 1, Feb, p. 95-109, 1998.

QUADAGNO, D. M.; BRISCOE, R.; QUADAGNO, J. S. Effect of perinatal gonadal hormones on selected nonsexual behavior patterns: a critical assessment of the nonhuman and human literature. **Psychological Bulletin**, v. 84, n. 1, p. 62-80, 1977.

RAY, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Styles of male social behavior and their endocrine correlates among high-ranking wild baboons. **American Journal of Primatology**, v. 28, n., p. 231-250, 1992.

RECABARREN, M. P.; VERGARA, M.; MARTIN, M. C.; GORDON, K.; SERÓN-FERRÉ, M. Impact of lactation upon fertility in the New World primate capuchin monkey (Cebus apella). **Journal of Medical Primatology**, v. 29, n., p. 350-360, 2000.

REINHARDT, V. E. A. Space requirement stipulations for caged nonhuman primates in the United States: a critical review. **Animal Welfare**, v., n., p. 361–372, 1996.

RIBEIRO, E. A. A. **Uma análise da relação entre o comportamento reprodutivo e os níveis de progestinas fecais em um grupo silvestre do mico-leão-dourado, Leotopithecus rosalia.** (Doutorado). Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994. 175 p.

RICHARD, A. F., Ed. **Primates in nature**. New York: W. H. Freeman, p.558ed.1985.

ROBBINS, M. M.; CZEKALA, N. M. AJP 334. **American Journal of Primatology**, v. 43, n., p. 51-64, 1997.

ROSENBERGER, A. L.; STRIER, K. B. Adaptive Radiation of the Ateline Primates. **Journal of Human Evolution**, v. 18, n. 7, Nov, p. 717-750, 1989.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRIGUEZLUNA, E. Conservation of neotropical primates: Threatened species and an analysis of primate diversity by country and region. **Folia Primatologica**, v. 68, n. 3-5, p. 134-160, 1997.

SANNEN, A.; VAN ELSACKER, L.; EENS, M.; HEISTERMANN, M. Urinary Testosterone Metabolite Levels in Captive Bonobos: Relationship with Age. **Folia Primatologica**, v. 75, n. 2, p. 107-110, 2004.

SANNEN, A.; VAN ELSACKER, L.; HEISTERMANN, M.; EENS, M. Urinary testosterone metabolite levels and aggressive behaviors in male and female Bonobos (Pan paniscus). **Aggressive Behavior**, v. 30, n. 5, p. 425-434, 2004.

SAPOLSKY, R. M. Endocrine aspects of social instability in the olive baboons ({IPapio anubis}). **American Journal of Primatology**, v. 5, n., p. 365-379, 1983.

SAPOLSKY, R. M. Stress, social status and reproductive physiology in free living baboons. In: PRENTICE-HALL, N. Y. (Ed.). **Psychobiology of Reproduction: An Evolutionary Perspective**, 1987. Stress, social status and reproductive physiology in free living baboons

SAPOLSKY, R. M. What do females want? **Natural History**, v. 110, n. 10, Dec-Jan, p. 18-21, 2001.

SAPOLSKY, R. M. The influence of social hierarchy on primate health. **Science**, v. 308, n. 5722, Apr 29, p. 648-652, 2005.

SAVAGE, A.; BAKER, A. J. Callitrichid social structure and mating system: Evidence from field studies - Introduction. **American Journal of Primatology**, v. 38, n. 1, p. 1-3, 1996.

SAVAGE, A.; LASLEY, B. L.; VECCHIO, A. J.; MILLER, A. E.; SHIDELER, S. E. Selected Aspects of Female White-Faced Saki (Pithecia-Pithecia) Reproductive-Biology in Captivity. **Zoo Biology**, v. 14, n. 5, p. 441-452, 1995.

SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. . **Vet Res Com** v. 25, n., p. 271-87, 2001.

SETCHELL, J. M.; DIXSON, A. F. Changes in the Secondary Sexual Adornments of Male Mandrills (Mandrillus sphinx) Are Associated with Gain and Loss of Alpha Status. **Hormones and Behavior**, v. 39, n. 3, p. 177-184, 2001.

SHIDELER, S. E.; GEE, N. A.; CHEN, J.; LASLEY, B. L. Estrogen and progesterone metabolites and follicle-stimulating hormone in the aged macaque female. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 6, Dec, p. 1718-1725, 2001.

SHIMIZU, K. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: Application of non-invasive methods. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, Feb, p. 1-13, 2005.

SMITH, S. M. Demand Behavior: A New Interpretation of Courtship Feeding. **The Condor**, v. 82, n. 3, p. 291-295, 1980.

STEKLIS, H. D.; RALEIGH, M. J.; KLING, A. S.; TACHIKI, K. Biochemical and hormonal correlates of dominance and social behavior in all-male groups of squirrel monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 11, n., p. 133–145, 1986.

STOOPS, M. A.; ANDERSON, G. B.; LASLEY, B. L.; SHIDELER, S. E. Use of fecal steroid metabolites to estimate the pregnancy rate of a free-ranging herd of tule elk. **Journal of Wildlife Management**, v. 63, n. 2, Apr, p. 561-569, 1999.

STRIER, K. B. **The behavior and ecology of the wooly spider monkey, or muriqui(*Brachyteles arachnnoides,* E Geoffroy 1806)**. (Dissertation). Harvard University, 1986. 352 p.

STRIER, K. B. Socioecology of Woolly Spider Monkeys, or Muriquis (Brachyteles-Arachnoides). **American Journal of Physical Anthropology**, v. 72, n. 2, Feb, p. 259-259, 1987.

STRIER, K. B. Diet in one group of wooly spider monkeys, or muriquis({IBrachyteles arachnoides}). **American Journal of Primatology**, v. 23, n., p. 113-126, 1991.

STRIER, K. B. Male reproductive strategies in new world primates. **Human Nature-an Interdisciplinary Biosocial Perspective**, v. 7, n. 2, p. 105-123, 1996.

STRIER, K. B. **Faces in the forest : the endangered muriqui monkeys of Brazil**. Cambridge, Mass.: Harvard University Press. 1999. xxxi, 138 p. p.

STRIER, K. B.; BOUBLI, J. P.; POSSAMAI, C. B.; MENDES, S. L. Population demography of Northern muriquis (Brachyteles hypoxanthus) at the Estacao Biologica de Caratinga/Reserva particular do Patrimonio Natural-Feliciano Miguel Abdala, Minas Gerais, Brazil. **AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY**, v., n., p. 000-000, 2006.

STRIER, K. B.; DIB, L. T.; FIGUEIRA, J. E. C. Social dynamics of male muriquis (Brachyteles arachnoides hypoxanthus). **Behaviour**, v. 139, n., Feb-Mar, p. 315-342, 2002.

STRIER, K. B.; MENDES, S. L.; SANTOS, R. R. Timing of births in sympatric brown howler monkeys (Alouatta fusca clamitans) and northern muriquis (Brachyteles arachnoides hypoxanthus). **American Journal of Primatology**, v. 55, n. 2, Oct, p. 87-100, 2001.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Insights into Ovarian-Function in Wild Muriqui Monkeys (Brachyteles Arachnoides). **American Journal of Primatology**, v. 32, n. 1, p. 31-40, 1994.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys, Brachyteles arachnoides. **American Journal of Primatology**, v. 42, n. 4, p. 299-310, 1997.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Lack of pubertal influences on female dispersal in muriqui monkeys, Brachyteles arachnoides. **Animal Behaviour**, v. 59, n., Apr, p. 849-860, 2000.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Variation in the resumption of cycling and conception by fecal androgen and estradiol levels in female Northern Muriquis (Brachyteles hypoxanthus). **Am J Primatol**, v. 67, n. 1, Sep, p. 69-81, 2005.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E.; WITTER, D. J. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild Male muriquis ({IBrachyteles arachnoides}). **Hormones and Behavior**, v. 35, n., p. 125-134, 1999.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E.; WITTWER, D. J. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (Brachyteles arachnoides). **Hormones and Behavior**, v. 35, n. 2, Apr, p. 125-134, 1999.

SUTER, D. E.; SCHWARTZ, N. B. Effects of glucocorticoids on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells in vitro. **Endocrinology**, v. 117, n. 3, p. 849-854, 1985.

TALEBI, M. Dietary strategies and digestive efficiency of the southern muriqui (Brachyteles arachnoides). **American Journal of Physical Anthropology**, v., n., p. 206-206, 2003.

TALEBI, M. **Factors affecting food choices and digestive efficiency of the critically endangered muriquis (Brachyteles arachnoides - PRIMATES- E. Geoffroy, 1806) of Brazilian Atlantic Forest.** . Biological Anthropology, University of Cambridge, UK, Cambridge, , 2005. 249 p.

TALEBI, M. Conservation research of southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) in São Paulo State, Brazil. . **Neotropical Primates**, v. no prelo n., p., no prelo.

TALEBI, M.; BASTOS, A.; LEE, P. C. Diet of southern muriquis in continuous Brazilian Atlantic Forest. **International Journal of Primatology**, v. 26, n. 5, Oct, p. 1175-1187, 2005.

TALEBI, M. G. The conservation of Southern Muriquis (*Brachyteles arachnoides* - PRIMATES, E. GEOFFROY, 1806) in São Paulo State, Brazil. . **Folia Primatologica 75** v., n. Supplement 1. , p. pp 209. , 2004.

TALEBI, M. G. Digesta passage time in Southern Muriquis (Brachyteles arachnoides, atelidae, PRIMATES). **American Journal of Physical Anthropology**, v., n., p. 174-174, 2006.

TARDIF, S. D.; POWER, M.; OFTEDAL, O. T.; POWER, R. A.; LAYNE, D. G. Lactation, maternal behavior and infant growth in common marmoset monkeys (Callithrix jacchus): effects of maternal size and litter size. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 51, n. 1, Dec, p. 17-25, 2001.

TREVES, A. Reproductive consequences of variation in the composition of howler monkey (Alouatta spp.) groups. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 50, n. 1, Jun, p. 61-71, 2001.

UDELSMAN, R.; CHROUSOS, G. P. Hormonal responses to surgical stress. **Advanced Experimental Medical Biology**, v. 245, n., p. 265-72, 1988.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U.; MILLSPAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. 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, Dec, p. 260-275, 2000.

WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D. E. Excretion Rates and Metabolites of Estradiol and Progesterone in Baboon (Papio-Cynocephalus-Cynocephalus) Feces. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 1, May, p. 213-220, 1994.

WASSER, S. K.; MONFORT, S. L.; WILDT, D. E. Rapid Extraction of Fecal Steroids for Measuring Reproductive Cyclicity and Early-Pregnancy in Free-Ranging Yellow Baboons (Papio-Cynocephalus-Cynocephalus). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, n. 2, Jul, p. 415-423, 1991.

WASSER, S. K.; SEWALL, G.; SOULES, M. R. Psychosocial Stress as a Cause of Infertility. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 3, Mar, p. 685-689, 1993.

WASSER, S. K.; STARLING, A. K. Proximate and Ultimate Causes of Reproductive Suppression among Female Yellow Baboons at Mikumi-National-Park, Tanzania. **American Journal of Primatology**, v. 16, n. 2, p. 97-121, 1988.

WASSER, S. K.; THOMAS, R.; NAIR, P. P.; GUIDRY, C.; SOUTHERS, J.; LUCAS, J.; WILDT, D. E.; MONFORT, S. L. Effects of Dietary Fiber on Fecal Steroid Measurements in Baboons (Papio-Cynocephalus-Cynocephalus). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, n. 2, Mar, p. 569-574, 1993.

WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone- behavior interactions. In: (Ed.). **Yearbook of Physical Anthropology, Vol 41 - 1998**. New York: WILEY-LISS INC, v.41, 1998. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions, p.1-23. (Yearbook of Physical Anthropology)

WILSON, E. O. The Future of Life. **Future**, v. 8, n. 9, p. 923, 2002.

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

YOUNG, K. M.; BROWN, J. L.; GOODROWE, K. L. Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (Mustela nigripes) by fecal hormone analysis. **Zoo Biology**, v. 20, n. 6, p. 517-536, 2001.

ZIEGLER, T.; HODGES, K.; WINKLER, P.; HEISTERMANN, M. Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female Hanuman langurs (Presbytis entellus). **American Journal of Primatology**, v. 51, n. 2, Jun, p. 119-134, 2000.

ZIEGLER, T. E.; MATTERI, R. L.; WEGNER, F. H. Detection of Urinary Gonadotropins in Callitrichid Monkeys with a Sensitive Immunoassay Based Upon a Unique Monoclonal-Antibody. **American Journal of Primatology**, v. 31, n. 3, p. 181-188, 1993.

ZIEGLER, T. E.; SANTOS, C. V.; PISSINATTI, A.; STRIER, K. B. Steroid excretion during the ovarian cycle in captive and wild muriquis, Brachyteles arachnoides. **American Journal of Primatology**, v. 42, n. 4, p. 311-321, 1997.

ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D. J.; SCHULTZDARKEN, N.; SNOWDON, C. T.; ABBOTT, D. H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, Saguinus oedipus and Callithrix jacchus, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, Jan, p. 91-99, 1996.

ZIEGLER, T. E.; WITTWER, D. J. Fecal steroid research in the field and laboratory: Improved methods for storage, transport, processing, and analysis. **American Journal of Primatology**, v. 67, n. 1, Sep, p. 159-174, 2005.

ZUK, M.; MCKEAN, K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. **International Journal of Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 1009-23, 1996.