UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

OLÍVIA DE MENDONÇA-FURTADO

Medidas de metabólitos de cortisol em macacos-prego

(Gênero *Sapajus*):

análise comparativa entre populações para investigação

de fatores estressores

São Paulo

2012

OLÍVIA DE MENDONÇA-FURTADO

Medidas de metabólitos de cortisol em macacos-prego (Gênero *Sapajus*):
análise comparativa entre populações para investigação de fatores estressores

(Versão original)

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de doutora em Psicologia

Área de concentração:
Psicologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra.
Patrícia Izar

São Paulo

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Furtado, Olívia de Mendonça.

Medidas de metabólitos de cortisol em macacos-prego (Gênero Sapajus): análise comparativa entre populações para investigação de fatores estressores. / Olívia de Mendonça Furtado; orientadora Patrícia Izar. -- São Paulo, 2012.

92 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Etologia animal 2. Análise do comportamento 3. Macaco-prego
4. Estresse 5. Cortisol 6. Psicologia comparada I. Título.

QL751

Nome: Mendonça-Furtado, Olívia de

Título: Medidas de metabólitos de cortisol em macacos-prego (Gênero *Sapajus*): análise comparativa entre populações para investigação de fatores estressores

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
doutora em Psicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.....

Instituição:.....Assinatura:.....

Prof. Dr.....

Instituição:.....Assinatura:.....

Prof. Dr.....

Instituição:.....Assinatura:.....

Prof. Dr.....

Instituição:.....Assinatura:.....

Prof. Dr.....

Instituição:.....Assinatura:.....

“(...)e do caos nascem estrelas.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À professora Patrícia Izar pela orientação paciente e incentivadora.

À Gi(sele Zago) pela ajuda inestimável com as burocracias da vida acadêmica e pelo companheirismo.

À equipe do CETAS-PB: Dr. Paulo, Michele, Mércia, Ronny, Adair, Hércules, Aluilson, Zé, Dinho, pela grande vontade de ajudar, pelo profissionalismo, pela paciência e pelos muitos ensinamentos na lida com animais cativos.

À minha tia Sônia e minha avó pelo alojamento de primeira, caronas, marmitas fresquinhas, internet, geladeira, enfim, pelo apoio logístico e emocional durante os muitos dias de experimentos em João Pessoa.

À minha família e amigos pelo incentivo e pela compreensão nas repetidas ausências.

Ao Lico, pelo apoio logístico e emocional, pelo incentivo, pelas revisões e discussões, por me entender, por existir.

À toda equipe do Laboratório de Endocrinologia Comportamental da Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Profa. Maria Bernardete Cordeiro, por me receber em seu laboratório, confiando em minha capacidade de conduzir as análises; Luiz Carlos, por me ensinar o Bê-a-Bá do EIA; Edilma, pela paciência com as centenas de amostras; Eliane, pela imensa ajuda com pesagens e afins; Hélderes, pela disponibilidade e paciência com minhas muitas dúvidas; Patrícia, por dividir as angústias e dúvidas; Renata Ferreira, pela companhia e transporte de amostra; Victor, pela amizade, por fazer a vida mais divertida, por me manter hidratada e por fazer muito mais do que deveria.

Aos professores Fernando Ribeiro Gomes e Marie Odile Chelini pelas sugestões e comentários proveitosos e pelo encorajamento em minha banca de qualificação.

Aos estagiários que estiveram comigo na luta por todas as amostras possíveis: Peneira, Anna, Taty, Wagner, obrigada por cada uma delas!

Aos assistentes de campo pela companhia nas muitas horas de mato, pelas conversas divertidas e pelo imenso esforço na coleta de dados: Eraldo, Júnior, Renato, Marcos, Josimar.

Ao (Marcos) Tokuda pela ajuda com a coleta de dados e por dividir as responsabilidades e angústias do campo.

À equipe do Parque Estadual Carlos Botelho: Diretor José Luiz Maia, Natanael, Nerci, Douglas e ao Instituto Florestal, pelo incentivo e apoio.

Aos colegas do Parque Ecológico do Tietê: Mari Lee, Marília, Bianca e Mari Nagy pela ajuda com o reconhecimento dos animais e coleta de amostras.

Ao Luiz, por cuidar de uma parte importante da coleta de dados para mim. Por garantir que minhas amostras fossem coletadas, refrigeradas e transportadas seguramente, diversas vezes. E pelos inesquecíveis momentos compartilhados nesta trajetória.

À toda família M, pelo acolhimento, pelos momentos de descontração e principalmente, por se importarem.

À equipe do Laboratório de Dosagens Hormonais da Universidade de Medicina Veterinária de Viena: Professor Rupert Palme, por me estender a mão diversas vezes e abrir as portas de seu laboratório para mim, garantindo que este trabalho chegasse ao fim; Professor Enrch Möstle pelas discussões na hora do almoço; Edith, por toda a competência, presteza e paciência; Marie e Nastasjha, pela ajuda com a res-suspensão e organização das amostras, pela companhia e pelo interesse; Michael, Omer e Nino, pelas conversas fisiológicas e comportamentais; Sonja, Samir, Monika, Cristina, Mariane pelo apoio no laboratório.

Às minhas estagiárias de laboratório: Mari Xá, Meiry, Júlia e Confetti (sim, de novo!) sem as quais este trabalho só seria concluído em 2025. Obrigada, meninas, vocês foram demais!

Aos colegas de laboratório: Mari Dutra, Lucas, Caio, Michele, Camila, Zé, Bia, Tiago, Irene, Marcelo, pela companhia em muitos cafés e cervejas regados a etologia e risadas.

À equipe estatística do IP/USP: Prof. Dr. José Siqueira, Agatha e Luiz pela paciência e persistência.

À Fapesp pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1. Desafio de ACTH e dexametasona.....	7
3.1.1 Local de estudo.....	7
3.1.2 Sujeitos.....	8
3.1.3 Procedimentos.....	8
3.1.3.1 Grupos experimentais.....	8
3.1.3.2 Cronograma experimental.....	9
3.1.3.3 Coleta de fezes.....	10
3.1.4 Análise dos dados.....	11
3.2 CLAE.....	11
3.2.1 Sujeitos.....	12
3.2.2 Procedimentos.....	12
3.3 Determinação de Níveis Basais de MFGs de Populações Selvagens e Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais.....	13
3.3.1 Áreas de estudo.....	13
3.3.2 Descrição dos grupos estudados.....	19
3.3.3 Procedimentos.....	23
3.3.3.1 Coleta de dados comportamentais.....	24
3.3.3.2 Coleta das amostras fecais.....	25
3.3.3.3 Extração.....	25
3.3.3.4 EIA.....	25

3.3.4 Análise dos dados.....	26
3.3.4.1 <i>Formas de calcular o nível basal</i>	26
3.3.4.1.1 <i>Retirada de outliers selvagens (método 1)</i>	27
3.3.4.1.2 <i>Retirada de outliers (método 2)</i>	27
3.3.4.1.3 <i>Mediana (método 3)</i>	28
3.3.4.2 <i>Determinação de Níveis Basais e Correlação entre MFGs e Fatores Ambientais e Comportamentais</i>	28
3.3.4.2.1 <i>Efeitos de fatores ambientais</i>	28
3.3.4.2.2 <i>Efeito de fatores comportamentais</i>	28
3.3.4.2.3 <i>Análises estatísticas</i>	29
3.3.4.3 <i>Análises individuais</i>	30
4. RESULTADOS	32
4.1 Validação Fisiológica do Método de Extração e Dosagem Hormonal	32
4.1.1. Desafio de ACTH e Dexametasona.....	32
4.1.2. CLAE.....	47
4.2 Determinação de Níveis Basais de MFGs de Populações Selvagens e Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais	49
4.2.1 Determinação de Níveis Basais.....	49
4.2.1.2 <i>Formas de se calcular o nível basal</i>	49
4.2.1.2.1 <i>Retirada de outliers selvagens (método 1)</i>	49
4.2.1.2.2 <i>Retirada de outliers (método 2)</i>	50
4.2.1.2.3 <i>Mediana (método 3)</i>	51
4.2.1.2.4 <i>Comparação entre os métodos</i>	52
4.2.2 <i>Diferenças entre populações</i>	54
4.2.3 <i>Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais</i>	55
4.2.3.1 <i>Padrão climático</i>	55
4.2.3.2 <i>Disponibilidade de alimento</i>	58
4.2.3.3 <i>Taxas Comportamentais</i>	60
4.2.4 <i>Análises individuais</i>	68
5. DISCUSSÃO	74
5.1 Validação Fisiológica do Método de Extração e Dosagem Hormonal	74

5.1.1 Desafio de ACTH e Dexametasona.....	74
5.1.2 CLAE.....	76
5.2 Determinação de Níveis Basais de MFGs de Populações Selvagens e Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais.....	77
5.2.1 Determinação de Níveis Basais.....	77
5.2.2 Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais.....	78
5.2.3 Análises Individuais.....	81
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Relação dos sujeitos que participaram do experimento de validação do protocolo laboratorial de extração e dosagem hormonal, apontando sexo, peso, tratamento recebido, quantidade de fármaco injetado e ordem da injeção.
- Tabela 2: Relação dos indivíduos do grupo Chicão durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários. O sinal ∞ indica nascimento, + indica óbito ou desaparecimento.
- Tabela 3: Relação dos indivíduos do grupo Zangado durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários. O sinal ∞ indica nascimento, + indica óbito ou desaparecimento.
- Tabela 4: Relação dos indivíduos do grupo Pimenta 1 durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários.
- Tabela 5: Relação dos indivíduos do grupo Testa durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários.
- Tabela 6: Síntese dos resultados dos desafios de ACTH e dexametasona realizado com treze macacos-prego (*S. libidinosus*) no CETAS de João Pessoa-PB, organizados de acordo com sexo e tratamento recebido.
- Tabela 7: Valores basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) calculados pelo método de retirada dos *outliers* selvagens. Os dados são apresentados para as classes sexo/etárias dos diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV), bem como valores médios calculados para cada grupo e população.
- Tabela 8: Valores basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) calculados pelo método de retirada dos *outliers*. Os dados são apresentados para as classes sexo/etárias dos diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV), bem como valores médios calculados para cada grupo e população.
- Tabela 9: Valores basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) calculados pelo método da mediana. Os dados são apresentados para as classes sexo/etárias dos diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV), bem como medianas calculadas para cada grupo e população.

Tabela 10: Correlações de Spearman entre os diferentes métodos de determinação de níveis basais de MFGs. Método 1: retirada de *outliers* selvagens; método 2: retirada de *outliers*; método 3: determinação da mediana. O valor de p em negrito é considerado significativo ao nível de 5%.

Tabela 11: Correlações de Spearman entre os diferentes métodos de determinação de níveis basais de MFGs sem os dados referentes ao grupo Zangado (FBV). Método 1: retirada de *outliers* selvagens; método 2: retirada de *outliers*; método 3: determinação da mediana. O valor de p em negrito é considerado significativo ao nível de 5%.

Tabela 12: Outliers selvagens dos indivíduos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV) e respectivos eventos relacionados a eles. Os sujeitos encontram-se agrupados de acordo com o grupo ao qual pertencem (Benjamin e Testa são os grupos do PECB e Zangado e Chicão pertencem a FBV). Os outliers selvagens estão descritos através do número da amostra de fezes ao qual correspondem, data e horário de coleta da mesma. Sempre que possível o horário do evento foi apresentado. Os traços indicam a inexistência de outliers selvagens ou de eventos relacionados a estes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Temperaturas médias, máximas e mínimas (oC) e pluviosidade (mm de chuva) no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB). Os dados de temperatura e pluviosidade foram cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). O ponto de coleta desses dados foi no município de São Miguel Arcanjo (na latitude: -23.8516°, longitude: -48.1645°, altitude: 644.00 metros). A ausência de dados nos meses de julho, agosto e setembro de 2010 deve-se a problemas que o INMET define como: avarias nos equipamentos, falta de registro na estação convencional e na estação automática e problemas nos sensores ou sinal de satélite

Figura 2: Biomassa estimada de frutos e invertebrados no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 para o Parque Estadual Carlos Botelho. A oferta mensal de frutos maduros foi medida utilizando coletores de frutos (bandejas de alumínio de 25 x 16,5cm). A oferta de insetos foi medida através de armadilhas pitfall (copos descartáveis de plástico preenchidos com água enterrados no solo). Ambos

estavam dispostos em 170 pontos sorteados ao longo de trilhas (1 m de distância lateral) dentro da área de uso do grupo estudado. O número de armadilhas em cada cota de altitude foi proporcional à sua área dentro da área de vida dos animais. As armadilhas eram esvaziadas a cada quinze dias e tinham a massa de frutos (bandejas) ou invertebrados (copos) que continham medida. O cálculo da biomassa foi realizado com base em uma extrapolação deste valor, sendo expresso em termos de Kg/Ha. A área amostrada pelas armadilhas resulta da área superficial de cada armadilha multiplicada pelo número de armadilhas válidas a cada coleta (quando uma armadilha está danificada, de forma que a coleta é impedida ou reduzida, ela é descartada naquela amostragem, substituída, e incluída na próxima coleta).

Figura 3: Temperaturas médias, máximas e mínimas (oC) e pluviosidade (mm de chuva) no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 na Fazenda Boa Vista (FBV). Obs: não havia pesquisa sendo desenvolvida entre maio e setembro de 2008 na FBV. Os dados de temperatura foram adquiridos com o auxílio de um termômetro digital e um pluviômetro, instalados na base de pesquisa instalada no local.

Figura 4: Biomassa de frutos (A) e invertebrados (B) para a Fazenda Boa Vista, de janeiro de 2008 a outubro 2010. A oferta mensal de frutos foi medida utilizando coletores redondos confeccionados com tela e arame, com área de 47,12 cm², fixadas a árvores e estacas no local de coleta. A oferta de insetos foi medida através de armadilhas pitfall (utilizando garrafas PET como recipientes). Ambos estavam distribuídos em 100 pontos sorteados ao longo de uma trilha de 3 km (1 m de distância lateral) dentro da área de uso dos grupos estudados, a uma distância mínima de 30 m entre cada coletor. O número de armadilhas em cada fisionomia de vegetação foi proporcional à sua área dentro da área de vida dos animais. As armadilhas eram esvaziadas a cada quinze dias e tinham a massa de frutos (coletores) ou invertebrados (garrafas PET) medida. O cálculo da biomassa foi realizado do mesmo modo que no PECB.

Figura 5: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos três sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) machos que foram submetidos ao desafio de ACTH no CETAS-PB. A: Barba Ruiva; B: Elvis; C: Neném. As setas vermelhas indicam o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de ACTH. As setas pretas indicam o pico subsequente de MFGs.

Figura 6: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos dois sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) fêmeas que foram submetidos ao desafio de

ACTH no CETAS-PB. A: Eva; B: Loira. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de ACTH. As setas pretas indicam o pico subsequente de MFGs. O asterisco indica o pico associado ao evento externo [vocalizações de atrito em um dos grupos de macacos-prego (*S. flavius*) alojados no CETAS-PB; ver detalhes no texto].

Figura 7: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos três sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) machos que foram submetidos ao desafio de dexametasona no CETAS-PB. A: Fernandinho; B: Moreno; C: Prince. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de dexametasona. Início da supressão hormonal, causada pela dexametasona, indicado pela seta preta.

Figura 8: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos dois sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) fêmeas que foram submetidos ao desafio de dexametasona no CETAS-PB. A: Ciça; B: Dona. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de dexametasona. Início da supressão hormonal, causada pela dexametasona, indicado pela seta preta. Os asteriscos indicam os picos associados ao evento externo [vocalizações de atrito em um dos grupos de macacos-prego (*S. flavius*) alojados no CETAS-PB; ver detalhes no texto].

Figura 9: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos dois sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) machos que foram submetidos à condição controle no CETAS-PB. A: Brad; B: Negão. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de solução salina. A seta preta indica o pico subsequente de MFGs.

Figura 10: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra do sujeito de macaco-prego (*S. libidinosus*) fêmea (Bia) que foi submetido à condição controle no CETAS-PB. A seta vermelha indica o momento em que o sujeito foi contido e recebeu a injeção de solução salina. O asterisco indica o pico associado ao evento externo [vocalizações de atrito em um dos grupos de macacos-prego (*S. flavius*) alojados no CETAS-PB; ver detalhes no texto].

Figura 11: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de três macacos-prego (*S. libidinosus*) machos submetidos à injeção de ACTH, em cada um dos horários em que

houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (22/out); no dia das injeções (23/out) e um dia após as injeções (24/out). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção. Os asteriscos indicam os picos associados à injeção de ACTH.

Figura 12: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de três macacos-prego (*S. libdinossus*) machos submetidos à injeção de dexametasona, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (22/out); no dia das injeções (23/out) e um dia após as injeções (24/out). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

Figura 13: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinossus*) machos submetidos à injeção de solução salina, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (22/out); no dia das injeções (23/out) e um dia após as injeções (24/out). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção

Figura 14: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinossus*) fêmeas submetidas à injeção de ACTH, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (25/fev); no dia das injeções (26/fev) e um dia após as injeções (27/fev). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção. Os asteriscos indicam os picos associados à injeção de ACTH. A seta indica o horário da injeção

Figura 15: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinossus*) fêmeas submetidas à injeção de dexametasona, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (25/fev); no dia das injeções (26/fev) e um dia após as injeções (27/fev). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

Figura 16: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinossus*) fêmeas submetidas à injeção de solução salina, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (25/fev); no dia das injeções (26/fev) e um dia após as injeções (27/fev). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

- Figura 17: Separação dos MFG de *S. libidinosus* e *S. nigritus*, por CLAE de fase reversa. Com determinação de imunorreatividade por EIA. A: fêmeas e B: machos. As frações marcadas com o triângulo aberto representam o tempo de eluição dos padrões (cortisol e corticosterona).
- Figura 18: Valores basais calculados pelos três métodos mencionados no texto (método 1 – retirada de *outliers* selvagens; método 2 – retirada de *outliers*; método 3 – mediana). Os dados são apresentados para os diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV)(em cinza), bem como médias populacionais (em preto).
- Figura 19: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a pluviosidade mensal em ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).
- Figura 20: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) da população de macacos-prego (*S. libidinosus*) da FBV - PI, bem como a temperatura máxima atingida em cada mês nesta área de estudo, ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10). As barras ao fundo em tons de cinza mostram as duas estações do ano (seca: cinza claro; chuvosa: cinza escuro).
- Figura 21: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) da população de macacos-prego (*S. nigritus*) do PECB - SP, bem como a temperatura mínima atingida em cada mês nesta área de estudo, ao longo de dezoito meses (jan/09 a jun/10). As barras ao fundo em tons de cinza mostram as duas estações do ano (inverno: cinza claro; verão: cinza escuro).
- Figura 22: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a biomassa mensal de invertebrados em ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).
- Figura 23: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a biomassa mensal de frutos em ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).

Figura 24: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de interações agonísticas entre os integrantes de cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).

Figura 25: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de interações agonísticas entre os grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10)

Figura 26: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de encontro com predadores de cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10)

Figura 27: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (quantidade de fêmeas em período proceptivo X quantidade de dias/mês) de fêmeas em período proceptivo em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10)

Figura 28: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de outros eventos estressantes em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).

Figura 29: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de vocalizações de alarme de cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).

Figura 30: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de cópulas em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).

Figura 31: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de encontros com outras espécies em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 à dez/10).

MENDONÇA-FURTADO, O. DE Medidas de metabólitos de cortisol em macacos-prego (Gênero *Sapajus*): análise comparativa entre populações para investigação de fatores estressores. 2012. 92 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Estudos da fisiologia do estresse são de fundamental importância para a área de endocrinologia comportamental e para projetos visando à promoção do bem estar de animais cativos. Esses estudos, quando feitos com animais de vida-livre, possibilitam investigar quais estímulos ambientais ou sociais são estressores para o táxon estudado. Pouco se sabe a este respeito sobre macacos-prego (gênero *Sapajus*), um primata neotropical muito comum em zoológicos, criadouros e outras situações de cativeiro. Uma maior compreensão dos agentes estressores neste gênero pode contribuir para o bem estar de sujeitos cativos. Frente a isso, este trabalho objetivou: 1) investigar, a partir da variação dos níveis de glicocorticóides (GCs; hormônios ligados ao estresse), quais eventos ambientais e comportamentais são percebidos por macacos-prego selvagens como estressantes; 2) verificar a possibilidade de definir valores de referência de níveis aceitáveis (nível basal) de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs – a mensuração de GCs a partir de fezes permite avaliar estes hormônios de forma não-invasiva) para o gênero *Sapajus*; e 3) validar o protocolo experimental de extração e dosagem de hormônios fecais. Em relação aos dois primeiros objetivos, foram tomadas medidas de metabólitos fecais de glicocorticóides, e de dados ambientais e comportamentais de duas populações selvagens, uma do Parque Estadual Carlos Botelho/São Paulo (PECB) e outra da Fazenda Boa Vista/Piauí (FBV). Para a validação do protocolo experimental, foi realizado um desafio de ACTH e dexametasona com macacos-prego cativos. Análises por modelo linear generalizado misto (MLGM) mostraram diferença significativa entre os níveis basais de MFGs das duas populações estudadas, sendo maiores na população da FBV. Para esta população, foi encontrado efeito de oferta de frutos no habitat, de frequência de encontros com outras espécies animais e de cópulas, sobre a variação mensal dos níveis basais de MFGs. Para a população do PECB, nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito significativo sobre a variação mensal dos níveis basais de MFGs. Já as análises individuais mostraram que interações agonísticas entre membros do grupo foram os maiores causadores de picos de MFGs nos sujeitos estudados, seguidos por fêmeas em período proceptivo e cópulas, que causaram picos não só em machos adultos, mas também em machos juvenis e nas próprias fêmeas. Os resultados do desafio de ACTH e de dexametasona validaram o protocolo experimental de extração e dosagem hormonal. Os resultados obtidos estão de acordo com pesquisas anteriores que revelaram diferenças marcantes no sistema social das duas populações, especialmente no que se refere às relações sociais de fêmeas, de acordo com as diferenças ecológicas entre as duas áreas. Além disso, sugerem que não é possível definir valores de referência de nível basal de MFGs para o gênero *Sapajus*, já que as duas populações diferem significativamente quanto a este aspecto. A partir deste trabalho, que é apenas o começo de uma longa jornada para a compreensão do estresse em macacos-prego selvagens, começa-se a entender quais são os estressores naturais destes animais e como eles impactam os níveis de MFGs.

Palavras-chave: comportamento, estresse, glicocorticóide, validação, nível basal

MENDONÇA-FURTADO, O. DE Measures of cortisol metabolites in capuchin monkeys (*Sapajus* genus): a comparative analysis between wild populations to investigate stressors. 2012. 92 f. Doctoral thesis presented to the Psychology Institute, São Paulo University, São Paulo, 2012.

Stress physiology studies are of fundamental importance for the area of behavioral endocrinology and for projects that aim to promote the wellbeing of captive animals. When the subjects of those researches are wild animals, it is possible to investigate which environmental or social stimuli constitute stressors for this taxon. Little is known in this regard about capuchin monkeys (*Sapajus* genus), a neotropical primate that are constantly kept in zoos, breeders and others captive environments. A better comprehension of the stressors' agents in this genus can contribute for the wellbeing of those captive individuals. Therefore this study aimed: 1) to investigate through the variation of glucocorticoids levels (GCs – hormones related to stress), which environmental and behavioral events are perceived by wild capuchin monkeys as stressful; 2) access the possibility of defining basal fecal glucocorticoids metabolites levels (MFGs – measuring GCs in feces is a non-invasive form of evaluate those hormones), as reference values, for the *Sapajus* genus; and 3) validate the experimental protocol of fecal hormones extraction and dosage. For the first two objectives, measures of fecal glucocorticoids metabolites, behavioral and environmental data of two wild populations of capuchin monkeys were taken. One in the Carlos Botelho State Park/São Paulo (PECB) and the other in Boa Vista's Farm/Piauí (FBV). For the experimental protocol validation an ACTH and dexamethasone challenge was executed with captive capuchin monkeys. Generalized Linear Mixed Model's (MLGM) analysis showed a significant difference between basal levels of MFGs of the two populations, being the FBV the one with higher values. For that population there was also an effect of fruit availability in the habitat, frequency of encounters with other animal's species and copulations in the mensal variation of the MFGs basal levels. There was no significant effect of the studied variables in the mensal basal levels variation of MFGs in the PECB population. The individual analyses showed that agonistic interactions among group members were the major cause of MFGs' peaks in the studied subjects. Other major factors were females in proceptive period and copulations, that caused peaks not only in adult males, but also in juvenile males and the females themselves. The ACTH and dexamethasone challenge results validated the experimental protocol of hormones extraction and dosage. The obtained results are in agreement with previous researches that reveled marked differences in the social system of the two populations, specially in females social relationships that varied in accordance with the two area's ecological differences. The results also suggested that it is not possible to define reference values of MFGs' basal levels for the *Sapajus* genus once the two populations are significantly different in this aspect. This work is just the beginning of a long endeavor to comprehend stress in wild capuchin monkeys, nevertheless it presents the first glimpse to the understanding of the natural stressors for those animals and how they impact the MFGs' levels.

Keywords: behavior, stress, glucocorticoids, validation, basal level

1 INTRODUÇÃO

O estudo das disfunções do sistema nervoso central relacionadas ao estresse teve início quando Hans Selye (1936), estudando a reação de ratos a um extrato químico, encontrou mudanças significativas tanto no grupo controle, que recebia injeções com solução salina, quanto nos sujeitos que recebiam injeções com a substância testada: úlcera péptica, atrofia de tecidos do sistema imune e aumento das glândulas adrenais. Selye propôs que os ratos de ambos os grupos estariam apresentando uma resposta fisiológica para um evento desagradável comum: as inúmeras injeções às quais estavam submetidos. Ele passou, então, a testar sua hipótese de que eventos desagradáveis (estressores) causavam reações fisiológicas e, para tanto, submeteu ratos a situações que ele chamou estressantes: mantendo-os em ambientes muito frios ou muito quentes, ou expondo-os a patógenos, toxinas ou ruídos muito altos. Esses ratos apresentaram a mesma sintomatologia que os primeiros animais estudados.

A resposta fisiológica aos estressores é chamada resposta estressora, e pode ser desencadeada tanto por um estímulo real (estressor físico), quanto pela mera expectativa de que este estímulo venha a ocorrer (estressor psicológico). É basicamente uma reação de “luta ou fuga”, conseguida pela ativação do sistema nervoso simpático e inibição do sistema nervoso parassimpático. Tal modificação na ação destes dois sistemas faz com que a glicose que se encontra armazenada no corpo seja mobilizada e o sangue seja desviado de órgãos que não são necessários para atividades físicas (como pele e intestinos), para órgãos que são cruciais para lutar ou fugir (coração, músculos esqueléticos e cérebro). O redirecionamento do fluxo sanguíneo é conseguido pela constrição de certas veias e a dilatação de outras, bem como pelo aumento do débito cardíaco. A cognição é aguçada e a percepção de dor entorpecida. Atividades fisiológicas que não apresentam benefício imediato, como crescimento, reprodução, inflamação e digestão, também são inibidas (Sapolsky, 1990). Já a mobilização da glicose ocorre devido ao efeito catabólico do cortisol, e o efeito antagônico que este hormônio apresenta sobre a insulina permite que uma grande quantidade de açúcares circule pelo corpo.

Essa cadeia de eventos fisiológicos que se segue em resposta aos eventos desagradáveis é desencadeada pelo hipotálamo, que produz o fator liberador de corticotrofina (CRF - do inglês corticotropin release factor). O CRF estimula a hipófise a liberar mais hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês adrenocorticotrophic hormone), que, por sua vez, age sobre as glândulas supra-renais, estimulando-as a liberar glicocorticóides (GCs). Esses são uma categoria de hormônios que constitui o principal indicador de resposta ao estresse (Möstl & Palme, 2002).

As respostas fisiológicas até aqui citadas se referem a um estressor agudo. Por outro lado, a ativação crônica da resposta estressora pode prejudicar a saúde de um animal de várias maneiras: se a glicose é constantemente mobilizada (catabolizada), ao invés de ser armazenada, o tecido muscular esquelético saudável atrofia e há fadiga; a resistência prolongada à insulina leva à diminuição da resposta corpórea a este hormônio; em algum tempo as mudanças cardiovasculares promovem hipertensão, que pode danificar o coração, as veias e os rins; a função do sistema imune é diminuída, bem como a fertilidade. Porém, mesmo sendo prejudicial se ativada cronicamente, poucos indivíduos poderiam viver muito tempo se seus corpos fossem incapazes de evocar tal resposta, pois ela permite que o organismo resista a ameaças imediatas à sua homeostase (Sapolsky, 1990; Boere, 2002).

Os fatores que podem levar a uma resposta estressora são muitos e podem ser didaticamente divididos em três classes: estressores físicos, psicológicos e sociais (Abbott et al., 2003). Os estressores físicos são, por exemplo, disponibilidade de alimento e esforço necessário para consegui-lo, exposição a patógenos, risco de predação, incidência de encontros agressivos e injúrias, condições climáticas severas. Estes se tornam ainda mais intensos se os sujeitos não puderem prever ou controlar o momento, a duração, ou a intensidade em que ocorrem. Essa falta de previsibilidade e controle é a base dos estressores psicológicos. Assim, controlar ou poder prever quando se tem acesso a recursos, conseguir estabelecer relações sociais estáveis e, portanto, previsíveis e conseguir controlar ou prever quando se está sujeito a agressões, seriam formas de minimizar os estressores psicológicos. Por último, animais sociais estão sujeitos a mais uma classe de estressores, os sociais. Estes englobam os demais uma vez que a vida em grupo traz consequências para aquisição e acesso a recursos, exposição a patógenos, risco de predação, incidência de

encontros agressivos. Assim, a diferença de acesso ao contato social, à catação, a corte e/ou cópula, relaciona-se a diferenças nos níveis de estresse dos sujeitos.

O aprofundamento da compreensão da fisiologia do estresse e, por consequência, do funcionamento dos glicocorticóides, levou à utilização da medida destes hormônios como indicativo de bem-estar (Schapiro et al., 1993; Boinsky et al., 1999), de dominância (Robbins & Czekala, 1997; Bales et al., 2006) e, mais recentemente, em pesquisas de ecologia, como indicativos de pressão seletiva (Pride, 2005; Künzl et al., 2003). Esses estudos se baseiam na premissa de que eventos estressantes levam a alterações fisiológicas desencadeadas por hormônios glicocorticóides, assim, deveríamos encontrar um pico destes hormônios, na circulação sanguínea do animal, toda vez que ele fosse submetido a eventos estressantes.

Muitos estudos, no entanto, não encontraram a correlação esperada entre pico de glicocorticóides e a ocorrência de eventos estressores (ausência de correlação entre dados hormonais e comportamentais - Schapiro et al., 1993; Elder & Menzel, 2001; ausência de diferenças significativas quanto à posição social – Bales et al., 2006; Robbins & Czekala, 1997; Anestis, 2005; Stavisky et al., 2001; maturidade sexual – Strauss et al., 2007; interações agonísticas - Pride, 2005; Weingrill et al., 2004; estações do ano – Ahrens et al., 2005).

Assim como os trabalhos acima citados, em pesquisa anterior (Mendonça-Furtado, 2006) não confirmei empiricamente as expectativas teóricas para a correlação entre glicocorticóides e eventos estressantes. Realizei (Mendonça-Furtado, 2006) realizou um estudo em que foram coletados dados comportamentais e hormonais (metabólitos fecais de glicocorticóides - MFG) de macacos-prego cativos, por aproximadamente oito meses, alterando o ambiente em que estes animais se encontravam com a inserção de artefatos que se esperava serem enriquecimentos ambientais. Neste estudo supunha que os animais estavam sob forte estresse por estarem alojados sozinhos, isolados de qualquer contato social com co-específicos. A expectativa era que os artefatos, por mais simples que fossem, provocariam um enriquecimento no ambiente destes sujeitos e, portanto, uma diminuição nos níveis de GCs. No entanto, os resultados obtidos não corroboraram a previsão. Apesar de realizar medidas sequenciais, encontrei pouca variação nos valores de metabólitos fecais de glicocorticóides ao longo do experimento. A única correlação que foi encontrada entre

os valores hormonais e os dados comportamentais foi o oposto do previsto. Um dos sujeitos apresentou uma correlação inversa entre um comportamento estereotipado (supostamente apresentado quando o animal se encontra sob estresse) e os níveis de cortisol. Resultados como esses indicam a necessidade de se conhecer o nível basal de GCs de cada espécie para se entender as correlações encontradas, o que é estresse para a espécie (que fatores são percebidos como estressantes) e quais são as reações fisiológicas decorrentes desses estressores.

Romero (2004) fez uma revisão de cinco mecanismos fisiológicos que regulam a liberação de glicocorticóides durante o estresse, que pode ajudar a explicar resultados considerados, até o momento, paradoxais. São eles: o contexto psicológico, os receptores múltiplos de glicocorticóides, o *feedback* negativo, as experiências prévias do sujeito, a aclimação fisiológica e a facilitação do estresse. Segundo o autor, esses mecanismos devem ser levados em consideração ao se planejar e analisar os dados de uma pesquisa com medidas de glicocorticóides, uma vez que modulam a resposta fisiológica, podendo produzir resultados inesperados. Essa revisão deixa clara a necessidade de compreensão dos níveis basais de GCs das diversas espécies para a interpretação de pesquisas que usem como indicadores os GCs. Fica explícito, também, que diferentes populações de uma espécie podem apresentar diferentes valores basais de GCs se submetidas a, por exemplo, diferentes graus de risco de predação ou sazonalidade na oferta de alimento. É importante, portanto, que as pesquisas que visam investigar níveis basais de glicocorticóides sejam feitas com populações selvagens, em que o contexto psicológico e as experiências dos sujeitos possam ser considerados como típicos da espécie, e não modificados pelo homem.

Neste contexto, o macaco-prego (Cebidae, Catarrhinae, Mammalia), que é um primata do Novo Mundo, pode ser especialmente interessante para a investigação de perfis de GCs, por ocorrer naturalmente em ambientes distintos, com consequente variabilidade comportamental (Izar et al., 2012). Até recentemente, todas as populações deste primata eram consideradas uma única espécie, *Cebus apella*, com diversas subespécies. No entanto, em revisões recentes (baseadas em dados morfológicos; Oliveira & Langguth, 2006; Silva Jr., 2001 e moleculares; Lynch-Alfaro et al., 2012) as oito sub-espécies que eram classificadas como a forma robusta do gênero neotropical *Cebus* agora pertencem ao gênero neotropical *Sapajus* (*S. apella*, *S. macrocephalus*, *S. libidinosus*, *S. cay*, *S. nigritus*, *S.*

robustus, *S. xanthosternos* e *S. flavius*), e o gênero *Cebus* passa a ser constituído apenas pelas formas gráceis (*C. albifrons*, *C. olivaceus* e *C. capucinus*).

Izar (2004), estudando uma população de *S. nigritus* da Mata Atlântica, observou um sistema social distinto daquele esperado para a espécie, em que as fêmeas podem transferir-se entre grupos, apresentam relações de dominância tolerantes, organizadas em uma hierarquia parcial, não formam coalizões e pouco interagem afiliativamente entre si. A autora relacionou esses resultados ao tamanho e distribuição das fontes alimentares usadas pelos animais na área de estudo. Dessa forma, esperava-se que ambientes com padrões distintos de oferta de alimento gerassem estruturas sociais distintas em macacos-prego. Recentemente, Izar e colaboradores (2012) compararam a população de *S. nigritus*, da Mata Atlântica, com uma população de *S. libidinosus* de um ecótono cerrado/catinga, e confirmaram as suposições de Izar (2004). Esse estudo corroborou a hipótese de que o padrão de oferta e distribuição de alimento afeta a estrutura social desses primatas. Será essa variabilidade comportamental relacionada a uma correspondente variabilidade hormonal? A principal hipótese é que a diferença na organização social das populações estudadas, relacionada à diversidade ecológica dos ambientes de ocorrência, reflita-se também nos perfis de GCs das duas populações. Se os níveis basais de GCs de macacos-prego estão relacionados às condições de disponibilidade de recursos alimentares, hídricos, temperatura, estrutura social, ou a qualquer fator decorrente destas condições, é esperado encontrar um efeito dessas variáveis sobre a variação interpopulacional dos níveis de GCs. Uma forma de avaliar esta questão é a utilização de fezes como matriz para obtenção de dados hormonais. Este é um método não invasivo de avaliação hormonal (Möstl & Palme, 2002) que permite, portanto, a dosagem de hormônios ligados ao estresse sem interferir (i.e. estressar) no bem estar do animal.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: 1. Validar o protocolo experimental de extração (Palme, 2005) e dosagem (Palme e Möstl, 1997) de metabólitos fecais de glicocorticóides; 2. Avaliar a possibilidade de definir um nível basal de glicocorticóides único para os macacos-prego das populações estudadas, uma vez que caso esta condição não seja satisfeita, torna-se impossível estabelecer um valor basal único para o gênero *Sapajus*; 3. Em caso de existência de diferentes níveis basais de glicocorticóides para as populações, verificar se as variáveis ambientais e comportamentais medidas explicam a variabilidade dos perfis hormonais; 4. Determinar os potenciais estressores agudos para macacos-prego e se as duas populações diferem ou se assemelham nesta questão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desafio de ACTH e dexametasona

O extrato obtido das fezes deve conter metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs; i.e. glicocorticóides metabolizados pelo organismo do animal) e não o hormônio em sua forma original. Como o método de dosagem hormonal que usamos (EIA) se baseia na ligação destes metabólitos a anticorpos policlonais anti-cortisol, a afinidade dos diferentes metabólitos a tal anticorpo é variável, podendo até ser inexistente. Assim, se faz necessário validar o método de extração e de dosagem dos MFGs. Foi então realizado um desafio de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e dexametasona em macacos-prego machos e fêmeas (de *S. libidinosus*) para validar a metodologia adotada no laboratório.

3.1.1 Local de estudo

O experimento para validação da metodologia de extração e dosagem de metabólitos de cortisol nas fezes foi realizado no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) da Paraíba, localizado no município de Cabedelo.

Os sujeitos eram normalmente mantidos em grupos de tamanho variável, em recintos de 2,0 x 5,0 m. Para o experimento, durante dez dias, os animais ficaram alojados em gaiolas individuais de 1,5 x 0,5 m.

A alimentação consistiu em ração própria para macacos pela manhã, e frutas, legumes e tubérculos (cenoura, tomate, pepino, manga, laranja, banana, abacaxi, melancia, mandioca, batata doce, abóbora) pela tarde.

3.1.2 Sujeitos

Foram sujeitos do estudo treze macacos prego (*S. libidinosus*), sendo oito machos e cinco fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1: Relação dos sujeitos que participaram do experimento de validação do protocolo laboratorial de extração e dosagem hormonal, apontando sexo, peso, tratamento recebido, quantidade de fármaco injetado e ordem da injeção.

SUJEITO	SEXO	PESO (Kg)	TRATAMENTO	QUANTIDADE	ORDEM DA INJEÇÃO
Fernandinho	Macho	2,7	dexametasona	2,5mg/Kg	1 ^o .
Prince	Macho	3,5	dexametasona	2,5mg/Kg	2 ^o .
Moreno	Macho	4,2	dexametasona	2,5mg/Kg	3 ^o .
Nenem	Macho	3,2	ACTH	100ug/kg	4 ^o .
Barba	Macho	3,8	ACTH	100ug/kg	5 ^o .
Elvis	Macho	3,4	ACTH	100ug/kg	6 ^o .
Negão	Macho	3,7	solução salina	2ml	7 ^o .
Brad	Macho	3,9	solução salina	2ml	8 ^o .
Eva	Fêmea	2,1	ACTH	200ug/kg	1 ^o .
Loira	Fêmea	2,1	ACTH	200ug/kg	2 ^o .
Ciça	Fêmea	2,3	dexametasona	2,5mg/Kg	3 ^o .
Dona	Fêmea	2,4	dexametasona	2,5mg/Kg	4 ^o .
Bia	Fêmea	2,2	solução salina	1,7ml	5 ^o .

3.1.3 Procedimentos

3.1.3.1 Grupos experimentais

O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, os machos foram submetidos aos desafios e, na segunda, as fêmeas. Além disso, em cada uma das etapas, os sujeitos eram divididos em três grupos (A, B e C). Cada um dos grupos A e B foram compostos por três machos e por duas fêmeas, já os grupos C eram o controle do experimento, e foram compostos por dois machos e por uma fêmea. Os grupos A receberam injeções de ACTH (Synacthen Dépôt/Norvatis; 100µg/kg para os machos e 200µg/kg para as fêmeas), os grupos B receberam injeções de 2,5mg/kg de dexametasona (Decadron/Aché) e os grupos C receberam injeções de solução salina (2mg/ml para os machos e 1,7mg/ml para a fêmea; Tabela 1). A quantidade de ACTH e dexametasona

injetada nos machos foi a mesma usada por Torres-Farfan e colaboradores (2008) em seu experimento com *Sapajus apella*. Quando o experimento foi realizado com as fêmeas, dobramos a quantidade de ACTH/kg injetado, buscando gerar um pico mais pronunciado, que não pudesse ser confundido com o pico causado pelo estresse da contenção/injeção. Já a quantidade de solução salina (condição controle do experimento), foi definida *a priori* para os machos, a fim de simplificar o procedimento. Como o peso das fêmeas é menor, o volume injetado nos sujeitos em todas as condições foi menor, portanto definimos o volume da solução salina como a média dos volumes injetados nas fêmeas das demais condições. Por fim, a definição sobre qual indivíduo integraria qual grupo se deu por sorteio.

O ACTH tem como efeito induzir a liberação de cortisol na corrente sanguínea (Desborough, 2000), ou seja, se o método de extração e dosagem dos MFGs for eficaz, deve-se encontrar um pico nas medidas desses metabólitos, após a administração do ACTH. Já a dexametasona (vendida comercialmente como Decadron), causa inibição do eixo HPA e, conseqüentemente, da liberação de cortisol (Carroll et al., 1980). Espera-se, portanto, que não seja encontrado pico de MFG após a injeção deste fármaco.

3.1.3.2 Cronograma experimental

Nos três primeiros dias não houve qualquer tipo de intervenção ou coleta de fezes, com o propósito de habituar os animais às gaiolas. A alimentação se deu da forma habitual.

No quarto dia iniciou-se a coleta de fezes para a caracterização do perfil de MFGs dos sujeitos antes das injeções referentes a cada condição experimental.

Na manhã do oitavo dia, com o auxílio dos tratadores do CETAS e do veterinário responsável (Dr. Paulo Carniel Wagner), os animais foram pesados dentro da própria gaiola, contidos com o auxílio de um puçá, e receberam a injeção de acordo com seu peso. No caso dos machos, esse procedimento se iniciou às 8:40 h e durou uma hora. O primeiro grupo a receber as injeções foi o B, seguido pelo grupo A e finalmente pelo grupo C. Na etapa com as fêmeas, o procedimento começou às 9:00 h e durou vinte minutos. A ordem para a realização das injeções foi: grupo A, B e C. Com exceção de duas fêmeas, todos os

animais vocalizaram muito durante o processo de contenção e injeção. Algumas vezes os outros sujeitos vocalizavam junto com o animal contido, e sacudiam as grades das gaiolas.

O controle da fase do ciclo ovariano das fêmeas, que serviram como sujeitos no experimento de validação do protocolo laboratorial de extração e dosagens hormonais não foi possível devido às condições encontradas para a realização do experimento. Mesmo contando com o empenho do diretor do CETAS e dos tratadores, esse controle se mostrou inviável em termos institucionais. No entanto, a interferência do ciclo das fêmeas sobre os valores de cortisol não é consenso na literatura, pois alguns trabalhos apontam uma ausência de correlação entre o ciclo ovariano e os níveis de cortisol de fêmeas de mandril e macacos rhesus (Setchell et al, 2008; Smith & Norman, 1987, respectivamente). Além disso, considero que a coleta prolongada das amostras fecais (por sete dias) e a realização de três grupos experimentais (ACTH, dexametasona e solução salina) concomitante foram controles suficientes para tal experimento.

3.1.3.3 Coleta de fezes

A coleta de fezes foi feita em rondas, que ocorriam a cada 30 minutos, das 07:00 às 17:30 h (após este horário, minha permanência não era permitida). Assim, a coleta não se deu durante a noite.

Nas rondas diurnas a cada 30 minutos, todas as fezes encontradas embaixo da gaiola de cada sujeito eram coletadas com auxílio de um palito de sorvete limpo, acondicionadas em *eppendorf* e identificadas em relação à data, horário e sujeito. Uma espátula era usada para limpar possíveis restos de fezes sob a gaiola. Para facilitar a coleta das fezes, as gaiolas com os sujeitos eram colocadas, lado a lado, sobre placas de zinco, em uma área externa e coberta. Todas as manhãs os tratadores levavam as gaiolas para fora e, no fim da tarde, elas eram recolhidas e colocadas dentro do recinto que os animais normalmente habitavam.

As fezes obtidas ao longo do experimento foram conservadas em um freezer a -20°C, no próprio CETAS. Na primeira etapa do experimento (desafio com machos) foram coletadas 669 amostras de fezes e, na segunda etapa (desafio com fêmeas), 457. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Endocrinologia Comportamental da

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, acondicionadas em isopor com gelo. Lá os metabólitos fecais de glicocorticóides foram extraídos de acordo com Palme (2005) e uma alíquota de 100µL desse extrato foi seca em banho-maria acoplado a um fluxo de ar, para transporte ao laboratório do Prof Rupert Palme, na Universidade de Medicina Veterinária, em Viena, na Áustria. Lá esses extratos foram re-suspendidos e dosados seguindo o protocolo de Palme e Möstl (1997).

3.1.4 Análise dos dados

As análises estão apresentadas de três formas distintas: 1) um gráfico com todos os dados para cada indivíduo, mostrando o valor de cada amostra coletada durante o experimento; 2) uma tabela com cálculos de valores basais, picos, mínimos, tempos de reação e porcentagens de aumento e diminuição dos níveis de MFGs; e 3) gráficos de médias e desvios padrões de grupos de indivíduos ordenados por sexo e tipo de tratamento no dia da injeção e no dia anterior e posterior a esta.

Os cálculos do nível basal de cada indivíduo antes das injeções foram feitos através da determinação da mediana das amostras coletadas durante as 24h que precederam a injeção. O pico causado pelos tratamentos foi definido como o maior valor encontrado dentre as amostras coletadas pós-injeção. Já a porcentagem de aumento foi calculada dividindo-se o valor do pico pelo valor basal multiplicado por cem. O valor mínimo é o menor valor encontrado nas amostras coletadas após as injeções, e a porcentagem de diminuição é, portanto, a divisão deste valor pelo basal, vezes cem.

3.2 CLAE

Uma vez que espécies distintas podem apresentar formas distintas de metabolização de GCs, com produção de diferentes tipos de MFGs, foi realizado um ensaio de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para caracterizar os metabólitos produzidos e verificar se existem diferenças entre sexos (intraespecífica) ou entre as espécies, nos

metabólitos formados. Tal ensaio apresenta o perfil dos MFGs excretados pelos sujeitos e que foram obtidos das amostras através da metodologia de extração. Assim, analisando um *pool* de amostras de *S. nigritus* e outro de *S. libidinosus*, foi possível verificar se o perfil de MFGs excretado pelas duas espécies era distinto (como se poderia supor para duas espécies diferentes), ou semelhante, (como seria esperado para duas espécies muito próximas, até recentemente consideradas uma única espécie).

3.2.1 Sujeitos

Para a comparação entre os perfis de MFG das duas populações estudadas, de *S. libidinosus* e *S. nigritus*, foram estabelecidos quatro grupos de amostras de fezes para execução do ensaio: fêmeas de *S. libidinosus*, machos de *S. libidinosus*, fêmeas de *S. nigritus* e machos de *S. nigritus*. Cada grupo foi representado por um *pool* de amostras dos sujeitos de vida-livre, escolhidas por sorteio.

3.2.2 Procedimentos

Os *pools* foram compostos por uma alíquota de 0,5 ml de cada um dos seis extratos sorteados, atingindo um volume final de 3,0 ml. Estes *pools* foram então levados ao banho-maria com fluxo de ar, para total evaporação do solvente, e enviados para a Universidade de Medicina Veterinária, em Viena, na Áustria. Lá, no laboratório do Professor Rupert Palme, foram submetidos a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa. Este ensaio é baseado em técnicas de cromatografia e é capaz de separar misturas, identificando, quantificando e purificando seus componentes. Os *pools* foram submetidos a uma coluna Nova-Pak C18, 4µm, 3.9 x 150mm, Millipore Corporation, Milford, MA, USA) com uma coluna Mini-Guard (C18 Guard-Pak TM, WAT085825, Waters Corp., UK) e um sistema de solvente metanol (pureza > 99.9%; Company Merck, Germany):água pura com fluxo de 1 ml por minuto (Teskey-Gerstl et al., 2000; Schatz & Palme, 2001). Os esteróides foram separados usando um gradiente linear de 50–75% de metanol. A porcentagem de metanol permaneceu constante em 50% por 5 minutos e foi linearmente aumentada para 75% nos 30 minutos seguintes. Foram então coletadas três frações por

minuto. As posições de eluição do cortisol e da corticosterona foram determinadas no sistema do CLAE (todos os esteróides foram obtidos de Steraloids, Wilton, NH, USA). A imunorreatividade das frações coletadas foi determinada por um ensaio imunoenzimático (EIA) de cortisol (Palme and Möstl, 1997).

3.3 Determinação de Níveis Basais de MFGs de Populações Selvagens e Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais

Para determinar o nível basal de MFGs dos sujeitos estudados, utilizou-se um método baseado na exclusão dos *outliers* selvagens (considerado mais conservador). A fim de verificar se tal método era robusto, realizou-se uma comparação dos resultados obtidos por este método com os resultados obtidos por outros métodos comumente usados por pesquisadores da área.

Com base no método de exclusão dos *outliers* selvagens, calculou-se um nível basal mensal de MFGs para cada indivíduo amostrado. Com esses dados buscou-se saber se seria possível estabelecer um nível basal de MFGs para o gênero *Sapajus*. Assim, uma análise estatística foi realizada para determinar se os níveis basais das duas populações eram significativamente diferentes. Sendo eles iguais, existiria a possibilidade de se estabelecer uma faixa de variação dentro da qual os valores encontrados seriam considerados como pertencentes ao nível basal do gênero. No entanto, se eles fossem significativamente distintos, ficaria clara a impossibilidade de definir tal faixa de variação para o gênero.

Além disso, dados comportamentais e ambientais foram coletados e confrontados com os dados hormonais. Com essas medidas objetivou-se acessar quais são os fatores estressores para cada população e comparar as duas populações quanto ao tipo de resposta hormonal evocada para cada estressor.

3.3.1 Áreas de estudo

Duas áreas de estudo distintas foram consideradas neste trabalho, o Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), habitado por *S nigritus*, e a Fazenda Boa Vista (FBV), habitada por *S libidinosus*.

O PECB é uma área de Mata Atlântica localizada em São Miguel Arcanjo, São Paulo. É uma área de Mata Atlântica com 380 km². O dossel contínuo de uma floresta tropical gera a impressão de fartura de frutos. Porém, pesquisas de campo mostram que os sujeitos do PECB andam quilômetros para comer apenas folhas, item alimentar de baixa qualidade calórica (Taira, 2007). Em compensação, há uma farta disponibilidade de água (precipitação média anual de 1683 mm, o mês mais seco - Julho - apresenta 78 mm de chuva) e as temperaturas são amenas (média anual de 19°C), embora possam ocorrer geadas no inverno (Figura 1).

O risco de predação é baixo, mas mesmo assim a densidade populacional é pequena, provavelmente devido à baixa taxa reprodutiva (Izar et al., 2008). A área de uso dos grupos está entre as maiores já registradas para macacos-prego (Presotto, 2009). A organização social é fluida. Há pouca coesão grupal e há migração de fêmeas entre os grupos. Não há hierarquia entre fêmeas, só entre machos. Os conflitos agonísticos intra-grupo são pouco frequentes devido à utilização de recursos alimentares não monopolizáveis (Nakai, 2007).

Figura 1: Temperaturas médias, máximas e mínimas (°C) e pluviosidade (mm de chuva) no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB). Os dados de temperatura e pluviosidade foram cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). O ponto de coleta desses dados foi no município de São Miguel Arcanjo (na latitude: -23.8516°, longitude: -48.1645°, altitude: 644.00 metros). A ausência de dados nos meses de julho, agosto e setembro de 2010 deve-se a problemas que o INMET define como: avarias nos equipamentos, falta de registro na estação convencional e na estação automática e problemas nos sensores ou sinal de satélite

Como já constatado em trabalhos anteriores (Izar, 2004, Taira, 2007, Nakai, 2007), a oferta de frutos variou bastante ao longo do ano no PECB, mas não se pode determinar um claro padrão sazonal, embora, durante os anos de coleta de dados neste local, tenha ocorrido uma tendência para maior oferta nos meses de verão (Figura 2). Já a oferta de invertebrados, que entre 2001 e 2003 apresentava clara sazonalidade (com maior oferta no verão) sofreu drástica redução entre os anos de 2005 e 2008, com novo aumento no final de 2008, nos meses de verão. Desde o início de 2010 esta oferta vem diminuindo novamente. Essa alteração na disponibilidade de invertebrados nos anos anteriores esteve correlacionada a uma elevação nas temperaturas mínimas e consequente diminuição da umidade na área (Taira, 2007).

Figura 2: Biomassa estimada de frutos e invertebrados no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 para o Parque Estadual Carlos Botelho. A oferta mensal de frutos maduros foi medida utilizando coletores de frutos (bandejas de alumínio de 25 x 16,5cm). A oferta de insetos foi medida através de armadilhas pitfall (copos descartáveis de plástico preenchidos com água enterrados no solo). Ambos estavam dispostos em 170 pontos sorteados ao longo de trilhas (1 m de distância lateral) dentro da área de uso do grupo estudado. O número de armadilhas em cada cota de altitude foi proporcional à sua área dentro da área de vida dos animais. As armadilhas eram esvaziadas a cada quinze dias e tinham a massa de frutos (bandejas) ou invertebrados (copos) que continham medida. O cálculo da biomassa foi realizado com base em uma extrapolação deste valor, sendo expresso em termos de Kg/Ha. A área amostrada pelas armadilhas resulta da área superficial de cada armadilha multiplicada pelo número de armadilhas válidas a cada coleta (quando uma armadilha está danificada, de forma que a coleta é impedida ou reduzida, ela é descartada naquela amostragem, substituída, e incluída na próxima coleta).

A FBV é uma área de ecótono Cerrado/Caatinga, localizada em Gilbués, Piauí e, apesar das crenças de que nada cresce no sertão brasileiro (Coelho e Santos, 2008), a área apresenta uma oferta abundante de frutos mesmo na estação seca. Porém o déficit hídrico é claro (para mais detalhes, ver Visalberghi et al., 2007). A precipitação média anual é de 1156 mm, com uma estação seca que dura seis meses (de abril a setembro) e apresenta um total de 230mm de chuvas, fazendo da água um recurso escasso (Figura 3). As temperaturas são elevadas (média anual de 26,5°C), de forma que espécimes de *S. libidinosus* fazem longas paradas no meio do dia para descansar em locais abrigados do sol (Visalberghi et al., 2007). Mesmo com alimento abundante, a densidade populacional desta espécie é baixa. Tal fato pode estar relacionado a um maior risco de predação, especialmente a caça por humanos. A organização social é estável e formam-se grupos coesos em que a hierarquia de dominância é linear e rígida. Os conflitos agonísticos intra-grupo são constantes, uma vez que os recursos alimentares são monopolizáveis (Verderane, 2010).

Figura 3: Temperaturas médias, máximas e mínimas (°C) e pluviosidade (mm de chuva) no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 na Fazenda Boa Vista (FBV). Obs: não havia pesquisa sendo desenvolvida entre maio e setembro de 2008 na FBV. Os dados de temperatura foram adquiridos com o auxílio de um termômetro digital e um pluviômetro, instalados na base de pesquisa instalada no local.

Na FBV há uma grande variação na oferta de furtos ao longo do ano, sem padrão sazonal claro. O fim da estação chuvosa em 2009 mostrou ser um período de relativa escassez de frutos (Figura 4A). Já a oferta de invertebrados é claramente sazonal (Figura 4B), diretamente relacionada à pluviosidade, o que se confirma nos dados de 2009 e 2010. A aparente escassez deste recurso no segundo semestre de 2010 pode ser devido à perda de várias armadilhas (devido a queimadas e manipulação por animais) em áreas de grande oferta.

Figura 4: Biomassa de frutos (A) e invertebrados (B) para a Fazenda Boa Vista, de janeiro de 2008 a outubro 2010. A oferta mensal de frutos foi medida utilizando coletores redondos confeccionados com tela e arame, com área de 47,12 cm², fixadas a árvores e estacas no local de coleta. A oferta de insetos foi medida através de armadilhas pitfall (utilizando garrafas PET como recipientes). Ambos estavam distribuídos em 100 pontos sorteados ao longo de uma trilha de 3 km (1 m de distância lateral) dentro da área de uso dos grupos estudados, a uma distância mínima de 30 m entre cada coletor. O número de armadilhas em cada fisionomia de vegetação foi proporcional à sua área dentro da área de vida dos animais. As armadilhas eram esvaziadas a cada quinze dias e tinham a massa de frutos (coletores) ou invertebrados (garrafas PET) medida. O cálculo da biomassa foi realizado do mesmo modo que no PECB.

3.3.2 Descrição dos grupos estudados

FBV: Nesta área, estudou-se o *S. libidinosus*, espécie que se distribui nos estados do nordeste brasileiro (Bahia, Sergipe, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Maranhão), em Minas Gerais, no Pantanal Mato-Grossense e em países fronteiriços (Paraguai, Bolívia e Peru; Rylands et al., 2005). Coletou-se dados de dois grupos nesta área, o grupo Chicão (CH - Tabela 2), que é ocasionalmente aprovisionado com alimentos e água e o grupo Zangado (ZA - Tabela 3), que é selvagem. A composição do grupo Chicão variou de 20 a 17 indivíduos (4 machos adultos, 5 fêmeas adultas, 8 juvenis e 5 infantes). Além disso, este grupo apresentou diversas trocas de dominância entre os machos, entre outubro de 2008 e dezembro de 2010, após a morte do antigo macho alfa, Chicão. Em meio a conflitos agonísticos por dominância, presenciamos um infanticídio (de Duquesa, filhote de Dita, ver Tabela 2) por um dos membros do grupo. Em 2009, ambos os grupos tiveram nascimento de gêmeos (duas fêmeas no grupo Chicão e dois machos no grupo Zangado), um evento raro entre macacos-prego, que normalmente parem um único filhote.

O grupo Zangado geralmente apresentou 1 macho adulto, 3 machos subadultos, 4 fêmeas adultas, 6 juvenis e 6 infantes. Sua composição variou entre 19 e 15 indivíduos.

Tabela 2: Relação dos indivíduos do grupo Chicão durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários. O sinal ∞ indica nascimento, + indica óbito ou desaparecimento.

SUJEITO	SEXO	IDADE	COMENTÁRIOS
Chicão	macho	Adulto	macho alfa, + out/08
Dengoso	macho	Adulto	+ out/09
Mansinho	macho	Adulto	macho alfa de out/08 a ago/10
Teimoso	macho	Adulto	
Jatobá	macho	Adulto	+ de out/09 a jul/10. macho alfa em ago/10
Piaçava	fêmea	Adulta	fêmea alfa
Teninha	fêmea	Adulta	teve um filhote em dez/10
Chiquinha	fêmea	Adulta	+ mai/09
Chuchu	fêmea	Adulta	
Dita	fêmea	Adulta	
Tucum	macho	Juvenil	filhote da Teninha, +
Caboclo	macho	Juvenil	filhote da Chiquinha, +
Amarelinha	fêmea	Juvenil	
Tomate	macho	Juvenil	filhote da Teninha, ∞ em dez/06
Catú	macho	Juvenil	filhote da Chuchu, ∞ em 5/2/07
Patí	macho	Juvenil	
Cangaceiro	macho	Juvenil	
Doree	fêmea	Juvenil	
Duquesa	fêmea	Infante	filhote da Dita, + 08/09/2010
Coco	macho	Infante	filhote da Chuchu, ∞ jul ou ago/09
Paçoca	fêmea	Infante	filhote da Piaçava, ∞ em fev/09
Pamonha	fêmea	Infante	filhote da Piaçava, ∞ em fev/09
Tranqueira		Infante	filhote da Teninha, ∞ 05/12/2010

Tabela 3: Relação dos indivíduos do grupo Zangado durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários. O sinal ∞ indica nascimento, + indica óbito ou desaparecimento.

SUJEITO	SEXO	IDADE	COMENTÁRIOS
Zangado	Macho	Adulto	macho alfa
Moça Branca	Fêmea	Adulta	fêmea alfa
Emília	Fêmea	Adulta	
Moça Chita	Fêmea	Adulta	
Júnior	Macho	subadulto	+
Luiz	Macho	subadulto	
Renato	Macho	subadulto	imigrou para o grupo
Márcio	Macho	juvenil	
Catuaba	Fêmea	juvenil	
Dunga	Fêmea	Adulta	+
Kiko	Macho	juvenil	filhote da Moça Branca
Café	Macho	juvenil	filhote da Moça Chita
Elisa	Fêmea	juvenil	filhote da Emília
Evolução	Fêmea	juvenil	filhote de Emília, ∞ dez/08
Darvin	Macho	infante	filhote da Dunga, ∞ agosto/08, +
Marcos	Macho	infante	filhote de Moça Chita
Duque	Macho	infante	filhote de Dunga, +
Cascudo	Macho	infante	filhote da Moça Chita, ∞ set/08
Cascão	Macho	infante	filhote da Moça Chita, ∞ set/08, +
E		infante	filhote da Emília

PECB: Nessa área estudou-se o *Sapajus nigritus*, espécie que ocorre no norte da Argentina (área das missões), nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Paraná, de São Paulo, do Rio de Janeiro, de áreas ao sul de Minas Gerais (Rylands et al., 2005). Vários grupos de macacos-prego foram avistados nesta área: Marrom, Pimenta 1, Pimenta 2, Água da Bifurca, Testa, Pitoco, Juçara, além de alguns grupos desconhecidos. No entanto, a coleta de dados foi focada principalmente nos grupos Pimenta 1 e Testa, que são dois grupos mais habituados à presença de pesquisadores, sendo que o grupo Pimenta 1 é o estudado há mais tempo pela equipe da Dra. Izar e que, portanto, tem sua composição mais conhecida (PI – Tabela 4). Ao longo deste estudo a composição

deste grupo variou de 10 a 13 indivíduos (2 machos adultos, 1 macho subadulto, 4 fêmeas adultas, 1 fêmea subadulto, 4 juvenis e 2 infantes). Já o grupo Testa (TE - Tabela 5) foi caracterizado ao longo desta pesquisa. Sua composição também variou de 10 a 13 indivíduos (4 machos adultos, 3 machos subadultos, 5 fêmeas adultas e 1 juvenil). Vale lembrar que o avistamento e identificação dos sujeitos imaturos na área são comprometidos pela vegetação e pela distância entre os indivíduos (Nakai, 2007). Desta forma, o número de animais identificados é menor do que o número de indivíduos no grupo.

Tabela 4: Relação dos indivíduos do grupo Pimenta 1 durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários.

SUJEITO	SEXO	IDADE	COMENTÁRIOS
Benjamin	macho	Adulto	macho alfa
Ceni	macho	Adulto	
Popey	macho	subadulto	não avistado desde 02/09
Ruiva	fêmea	Adulta	
Olívia	fêmea	Adulta	
Elis	fêmea	Adulta	
Flor	fêmea	subadulto	
Preta	fêmea	Adulta	
Raul	macho	juvenil	filhote da Ruiva
Patrick	macho	juvenil	
Zé	macho	juvenil	
Batata	macho	juvenil	
Ninja		juvenil	
Otoni	macho	juvenil	filhote da Olívia

Tabela 5: Relação dos indivíduos do grupo Testa durante o período de estudo segundo sexo, faixa etária e comentários.

SUJEITO	SEXO	IDADE	COMENTÁRIOS
Testa	macho	Adulto	macho alfa
Rayban	macho	Adulto	
Bob	macho	Adulto	
Rambo	macho	Adulto	
Senna	macho	Subadulto	
Michael	macho	Subadulto	
Testa Jr.	macho	Subadulto	
Bohemia	fêmea	Adulta	
Bege	fêmea	Adulta	
Ruth	fêmea	Adulta	
Raquel	fêmea	Adulta	
Anna	fêmea	Adulta	
Japa		Juvenil	

3.3.3 Procedimentos

A coleta de dados foi iniciada em janeiro de 2009 e durou até agosto de 2010, no PECB, e até dezembro de 2010, na FBV. O total de esforço de campo no PECB foi de 2255 horas, das quais 1375 foram de contato com os animais. Já na FBV foram 2396 horas de esforço de campo, com 2024 horas de contato. Em relação às amostras de fezes, foram coletadas 2.038 amostras no total, sendo 486 no PECB e 1.552 na FBV. Essa diferença de aproveitamento deve-se principalmente à dificuldade de acompanhar os grupos devido à declividade da área do PECB, que é caracterizada por morros paralelos e morrotes baixos (Nakai, 2007). Assim, quando os animais deslocavam-se rapidamente, a chance de perdê-los era maior, principalmente em áreas de topografia acidentada, do que quando se deslocavam em velocidade menor. Além disso, a área de vida dos animais no PECB é muito extensa, de cerca de 500 ha (Presotto, 2009), o que dificulta a localização dos animais quando os perdemos. Também, no PECB os animais ficam a maior parte do tempo no alto das árvores, o que dificulta a visualização e coleta de amostras de fezes.

3.3.3.1 Coleta de dados comportamentais

Amostras de varredura (Altmann, 1974) de um minuto a intervalos de cinco minutos foram realizadas para todos os indivíduos avistados. Cada amostra incluía a identificação de todos os indivíduos observados, suas distâncias sociais e a atividade que cada um estava exibindo. As atividades eram anotadas como: a) forrageamento (os itens alimentares consumidos foram classificados como fruto, flor, folha, semente, néctar, raiz, endosperma, invertebrado e vertebrado), os alimentos de origem vegetal e os vertebrados foram identificados por espécie e os invertebrados por Ordem sempre que possível; b) alimentação (quando era possível observar o indivíduo ingerindo o alimento); c) locomoção; d) descanso, e) observação; f) comportamento social (efetuar catação, receber catação, brincar, ser transportado, ameaçar e ser ameaçado), g) a identidade dos parceiros sociais foi registrada sempre que possível e h) outros (vocalizar – quando só era possível ouvir, mas não se podia ver o que estava ocorrendo, coçar, auto-catação, etc.).

Eventos relevantes para o estudo como conflitos agonísticos, coalizões, catação, encontro de grupos, presença de migrantes, desaparecimento de indivíduos, fêmeas em estro e nascimento de filhotes, foram registrados utilizando-se o método “todas as ocorrências” (Altmann, 1974). Eram registrados, também, os indivíduos que participavam desses eventos, e seu tempo de duração. Todas as ocorrências de chamados de alarme e encontros dos grupos com predadores potenciais foram anotadas, uma vez que é pouco provável que algum evento de predação de macacos-prego seja observado durante estudos, devido à influência da observação (Isbell & Young, 1993).

Na FBV, não foi possível estabelecer uma coleta de dados comportamentais pelo método de varredura até abril de 2009, assim, os dados comportamentais naquela área foram de abril/2009 até dezembro/2009. Já no PECB a coleta foi interrompida antes e durou de janeiro/2009 até agosto/10. Em alguns meses não foram coletados dados de algum dos grupos, por dificuldades de encontrar os animais na área de estudo, no entanto, a eventual impossibilidade de coletar dados nestes meses não impediu a obtenção de uma quantidade expressiva de amostras fecais em ambas as áreas de coleta.

3.3.3.2 Coleta das amostras fecais

Amostras fecais frescas foram coletadas em tubos de 2 ml e mantidas em recipiente térmico até serem armazenadas, dentro de 10-12 horas da coleta, a -20°C em frízeres. Os tubos permaneceram em baixa temperatura até serem transportados ao LEC/UFRN, onde os metabólitos fecais de glicocorticóides foram extraídos de acordo com Palme (2005) e uma alíquota de 100µL desse extrato foi seca em banho-maria acoplado a um fluxo de ar, para transporte ao laboratório do Prof Rupert Palme, na Universidade de Medicina Veterinária, em Viena, na Áustria. Lá esses extratos foram re-suspendidos e dosados seguindo o protocolo de Palme e Möstl (1997).

3.3.3.3 Extração

A extração das amostras foi realizada através do protocolo descrito em Palme (2005). As amostras eram retiradas do frízer e deixadas em temperatura ambiente até que não estivessem mais congeladas. Com o auxílio de uma espátula de metal, eram então homogeneizadas uma a uma. Uma alíquota de 0,2g da amostra homogeneizada e úmida era pesada em balança analítica, e acondicionada em um novo tubo devidamente identificado. A esta alíquota adicionava-se 2mL de metanol 80%. A mistura era então colocada em um multivórtex por 30 minutos. Após este período as amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 3000rpm a -30°C. Uma alíquota de 1mL era pipetada do sobrenadante e transferida para um novo tubo *eppendorf* apropriadamente identificado. Este tubo era levado ao banho-maria (45°C) e mantido sobre fluxo de ar, de modo que o metanol evaporasse, e os metabólitos ficassem aderidos à parede do tubo. Os tubos com o extrato seco foram mantidos refrigerados até o momento da dosagem.

3.3.3.4 EIA

A dosagem das amostras foi realizada na Universidade de Medicina Veterinária de Viena (Áustria) sob a supervisão do Prof. Rupert Palme, e seguiram o protocolo descrito por Palme e Möstl (1997).

Os tubos *eppendorf* com os extratos secos foram re-suspendidos da seguinte maneira: adicionou-se 400µL de metanol 100% e agitou-se o tubo em vórtex manual por 1 minuto. Levou-se o tubo ao congelador por pelo menos 12 horas. Posteriormente, acrescentou-se 100µL de água destilada. Após este período as amostras foram agitadas em multivórtex por 10 minutos.

A quantificação dos MFGs se deu em uma alíquota de 50µL da amostra, diluída 1:100. As amostras controles e padrões eram colocados em duplicata em placas NUNC sensibilizadas com uma camada de proteína A e albumina bovina (*bovine serum albumin* - BSA). Posteriormente cada poço das placas recebia 100 µL de anticorpo policlonal para cortisol capaz de se ligar a placa por meio da proteína A. Além do anticorpo era adicionada mais 100µL de uma solução marcadora (cortisol ligado à biotina).

As placas eram então colocadas em um agitador dentro de um refrigerador durante a noite. Na manhã seguinte as placas eram lavadas em uma máquina específica para este fim. Após a lavagem adicionavam-se 250µL de estreptavidina (substância com alta afinidade a biotina), aguardava-se 45 minutos e lava-se novamente a placa. Após a segunda lavagem, adicionavam-se 250µL de solução substrato com peroxidase (responsável pela coloração azulada que os poços assumem). Aguardava-se mais 45 minutos, após os quais se acrescentava 50µL de solução stop (responsável por inibir definitivamente ligações entre as substâncias presentes na placa e capaz de modificar a coloração da solução de azul para amarela). A placa era então levada ao agitador por 5 minutos, após os quais se realizava a leitura da absorbância de cada poço em um espectrofotômetro. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram inferiores a 12%.

3.3.4 Análise dos dados

3.3.4.1 Formas de calcular o nível basal

O cálculo do nível basal de MFGs é realizado diferentemente por diversos pesquisadores. O grupo de pesquisa do Dr. Rupert Palme (Martínez-Mota, *et al*, 2008; Touma *et al*, 2004; Schatz e Palme, 2001; Mülleder *et al*, 2003) define este nível por meio do cálculo da mediana da amostra. Já nos trabalhos da Dra. Janine Brown (Brown *et al*,

1994; Scarlata *et al*, 2011; Kersey *et al*, 2010; Moreira *et al*, 2001), os cálculos são feitos retirando todos os *outliers* (observados em análises do tipo *boxplot*) da amostra de forma iterativa (i.e., após detectarem os *outliers*, estes são removidos da amostra e essa é novamente inspecionada a procura de novos *outliers*. Este procedimento é repetido sucessivamente até que estes não sejam mais identificados). O nível basal é então definido como a média desta amostra que não apresenta *outliers*.

Neste trabalho foi adotada uma nova forma de realizar estes cálculos, em que se retira apenas os *outliers* selvagens (valores maiores ou menores que 3 intervalos inter-quartílicos, que equivale ao 3º quartil menos o 1º quartil; Norusis, 1998) da amostra. A justificativa de utilizar esta abordagem é que ela é mais conservadora, pois mantém uma parcela maior da variação nos níveis hormonais.

3.3.4.1.1 Retirada de outliers selvagens (método 1)

Foram feitos *boxplots* de cada classe sexo/etária (juvenis, fêmeas adultas e machos adultos) de cada grupo (no caso de grupos pouco amostrados os *boxplots* foram realizados sem a divisão por classe sexo/etária) e os *outliers* selvagens apontados por este método foram excluídos iterativamente (como explicado no item anterior). Após este procedimento e com base na sub-amostra obtida, médias foram calculadas para cada classe sexo/etária para cada mês. Calculei, então, a média destas médias mensais, que corresponde ao valor basal para cada classe sexo/etária de cada grupo. A média dos valores basais das classes sexo/etárias resultou no valor basal para cada grupo e a média destes valores determinou a média basal para cada população.

3.3.4.1.2 Retirada de outliers (método 2)

Após a retirada dos *outliers* selvagens, foi realizada a remoção dos *outliers*. Esta foi feita como no caso anterior. Todos os outliers presentes na amostra eram removidos. Um novo *boxplot* era feito e se ainda houvesse *outliers*, eles também eram removidos, até que o *boxplot* não apresentasse *outliers*. O cálculo dos níveis basais foi realizado como no caso anterior e com base nesta sub-amostra.

3.3.4.1.3 Mediana (método 3)

Para o cálculo da mediana tomaram-se todos os dados de cada classe sexo/etária de cada grupo em cada mês. Calculou-se, então a mediana de cada classe sexo/etária por mês. Depois uma nova mediana foi calculada, a partir destes valores mensais, e é esta mediana que representa a classe sexo/etária. Já o resultado do grupo corresponde à mediana dos valores de cada classe sexo/etária e o resultado da população equivale à mediana dos valores dos grupos daquela população.

3.3.4.2 Determinação de Níveis Basais e Correlação entre MFGs e Fatores Ambientais e Comportamentais

3.3.4.2.1 Efeitos de fatores ambientais

Os níveis médios mensais de MFGs foram calculados para cada indivíduo de cada grupo, excluindo os *outliers* selvagens (para detalhes sobre a exclusão ver item 3.2.1.2.1 Retirada de *outliers* selvagens - método 1). Para os dados climáticos e de disponibilidade de frutos e invertebrados, calculou-se uma média mensal para cada população. Já as taxas comportamentais foram calculadas mensalmente por grupo (frequência de um dado comportamento ou grupo de comportamentos, em um dado mês para um dado grupo, dividida pelo tempo de observação do grupo naquele mês, em horas).

As estações do ano na FBV não foram definidas de acordo com o calendário, mas sim de acordo com o regime de chuvas (de forma que poderiam até mudar ligeiramente de um ano para o outro), e por isso são chamadas de seca e chuvosa.

3.3.4.2.2 Efeito de fatores comportamentais

As categorias comportamentais analisadas foram: 1) interações agonísticas intragrupais (inclui comportamentos amostrados como interações agonísticas com contato físico e aquelas em que só foram ouvidas vocalizações associadas a tais eventos); 2) interações agonísticas intergrupos (eventos em que foram registrados encontros de grupos

com interações agonísticas entre eles); 3) encontros com potenciais predadores (cobras, aves de rapina e animais não identificados); 4) encontros com outras espécies que apesar de não serem potenciais predadores, causavam reações disruptivas no grupo (aves, bugios, muriquis, araras, camaleões/teiús/iguanas, marimbondos, porcos domésticos, saguis, cachorros, jumentos); 5) fêmeas em período proceptivo (número de dias de cada fêmea do grupo por mês); 6) cópulas (número de cópulas que foram observadas em um dado mês); 7) outros eventos possivelmente estressantes (barulhos ou presença de humanos desconhecidos); 8) experimento realizado no grupo com a utilização de um espelho, episódio de infanticídio, indivíduos perdidos do grupo; ataque de marimbondos, veículo passando próximo ao grupo, tempestade com trovões); e 9) vocalizações de alarme (todos os eventos de vocalizações de alarme registrados em um dado mês). As taxas comportamentais foram expressas em termos de eventos/hora de observação.

3.3.4.2.3 Análises estatísticas

Um MLGM (modelo linear generalizado misto) foi conduzido tendo população como efeito fixo, grupo e indivíduo como efeito aleatório e média mensal de MFGs sem *outliers* selvagens como variável resposta. Esta análise permitiu verificar se: havia diferença significativa entre as populações; entre os grupos e se algum dos índices ambientais e comportamentais medidos exercia efeito sobre os níveis de MFGs. O software usado foi SAS, versão 9.2. As análises foram conduzidas por Agatha Sacramento Rodrigues, do Serviço de Estatística do Departamento de Psicologia Experimental do IPUSP.

Devido ao fato de a amostragem deste projeto ser deficiente em termos estatísticos (por exemplo, nenhum dos sujeitos apresentou dados de MFGs para todos os meses da coleta de dados) o que, por consequência, diminui o poder estatístico das análises (i.e., encontrar corretamente uma suposta relação quando ela existe; Hair et al, 2010), optou-se também por realizar uma análise descritiva destes dados. Embora a análise descritiva não substitua os testes estatísticos, ela permite vislumbrar tendências que podem ser exploradas a contento em pesquisas futuras.

3.3.4.3 Análises individuais

Para determinar o nível basal de cada indivíduo, construiu-se um gráfico da distribuição (*boxplot*) dos dados hormonais do sujeito a fim de verificar a existência de *outliers* selvagens (aqueles que são maiores ou menores que 3 intervalos inter-quartílicos). Posteriormente, os dados de Todas as Ocorrências foram examinados em busca de eventos que pudessem estar relacionados a estes *outliers* selvagens (i.e. ocorreram algumas horas antes do evento). As análises foram realizadas apenas para os indivíduos mais amostrados de cada grupo (Benjamin, Ceni, Olívia, Elis e Ruiva do grupo Benjamin; Rambo, Senna e Testa do grupo Testa; Café, Dunga, Elisa, Júnior, Kiko, Luíz, Márcio, Moça Branca, Moça Chita e Zangado do grupo Zangado; e Amarelinha, Caboclo, Cangaceiro, Catú, Chuchu, Coco, Dita, Doree, Jatobá, Mancinho, Pati, Piaçava, Teimoso, Teninha, Tomate e Tucum do grupo Chicão).

Após a exclusão dos picos, a média e o desvio padrão da amostragem hormonal do sujeito foram novamente calculados. O nível basal é definido como média $\pm$ desvio padrão e os *outliers* selvagens são picos causados por eventos estressantes.

4. RESULTADOS

4.1 Validação Fisiológica do Método de Extração e Dosagem Hormonal

4.1.1. Desafio de ACTH e Dexametasona

Os gráficos com todos os dados dos indivíduos machos submetidos aos desafios de ACTH e dexametasona podem ser observados nas Figuras 5, 7 e 9. Os gráficos dos desafios de ACTH e dexametasona das fêmeas estão nas Figuras 6, 8 e 10. Os sujeitos que passaram pelo desafio de ACTH apresentaram um claro pico pós-injeção (observar seta preta nas Figuras 5 e 6). Já os animais que receberam a injeção de dexametasona apresentaram uma queda acentuada dos níveis de MFGs pós-injeção (observar seta preta nas Figuras 7 e 8). Os sujeitos que receberam a injeção de solução salina não apresentaram nenhum pico pronunciado e nem queda drástica dos níveis de MFGs pós-injeção (Figuras 9 e 10).

Nas figuras 6, 8 e 10 (ver asterisco), observa-se que praticamente todas as fêmeas (menos em Eva; Figura 6A) apresentaram um pico de MFGs no dia 02/mar. Este pico está relacionado a um incidente ocorrido no CETAS que pude presenciar. Durante a execução do experimento com as fêmeas, ocorreu, no mesmo dia e aproximadamente 4h antes dos picos observados, um evento estressante em um recinto de macacos-prego (*S. flavius*) isolado visualmente, mas não auditivamente, das fêmeas que estavam sendo submetidas ao experimento. Um dos macacos mordeu um visitante do CETAS que se aproximou indevidamente dos animais, o que causou muitas vocalizações do visitante e dos macacos daquele recinto.

Os resultados dos cálculos de valores basais, picos, mínimos, tempos de reação e porcentagens de aumento e diminuição dos níveis de MFGs encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Síntese dos resultados dos desafios de ACTH e dexametasona realizado com treze macacos-prego (*S. libidinosus*) no CETAS de João Pessoa-PB, organizados de acordo com sexo e tratamento recebido.

SUJEITO	SEXO	TRATAMENTO	BASAL ^a	PICO ^b	% AUMENTO ^c	TEMPO "P" ^d	MÍNIMO ^e	% DIMINUIÇÃO ^f	TEMPO "M" ^g
Barba	Macho	ACTH	3,97	40,26	1015%	5,2	1,66	58%	49,2
Elvis	Macho	ACTH	5,60	25,63	458%	5,6	0,88	26%	28,6
Nenem	Macho	ACTH	1,62	26,57	1644%	4,4	0,33	80%	54,9
Fernandinho	Macho	dexametasona	1,71	55,90	3279%	4,3	0,14	92%	32,3
Moreno	Macho	dexametasona	3,68	40,52	1101%	6,0	0,12	97%	47,5
Prince	Macho	dexametasona	2,63	10,12	385%	5,7	0,03	99%	52,7
Brad	Macho	sol. Salina	2,89	4,21	146%	4,8	0,11	96%	46,8
Negão	Macho	sol. Salina	3,61	11,97	332%	4,0	1,90	47%	29,0
Eva	Fêmea	ACTH	8,19	84,07	1027%	8,5	6,73	18%	28,5
Loira	Fêmea	ACTH	3,67	23,35	636%	2,9	1,19	67%	47,4
Ciça	Fêmea	dexametasona	4,24	59,52	1405%	5,2	0,22	95%	28,3
Dona	Fêmea	dexametasona	3,62	11,78	326%	5,2	0,40	89%	25,2
Bia	Fêmea	sol. Salina	1,89	5,58	295%	5,8	0,09	95%	32,3

^a mediana das amostras coletadas durante as 24h que precederam a injeção, expresso em µg/g de fezes úmidas.

^b maior valor encontrado dentre as amostras coletadas pós-injeção, expresso em µg/g de fezes úmidas.

^c valor do pico dividido pelo valor basal vezes cem.

^d intervalo de tempo (expresso em horas) entre a injeção recebida pelo sujeito, e o pico.

^e menor valor encontrado nas amostras coletadas após as injeções, expresso em µg/g de fezes úmidas.

^f valor mínimo dividido pelo valor basal vezes cem.

^g intervalo de tempo (expresso em horas) entre a injeção recebida pelo sujeito, e o mínimo.

Como consta da Tabela 6, a porcentagem de aumento dos níveis de MFGs é maior naqueles indivíduos que receberam o tratamento de ACTH e dexametasona e menor nos indivíduos que receberam injeções de solução salina, como foi observado nos gráficos apresentados abaixo (Figuras de 5 a 16). A porcentagem de diminuição dos níveis de MFGs é bastante elevada entre todos os sujeitos que foram tratados com dexametasona (chegando a 99% no caso do sujeito Prince). Tal redução é, em geral, maior do que a observada nos sujeitos tratados com ACTH e maior ou similar aos sujeitos tratados com solução salina. A fim de padronizar o procedimento de cálculo das variáveis, nesta análise elege-se apenas um valor para determinar o pico e o valor mínimo, o que gera resultados que nem sempre são concordantes com as análises gráficas. Por exemplo, segundo a análise quantitativa, não há diferença contundente na porcentagem de diminuição dos níveis de MFGs entre os sujeitos tratados com dexametasona e os sujeitos Brad e Bia tratados com solução salina. Isso porque estes sujeitos apresentaram apenas um valor muito baixo nos dias que se seguiram as injeções embora, em média, os valores de MFGs não tenham sido tão baixos (Figuras 9 e 10) quanto os dos sujeitos submetidos às injeções de dexametasona (Figuras 7 e 8).

Figura 6: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos dois sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) fêmeas que foram submetidos ao desafio de ACTH no CETAS-PB. A: Eva; B: Loira. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de ACTH. As setas pretas indicam o pico subsequente de MFGs. O asterisco indica o pico associado ao evento externo [vocalizações de atrito em um dos grupos de macacos-prego (*S. flavius*) alojados no CETAS-PB; ver detalhes no texto].

Figura 7: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos três sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) machos que foram submetidos ao desafio de dexametasona no CETAS-PB. A: Fernandinho; B: Moreno; C: Prince. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de dexametasona. Início da supressão hormonal, causada pela dexametasona, indicado pela seta preta.

Figura 8: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos dois sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) fêmeas que foram submetidos ao desafio de dexametasona no CETAS-PB. A: Ciça; B: Dona. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de dexametasona. Início da supressão hormonal, causada pela dexametasona, indicado pela seta preta. Os asteriscos indicam os picos associados ao evento externo [vocalizações de atrito em um dos grupos de macacos-prego (*S. flavius*) alojados no CETAS-PB; ver detalhes no texto].

Figura 9: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra dos dois sujeitos de macaco-prego (*S. libidinosus*) machos que foram submetidos à condição controle no CETAS-PB. A: Brad; B: Negão. A seta vermelha indica o momento em que os sujeitos foram contidos e receberam a injeção de solução salina. A seta preta indica o pico subsequente de MFGs.

Figura 10: Quantidade de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de cada amostra do sujeito de macaco-prego (*S. libidinosus*) fêmea (Bia) que foi submetido à condição controle no CETAS-PB. A seta vermelha indica o momento em que o sujeito foi contido e recebeu a injeção de solução salina. O asterisco indica o pico associado ao evento externo [vocalizações de atrito em um dos grupos de macacos-prego (*S. flavius*) alojados no CETAS-PB; ver detalhes no texto].

Antes de iniciar a apresentação e discussão dos resultados referentes aos gráficos das médias e desvios padrões deve ser salientado que nem sempre foi possível calcular o desvio padrão devido ao fato que em alguns casos apenas uma amostra estava disponível para caracterizar o horário/dia.

As Figuras 11, 12 e 13 mostram as médias e desvios padrão por hora no dia anterior, no dia da aplicação do tratamento e no dia posterior à injeção para cada um dos tratamentos aos quais os sujeitos machos foram submetidos. Já as figuras 14, 15 e 16 são o equivalente para as fêmeas. Tanto para machos quanto para fêmeas, na média, há um aumento dos níveis de MFGs dos sujeitos submetidos ao tratamento de ACTH no dia da injeção (Figuras 11 e 14). Os sujeitos machos e fêmeas submetidos ao tratamento de dexametasona também apresentam valores médios maiores no dia da injeção [Figura 12 e 15; padrão também encontrado em outras espécies como camundongos (*Mus musculus*; Touma *et al*, 2004) e lebre (*Lepus americanus*; Sheriff *et al*, 2009)], no entanto, os valores exibidos no dia seguinte são marcadamente baixos em relação aos dois dias anteriores, mostrando o efeito da dexametasona (i.e., supressão do eixo HPA; Carroll *et al*, 1980). Já os sujeitos submetidos à injeção de solução salina não apresentam nem picos nem quedas drásticas dos níveis de MFGs (Figura 13 e 16).

Figura 11: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de três macacos-prego (*S. libdinusus*) machos submetidos à injeção de ACTH, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (22/out); no dia das injeções (23/out) e um dia após as injeções (24/out). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção. Os asteriscos indicam os picos associados à injeção de ACTH.

Figura 12: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de três macacos-prego (*S. libdinusus*) machos submetidos à injeção de dexametasona, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (22/out); no dia das injeções (23/out) e um dia após as injeções (24/out). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

Figura 13: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinusus*) machos submetidos à injeção de solução salina, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (22/out); no dia das injeções (23/out) e um dia após as injeções (24/out). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

Figura 14: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinusus*) fêmeas submetidas à injeção de ACTH, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (25/fev); no dia das injeções (26/fev) e um dia após as injeções (27/fev). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção. Os asteriscos indicam os picos associados à injeção de ACTH. A seta indica o horário da injeção.

Figura 15: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libdinusus*) fêmeas submetidas à injeção de dexametasona, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (25/fev); no dia das injeções (26/fev) e um dia após as injeções (27/fev). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

Figura 16: Valores médios de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de dois macacos-prego (*S. libidinosus*) fêmeas submetidas à injeção de solução salina, em cada um dos horários em que houve coleta de fezes, no dia que antecedeu as injeções (25/fev); no dia das injeções (26/fev) e um dia após as injeções (27/fev). As linhas verticais correspondem ao desvio padrão. A seta indica o horário da injeção.

4.1.2. CLAE

O CLAE mostra que as duas espécies (*S. nigritus* e *S. libidinosus*) apresentam perfis de MFG muito semelhantes. Machos e fêmeas também produzem os mesmos MFGs. Na Figura 17 pode-se observar que um dos dois picos principais de MFG coincide com o cortisol padrão utilizado no exame.

Figura 17: Separação dos MFG de *S. libidinosus* e *S. nigritus*, por CLAE de fase reversa. Com determinação de imunoreatividade por EIA. A: fêmeas e B: machos. As frações marcadas com o triângulo aberto representam o tempo de eluição dos padrões (cortisol e corticosterona).

4.2 Determinação de Níveis Basais de MFGs de Populações Selvagens e Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais

4.2.1 Determinação de Níveis Basais

4.2.1.2 Formas de se calcular o nível basal

Para verificar como o método de cálculo dos níveis basais proposto aqui (remoção apenas dos *outliers* selvagens) se comporta em relação aos demais, a seguir são apresentados os resultados obtidos a partir das três formas de determinação deste valor.

4.2.1.2.1 Retirada de *outliers* selvagens (método 1):

Os valores basais para as classes sexo/etárias de cada grupo e população, obtidos pelo método de retirada dos *outliers* selvagens encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Valores basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) calculados pelo método de retirada dos *outliers* selvagens. Os dados são apresentados para as classes sexo/etárias dos diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV), bem como valores médios calculados para cada grupo e população.

		PECB			FBV	
		Benjamin	Testa	Pitoco	Chicão	Zangado
Macho	infante	-	-	-	-	-
	juvenil	-	-	-	2,56	1,84
	subadulto	0,86	0,71	-	1,99	1,43
	adulto	0,76	1,16	-	4,96	10,74
Fêmea	infante	-	-	-	5,14	-
	juvenil	-	-	-	3,99	1,02
	subadulto	1,54	-	-	-	-
	adulto	0,83	0,71	-	4,30	4,14
sexo não determinado	infante	1,25	-	-	-	-
	juvenil	0,86	0,74	-	-	-
Média Grupo		1,02	0,83	1,93	3,82	3,83
Média População		1,26			3,83	

4.2.1.2.2 Retirada de *outliers* (método 2):

Os valores basais para as classes sexo/etárias de cada grupo e população, obtidos pelo método de retirada dos *outliers* encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Valores basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) calculados pelo método de retirada dos *outliers*. Os dados são apresentados para as classes sexo/etárias dos diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV), bem como valores médios calculados para cada grupo e população.

		PECB			FBV	
		Benjamin	Testa	Pitoco	Chicão	Zangado
Macho	infante	-	-	-	-	-
	juvenil	-	-	-	1,79	1,36
	subadulto	0,68	0,49	-	1,55	1,43
	adulto	0,46	1,07	-	2,64	9,80
Fêmea	infante	-	-	-	3,74	-
	juvenil	-	-	-	3,70	1,02
	subadulto	1,54	-	-	-	-
	adulto	0,72	0,68	-	2,77	3,26
sexo não determinado	infante	1,05	-	-	-	-
	juvenil	0,86	0,69	-	-	-
Média Grupo		0,88	0,73	0,94	2,70	3,37
Média População		0,85			2,30	

4.2.1.2.3 Mediana (método 3):

Os valores basais para as classes sexo/etárias de cada grupo e população, obtidos pelo método da mediana encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Valores basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) calculados pelo método da mediana. Os dados são apresentados para as classes sexo/etárias dos diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV), bem como medianas calculadas para cada grupo e população.

		PECB			FBV	
		Benjamin	Testa	Pitoco	Chicão	Zangado
Macho	infante	-	-	-	-	-
	juvenil	-	-	-	1,74	1,00
	subadulto	0,94	0,61	-	1,53	1,46
	adulto	0,48	0,86	-	2,85	5,98
Fêmea	infante	-	-	-	3,27	-
	juvenil	-	-	-	3,59	1,22
	subadulto	1,47	-	-	-	-
	adulto	0,78	0,65	-	2,86	4,17
sexo não determinado	infante	1,13	-	-	-	-
	juvenil	0,76	0,62	-	-	-
Média Grupo		0,85	0,64	2,72	2,86	1,46
Média População		0,85			2,16	

4.2.1.2.4 Comparação entre os métodos

A figura 18 apresenta os valores obtidos para cada grupo e para as populações nos diferentes métodos de determinação dos níveis basais. Depreende-se dela que os três métodos de cálculo do nível basal geram valores semelhantes para as duas populações (FBV e PECB) e para a maioria dos grupos, com exceção do grupo Zangado. Neste grupo o nível basal encontrado pelo método 3 (mediana) é menos da metade do encontrado pelos outros métodos. Correlações de Spearman realizadas par a par entre os diferentes métodos sustentam que os três métodos produzem resultados semelhantes, e que o método 3 é o mais destoante (Tabela 10). Níveis basais determinados pelos métodos 1 e 2 são significativamente e altamente correlacionados, enquanto que o método 3 não se correlaciona com os demais métodos. No entanto, se os valores do grupo Zangado (removido por apresentar desvio padrão elevado em comparação com os demais grupos; ver Figura 18) não forem considerados na correlação de Spearman (Tabela 11), todos os métodos se mostram significativamente e altamente correlacionados. Resumindo, os três métodos geram resultados semelhantes, na ausência de dados com desvio padrão elevado.

Em relação às classes sexo/etárias, os resultados obtidos através dos diferentes métodos de cálculo dos níveis basais mostram resultados equivalentes, novamente favorecendo a ideia de que eles geram resultados semelhantes.

Figura 18: Valores basais calculados pelos três métodos mencionados no texto (método 1 – retirada de *outliers* selvagens; método 2 – retirada de *outliers*; método 3 – mediana). Os dados são apresentados para os diferentes grupos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no PECB e *S. libidinosus* na FBV)(em cinza), bem como médias populacionais (em preto).

Tabela 10: Correlações de Spearman entre os diferentes métodos de determinação de níveis basais de MFGs. Método 1: retirada de *outliers* selvagens; método 2: retirada de *outliers*; método 3: determinação da mediana. O valor de p em **negrito** é considerado significativo ao nível de 5%.

	Spearman (ρ)	P
método 1 X método 2	0,95	0,00
método 1 X método 3	0,69	0,08
método 2 X método 3	0,66	0,10

Tabela 11: Correlações de Spearman entre os diferentes métodos de determinação de níveis basais de MFGs sem os dados referentes ao grupo Zangado (FBV). Método 1: retirada de *outliers* selvagens; método 2: retirada de *outliers*; método 3: determinação da mediana. O valor de p em **negrito** é considerado significativo ao nível de 5%.

	Spearman (ρ)	P
método 1 X método 2	0,94	0,01
método 1 X método 3	0,81	0,04
método 2 X método 3	0,81	0,04

4.2.2 Diferenças entre populações

A análise MLGM mostrou que as populações da FBV e do PECB têm médias basais de MFGs significativamente diferentes ($F=34,51$; $p<0,01$), sendo que o PECB apresenta uma média inferior à da FBV (1,04 e $3,64\mu\text{g/g}$ de fezes úmidas, respectivamente). Não houve diferença significativa entre grupos tanto na população do PECB ($F=0,11$; $p=0,74$), quanto na população da FBV ($F=0,03$; $p=0,85$).

4.2.3 Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais

Para verificar se as variáveis ambientais e comportamentais medidas explicam a variabilidade encontrada entre os perfis hormonais das populações, foram realizadas análises estatísticas e descritivas que buscavam avaliar o efeito de dados ambientais (pluviosidade, biomassa de frutos, biomassa de invertebrados, temperatura mensal máxima, temperatura mensal mínima e estação do ano) e comportamentais (interação agonística dentro do grupo; briga entre grupos; encontro com predador; fêmeas proceptivas; outros eventos extraordinários; vocalizações de alarme; cópulas e encontros com outras espécies de animais) sobre os níveis basais de MFGs das duas populações. A seguir seguem os resultados obtidos, separados em itens.

4.2.3 Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais

4.2.3.1 Padrão climático

As variáveis climáticas testadas não afetaram a variação de MFGs das duas populações estudadas. O resultado do MLGM não apontou para um efeito da pluviosidade (PECB: $t = -0,10$; $p = 0,9$; FBV: $t = -1,64$; $p = 0,1$) sobre a média mensal basal de MFGs, em ambas as populações. O gráfico da Figura 19 também não deixa clara nenhuma relação entre estas variáveis. O MLGM também não revelou efeito da temperatura máxima (PECB: $t = -0,00$; $p = 0,9$; FBV: $t = 1,66$; $p = 0,09$) ou da temperatura mínima mensal (PECB: $t = 0,14$; $p = 0,88$; FBV: $t = 0,89$; $p = 0,37$) sobre a média mensal basal de MFGs, em ambas as populações. Da mesma forma, as estações do ano (seca e chuvosa, na FBV e inverno e verão, no PECB) também não exerceram efeito (PECB: $t = 0,3$; $p = 0,7$; FBV: $t = -1,61$; $p = 0,1$) sobre os níveis basais médios mensais de MFGs das duas populações. Os gráficos apresentados nas Figuras 20 e 21 também não sugerem uma relação entre estas variáveis.

Figura 19: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a pluviosidade mensal em ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 20: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) da população de macacos-prego (*S. libidinosus*) da FBV - PI, bem como a temperatura máxima atingida em cada mês nesta área de estudo, ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10). As barras ao fundo em tons de cinza mostram as duas estações do ano (seca: cinza claro; chuvosa: cinza escuro)

Figura 21: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) da população de macacos-preto (*S. nigritus*) do PECB - SP, bem como a temperatura mínima atingida em cada mês nesta área de estudo, ao longo de dezoito meses (jan/09 a jun/10). As barras ao fundo em tons de cinza mostram as duas estações do ano (inverno: cinza claro; verão: cinza escuro).

4.2.3.2 Disponibilidade de alimento

A biomassa de invertebrados também não exerceu efeito sobre os níveis basais médios mensais de MFGs (PECB: $t = -0,46$; $p = 0,6$; FBV: $t = 0,61$; $p = 0,5$), e o gráfico da Figura 22 corrobora este resultado estatístico. Já a biomassa de frutos apresenta efeito sobre os níveis basais médios de MFGs da população da FBV (PECB: $t = -0,46$; $p = 0,6$; FBV: $t = 0,61$; $p = 0,5$). No entanto, o gráfico da Figura 23 não evidencia o resultado do teste estatístico.

Figura 22: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a biomassa mensal de invertebrados em ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 23: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a biomassa mensal de frutos em ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

4.2.3.3 *Taxas Comportamentais*

Os resultados do MLGM (interação agonística dentro do grupo - PECB: $t = 0,64$; $p = 0,52$; FBV: $t = 0,41$; $p = 0,68$; interação agonística entre grupos - PECB: $t = - 0,18$; $p = 0,85$; FBV: $t = - 1,89$; $p = 0,06$; encontro com predador - PECB: $t = - 0,04$; $p = 0,96$; FBV: $t = 0,22$; $p = 0,83$; fêmeas proceptivas - PECB: $t = 0,01$; $p = 0,99$; FBV: $t = 1,5$; $p = 0,13$; outros eventos extraordinários - PECB: $t = 0,04$; $p = 0,97$; FBV: $t = - 0,27$; $p = 0,79$; vocalizações de alarme - PECB: $t = - 0,52$; $p = 0,6$; FBV: $t = - 0,48$; $p = 0,63$) e das análises descritivas (Figuras 24 a 29) mostram que a maioria das variáveis comportamentais não interfere nas médias mensais basais de MFGs das duas populações. No entanto, cópulas e encontros com outras espécies de animais tem efeito positivo sobre os níveis basais de MFGs dos sujeitos da FBV (cópulas - PECB: $t = - 0,16$; $p = 0,87$; FBV: $t = 2,99$; $p = 0,00$; encontros com outras espécies de animais - PECB: $t = - 0,55$; $p = 0,58$; FBV: $t = 2,51$; $p = 0,01$), apesar disso não ser claro através da análise descritiva (Figuras 30 e 31).

Figura 24: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de interações agonísticas entre os integrantes de cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 25: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de interações agonísticas entre os grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 26: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de encontro com predadores de cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 27: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (quantidade de fêmeas em período proceptivo X quantidade de dias/mês) de fêmeas em período proceptivo em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 28: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de outros eventos estressantes em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 29: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de vocalizações de alarme de cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 30: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de cópulas em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

Figura 31: Valores médios mensais basais de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV), bem como a média populacional mensal da taxa (eventos/hora) de encontros com outras espécies em cada grupo de ambas as áreas de coleta ao longo de dois anos (jan/09 a dez/10).

4.2.4 Análises individuais

A Tabela 12 mostra que interações agonísticas entre integrantes do grupo (interações agonísticas no grupo, ameaçou, foi ameaçado, agrediu) são os eventos que mais comumente causaram picos de MFGs nos sujeitos estudados (39 dos 84 picos que foram associados a um evento). Vocalizações de alarme foram responsáveis por 12 dos 84 picos (quatro destes associados a interações agonísticas).

Os períodos proceptivos das fêmeas e as cópulas foram responsáveis por picos em machos adultos, machos juvenis e nas próprias fêmeas (16 dos 84 picos associados a um evento). Outros eventos menos frequentes também foram associados a picos, sendo eles: encontros com outros grupos de macacos-prego (3 dos 84 picos associados a um evento); encontros com grupos de muriquis (2 de 84); influência do observador, seja através de experimentos (2 de 84 - experimento que buscava saber se os sujeitos eram capazes de reconhecer sua imagem refletida em um espelho), seja meramente por sua presença (2 de

84 – ameaças a pesquisadores); filhote recém-nascido no grupo (3 de 84; sendo que duas fêmeas tiveram picos associados a um mesmo filhote); influência antrópica (3 de 84) sendo ela através de latido de cachorro (2 de 84) e grito de pessoa (1 de 84); a aceitação de um macho sub-adulto no grupo (1 de 84) que causou um pico de MFGs em outro macho sub-adulto daquele grupo; e a vocalização de encontro entre machos adultos (1 de 84), em um período em que a dominância do grupo estava instável.

Além disso, os diversos eventos que foram observados afetaram os sujeitos de maneiras diferentes. Alguns exemplos são: 1) a presença de um filhote recém-nascido, que causou picos de GCs em fêmeas adultas (Chuchu e Dita), mas não em machos ou juvenis; 2) o sujeito Jatobá, que passou a apresentar picos quando as fêmeas do grupo estavam em período proceptivo, apenas após ter assumir a dominância do grupo; 3) o macho sub-adulto Júnior, que apresentou pico de GCs, quando um novo indivíduo foi aceito no grupo (outro macho sub-adulto); 4) um encontro com outros grupos de macacos-prego no PECB, que estressou somente o macho dominante (Benjamim).

Tabela 12: Outliers selvagens dos indivíduos de duas populações de macacos-prego (*S. nigritus* no Parque Estadual Carlos Botelho - PECB e *S. libidinosus* na Fazenda Boa Vista - FBV) e respectivos eventos relacionados a eles. Os sujeitos encontram-se agrupados de acordo com o grupo ao qual pertencem (Benjamin e Testa são os grupos do PECB e Zangado e Chicão pertencem a FBV). Os outliers selvagens estão descritos através do número da amostra de fezes ao qual correspondem, data e horário de coleta da mesma. Sempre que possível o horário do evento foi apresentado. Os traços indicam a inexistência de outliers selvagens ou de eventos relacionados a estes.

GRUPO	INDIVÍDUO		OUTLIERS SELVAGENS		EVENTO RELACIONADO	HORÁRIO
Benjamin	Benjamin	18	16/05/2009	07:55	Encontro com outro grupo de macacos-prego	
		28	24/06/2009	09:30	Encontro com grupo de muriquis	
		33	03/07/2009	08:10	Encontro com outro grupo de macacos-prego	
		58	20/03/2010	15:20	Interações agonísticas no grupo	11:23
					Cópula com fêmea adulta	11:25
	Ceni	14	23/03/2010	08:35	-	
		15	23/03/2010	13:20	Ameaçou pesquisador	11:20
					Catção e posturas proceptiva com fêmea adulta	09:30
	Elis	5	19/05/2009	11:40	Interações agonísticas no grupo	09:02
		23	16/12/2009	09:15	Encontro com grupo de muriquis	07:00
		27	20/03/2010	11:18	-	
		28	25/03/2010	10:40	-	
	Olívia	-				
	Ruiva	-				
Testa	Rambo	-				
	Senna	-				
	Testa	1	03/07/2009	10:45	-	
Zangado	Café	20	10/10/2009	07:53	-	
		21	10/10/2009	12:47	Foi ameaçado por um infante	08:28
					Ameaça fêmea adulta	08:48
		29	07/07/2010	09:38	Vocalização de alarme e interações agonísticas no grupo	07:43
	Dunga	19	13/10/2009	09:04	Vocalização de alarme e interações agonísticas no grupo	07:34
	Elisa	20	04/05/2010	15:40	Interações agonísticas no grupo	
	Júnior	15	05/05/2010	07:44	Um novo macho sub-adulto foi aceito no grupo	
	Kiko	-				

Continuação

Zangado	Luiz	-				
	Márcio	1	04/09/2009	09:34	Vocalização de alarme	08:39
	Moça Branca	10	31/08/2009	11:33	Vocalização de alarme e interações agonísticas no grupo	08:59
	Moça Chita	23	04/10/2010	10:27	-	
	Zangado	-				
Chicão	Amarelinha	21	16/02/2010	08:24	Ameaçou macho adulto por alimento	07:13
	Caboclo	13	06/07/2009	11:44	Foi ameaçado por macho adulto	08:28
		21	12/09/2009	09:08	-	
		25	03/12/2009	07:30	Foi ameaçado por três integrantes do grupo	07:30
	Cangaceiro	31	15/10/2009	15:07	Cópulas entre macho adulto e fêmea adulta	14:27
		41	04/12/2009	07:20	-	
		72	08/04/2010	07:16	Fêmea adulta em período proceptivo	06:55
		77	12/04/2010	14:56	Ameaçou pesquisador	14:10
		107	14/10/2010	08:03	Retornou com machucado na pata dianteira após dias longe	
		112	08/11/2010	08:08	-	
		115	10/11/2010	07:17	-	
	Catu	21	11/11/2009	07:23	Vocalização de alarme	06:58
		26	02/12/2009	09:34	-	
		33	13/01/2010	08:40	-	
		59	28/06/2010	10:01	Foi ameaçado por juvenil Fêmea adulta em período proceptivo	07:07
		68	07/11/2010	14:41	Vocalização de alarme para latido de cachorro	11:06
		69	08/11/2010	08:24	-	
	Chuchu	8	08/07/2009	11:32	Vocalização relacionadas a interações agonísticas o dia todo	06:34
		11	24/07/2009	08:14	Interações agonísticas no grupo	
		69	11/10/2010	10:39	-	
		76	11/11/2010	08:58	Ameaçou macho adulto Ameaçou juvenil	07:58 08:30
		80	09/12/2010	11:55	Faz <i>lipsmacking</i> * em filhote recém-nascido	10:00
		81	09/12/2010	14:27	Faz <i>lipsmacking</i> * em filhote recém-nascido	10:15

Continuação

Chicão	Coco	12	08/11/2010	14:56	-	
	Dita	3	27/01/2009	09:10	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	07:32
		6	29/01/2009	09:03	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	06:54
		28	05/12/2009	08:50	-	
		29	04/01/2010	11:49	Vocalizações de alarme	08:49
		32	11/01/2010	08:34	Ameaçou juvenil	07:14
	Doree	68	09/12/2010	09:15	Filhote recém-nascido no grupo	
		49	08/11/2010	07:37	-	
		53	11/11/2010	08:25	Vocalizações de alarme	07:46
	Jatobá	27	26/08/2009	12:58	Fêmea adulta em período proceptivo	10:24
					Vocalizações de encontro	07:16
		30	11/09/2009	09:55	Fêmea adulta em período proceptivo	
		51	28/06/2010	09:49	Fêmea adulta em período proceptivo	
					Interação agonística com macho adulto	09:45
		53	12/07/2010	09:40	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	08:23
		54	13/07/2010	08:43	Fêmea adulta em período proceptivo	
		55	14/07/2010	09:09	Fêmea adulta em período proceptivo	
					Fêmea adulta em período proceptivo	
		56	15/07/2010	17:27	Ameaçou macho adulto	13:08
					Grupo assustado com o grito de uma pessoa	13:53
		57	06/08/2010	11:47	Fêmea adulta em período proceptivo	
					Experimento com espelho	
		58	06/08/2010	17:03	Cópula entre macho adulto e fêmea adulta	12:42
					Experimento com espelho	
		60	12/08/2010	10:03	Agrediu fêmea adulta	09:23
		69	07/11/2010	14:06	Vocalização de alarme para latido de cachorro	11:06
	Mancinho Pati	30	12/11/2009	07:35	Vocalizações de alarme na noite anterior e pela manhã	
		11	21/07/2009	10:40	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	
		13	23/07/2009	09:35	Vocalização de alarme e interações agonísticas no grupo	07:17
		83	10/11/2010	07:17	-	
		84	11/11/2010	08:22	-	

Continuação

Chicão	Piaçava	1	26/01/2009	14:20	Em período proceptivo	
		2	27/01/2009	13:29	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	07:32
		3	28/01/2009	10:25	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	07:42
		5	29/01/2009	09:58	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	06:54
		14	10/09/2009	09:26	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	08:36
		47	16/07/2010	08:59	Em período proceptivo	
	Teimoso	50	14/10/2010	09:00	Interações agonísticas no grupo na noite anterior e pela manhã	
		25	15/06/2010	09:34	Interações agonísticas no grupo. Expulsaram macho adulto no dia anterior	
	Teninha				Estava prenhe	
		3	27/08/2009	12:49	Interações agonísticas e vocalizações de alarme no grupo o dia inteiro	
	Tomate	5	12/09/2009	09:44	Estava prenhe	
		16	01/12/2009	14:00	Se envolveu em conflitos agonísticos por alimento, com adultos do grupo	09:19
		20	05/01/2010	09:17	-	
		26	14/01/2010	07:55	-	
		46	07/11/2010	07:27	-	
	Tucum	6	17/06/2009	10:45	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	06:59
		8	06/07/2009	08:14	-	
		15	25/08/2009	11:51	Foi ameaçado por macho adulto	07:22
					Foi ameaçado por macho adulto dominante	07:33
		18	09/09/2009	08:32	Interações agonísticas no grupo a manhã toda	07:06
					Fêmea adulta em período proceptivo	
		23	16/10/2009	14:50	Encontro de grupos	10:02
		40	19/02/2010	08:03	Interações agonísticas e vocalizações de alarme no grupo pela manhã	06:57
		42	03/03/2010	09:05	Interações agonísticas no grupo pela manhã	07:06

* Comportamento ritualizado, comum em contextos afiliativos, em que os lábios se movem como em um beijo ou como no movimento de sucção mamária.

5. DISCUSSÃO

5.1 Validação Fisiológica do Método de Extração e Dosagem Hormonal

5.1.1 Desafio de ACTH e Dexametasona

Os três tipos de análises apresentados neste item tiveram por objetivo descrever o mesmo fenômeno de formas distintas, apresentando o mesmo evento através de parâmetros diferentes e complementares (Dantzer *et al*, 2010; Heintz *et al*, 2011; Goymann *et al*, 1999). Os picos nos níveis de MFGs observados após a injeção de ACTH, a supressão dos níveis de MFGs após a aplicação da dexametasona e a ausência de variação acentuada nos níveis de MFGs nos sujeitos submetidos à solução salina indicam que os fármacos induziram os efeitos observados, o que corrobora a validação fisiológica do protocolo experimental de extração e dosagem de MFGs (Touma e Palme, 2005; Palme, 2005; Touma *et al*, 2004) para machos e fêmeas de *S. libidinosus*. Embora não tenha sido realizado um desafio de ACTH e dexametasona para *S. nigritus*, os resultados obtidos pelo CLAE – item 4.1.2 – mostram que ambas as espécies produzem metabólitos de glicocorticóides, se não iguais, muito semelhantes, sugerindo, portanto, que o protocolo experimental é válido para as duas espécies.

Além disso, a ocorrência de picos de MFGs na grande maioria dos sujeitos experimentais aproximadamente quatro horas após um evento estressor espúrio (resposta ao encontro entre um visitante e um macaco prego de outro recinto) corrobora a conclusão de que o protocolo de extração e dosagem hormonal aplicado é capaz de detectar alterações biologicamente significativas nos níveis de MFGs (Touma e Palme, 2005). Cabe ressaltar que a única fêmea a não apresentar o pico de MFGs após este evento estressor era também o único sujeito experimental proveniente de residência humana. Embora temerário assumir qualquer relação de causa e efeito neste caso, é sugestivo pensar que aquele indivíduo que não conviveu a com animais de sua espécie aparentemente não apresentou resposta de estresse empática ao estresse de co-específicos.

Outra conclusão importante gerada por este experimento foi sobre o tempo necessário para que os glicocorticóides liberados na corrente sanguínea fossem excretados como metabólitos nas fezes. Tanto o pico de MFGs observado na maioria dos sujeitos após um evento estressante espúrio (interação entre um visitante e um sujeito alojado em um recinto), quanto a maioria dos picos de MFGs apresentados pelos animais após as injeções dos fármacos, se deu aproximadamente quatro horas após os respectivos eventos. B. Wheeler (comunicação pessoal) também realizou um desafio de ACTH com macacos-prego cativos (*Cebus sp.*) - um macho e uma fêmea - e encontrou resultados parecidos. Seus sujeitos apresentaram pico entre duas e três horas após a injeção.

Vale lembrar que neste experimento, a coleta de fezes se deu das 07:00 às 17:30 h, não tendo ocorrido durante a noite. Poderia-se pensar que alguma variação importante nos níveis de MFGs deixaria de ser amostrada por este motivo. No entanto, todos os picos de MFGs referentes aos eventos observados durante o dia e as injeções dos fármacos foram devidamente amostrados. Isso porque, o tempo de passagem dos alimentos pelo trato intestinal destes animais é curto e os MFGs aparecem nas fezes de quatro a cinco horas depois de serem liberados no sangue.

Este dado nos ajuda a analisar os resultados obtidos no campo, uma vez que, até o momento, era desconhecido o tempo necessário para que os glicocorticóides excretados durante um evento estressante fossem metabolizados e encontrados nas fezes. Por exemplo, Moreira (2010), estudando a mesma população de *S. nigritus* do presente estudo, observou que, nas primeiras horas do dia (no período das 6 às 10hs da manhã), os níveis de MFGs de seus sujeitos eram mais altos do que no restante do dia. Esse pico foi associado a uma variação diurna dos níveis de glicocorticóides, como proposto por Torres-Farfán e colaboradores (2008) e Kriegsfeld & Silver (2006). No entanto, a interpretação desses dados poderia ser errônea se o tempo para excreção dos glicocorticóides circulantes fosse maior que quatro horas e menor que 24 horas. Os resultados do desafio de ACTH e dexametasona sugerem que a interpretação dos dados foi acertada e que, no despertar, os sujeitos sofrem uma elevação dos níveis de glicocorticóides circulantes e, em média quatro horas após, os metabólitos de glicocorticóides já podem ser encontrados em suas fezes. Além disso, Moreira (2010) não encontrou correlação entre eventos estressantes observados em Todas as Ocorrências e níveis de MFGs dos macacos-prego do PECB. No entanto, com a coleta oportunística de fezes, assim como no presente trabalho, a

probabilidade de se coletar uma amostra fecal do(s) animal(is) envolvido(s) no evento estressante, entre duas e cinco horas após o evento, é relativamente pequena. Mais uma vez, os resultados da presente pesquisa contribuem para uma interpretação mais acurada dos dados da pesquisa anterior.

5.1.2 CLAE

O resultado do CLAE mostra que um dos picos gerados pelas amostras analisadas coincide com o cortisol padrão utilizado na análise. No entanto, isso não significa que o que os sujeitos excretam é realmente cortisol (ao invés de um metabólito), já que existem pelo menos quatro outros metabólitos de cortisol (5α dihidro e tetrahydrocortisol, e 5β dihidro e tetrahydrocortisol) que eluem muito próximo a esta posição. Ou seja, os animais podem excretar tanto o cortisol quanto qualquer um desses quatro metabólitos.

A realização de um desafio de ACTH e dexametasona comparativo, com sujeitos de ambas as espécies (*S. nigritus* e *S. libidinosus*), e com coletas não só de fezes, mas também de sangue, seria necessária para provar que a quantidade de glicocorticóides que cada uma das espécies libera no sangue, e que encontramos nas fezes, é equivalente. Isso porque o anticorpo anti-cortisol utilizado no EIA é policlonal, sendo que a afinidade que cada metabólito tem a ele não é plenamente conhecida. Assim, por exemplo, se uma das espécies produzisse um pouco mais de um dado metabólito que tivesse alta afinidade ao anticorpo, poderia ser concluído erroneamente que essa espécie libera mais glicocorticóides que a outra. No entanto, o resultado do CLAE mostra que os perfis de MFGs de ambas as espécies e dos diferentes sexos são semelhantes, indicando que a metabolização dos glicocorticóides por *S. nigritus* e *S. libidinosus* seja semelhante. Vale lembrar que até poucos anos atrás as duas espécies eram consideradas a mesma espécie e casais híbridos, em cativeiro, são capazes de produzir descendentes férteis, assim como há hibridização na natureza (Silva Jr., 2001). Estes resultados geram uma grande confiança de que os glicocorticóides são metabolizados da mesma forma por machos e fêmeas das duas espécies, o que permite as comparações interespecíficas de níveis de MFGs realizadas neste trabalho.

5.2 Determinação de Níveis Basais de MFGs de Populações Selvagens e Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais

5.2.1 Determinação de Níveis Basais

Os resultados apresentados neste trabalho quanto aos três métodos utilizados para o cálculo no nível basal mostram que os níveis determinados por eles são semelhantes quando baseados em uma amostra com desvio padrão baixo. Desta forma, a utilização do método adotado neste trabalho é adequada.

A análise estatística realizada mostrou que os níveis basais de MFGs das duas populações estudadas são significativamente diferentes. Tal resultado implica, ao menos momentaneamente, na impossibilidade de definir um valor basal de MFGs para o gênero *Sapajus*. Além disso, supôs-se que se os níveis basais de GCs de macacos-prego estão relacionados às condições de disponibilidade de recursos alimentares, hídricos, temperatura, estrutura social, ou a qualquer fator decorrente destas condições, seria encontrado um efeito dessas variáveis sobre a variação interpopulacional dos níveis de GCs. No entanto, as análises realizadas não identificaram efeito dessas variáveis sobre os níveis basais de MFGs das duas populações, simultaneamente. Ainda, em virtude da natureza dos dados, não é possível precisar se a diferença encontrada entre os níveis basais de MFGs das populações se deve ao fato de: 1. se tratarem de duas espécies distintas; ou 2. serem indivíduos que se desenvolveram em locais com características ambientais distintas, que levaram a adaptações ontogenéticas, tanto comportamentais como fisiológicas; ou 3. a população ter evoluído para características comportamentais e fisiológicas específicas para lidar com as dificuldades impostas pelas características de um determinado ambiente. Em termos da aplicabilidade dos valores de níveis basais de MFGs na avaliação do bem-estar de animais cativos, há fatores agravantes: muitas vezes não é possível determinar a espécie dos sujeitos, bem como sua procedência (fatores estes que aparecem aqui como possivelmente influentes nos níveis de GCs). Outras tantas vezes, encontramos indivíduos nascidos em cativeiro que são híbridos entre espécies do gênero *Sapajus*.

Desta forma, continua-se sem ter uma medida padrão de MFGs que permitiria determinar o bem-estar de um macaco-prego cativo com base em uma única medida. Assim, mais estudos devem ser realizados, com outras populações de macacos-prego, selvagens e cativos, a fim de se verificar qual é a fonte da diferença encontrada neste trabalho em termos de níveis basais de MFGs. Até que estes estudos sejam feitos e deixem claro se o que determina o nível basal de MFGs de um macaco-prego é sua espécie, ambiente atual de vida ou história evolutiva de sua população de origem, as pesquisas que visem medir bem-estar através de dosagens de MFGs devem continuar sendo feitas de forma longitudinal, tendo cada indivíduo como seu próprio controle (Chenili et al., 2006).

Por outro lado, os resultados de níveis basais de MFGs aqui apresentados, podem dar uma ideia, ainda que preliminar, da amplitude de variação entre níveis basais de MFGs de sujeitos de vida livre, dentro do gênero. De modo que se forem encontradas medidas de níveis basais de MFGs de sujeitos cativos, com valores expressivamente maiores que os encontrados na FBV, há uma chance deste animal estar com o bem-estar comprometido. Mais uma vez, vale lembrar que mais pesquisas, com novas populações, são necessárias para que toda a amplitude de variação dos níveis basais de MFGs do gênero *Sapajus* seja conhecida.

5.2.2 Efeito de Fatores Ambientais e Comportamentais

Os resultados dos testes estatísticos realizados identificaram efeitos da biomassa de frutos, da taxa de cópula e da taxa de encontro com outras espécies sobre os níveis basais de MFGs em relação à população de *S. libidinosus* (FBV). O fato destes efeitos se restringirem a uma das populações estudadas exclui a possibilidade destes fatores serem os responsáveis pela diferença significativa encontrada entre os níveis basais de MFGs das populações.

A impossibilidade de visualizar graficamente os resultados estatísticos se deve ao fato dos parâmetros utilizados para a análise estatística e descritiva (gráficos) serem distintos. Os valores plotados nos gráficos das Figuras de 19 a 31 são as médias populacionais mensais de MFGs, enquanto que os valores usados para o teste estatístico foram médias mensais de cada indivíduo de cada população.

Em relação à biomassa de frutos, seu efeito pode ser explicado pela Hipótese da Mobilização Energética (Romero, 2002), a qual propõe que os níveis de glicocorticóides devem se elevar em períodos do ano em que a demanda energética for maior. Verderane (2010), estudando o padrão de movimentação da população de macacos-prego da FBV (mesmos grupos aqui estudados), concluiu que os animais se deslocam mais quando a oferta de frutos é maior. Para tanto, requerem mais energia disponível nos músculos. Assim, os níveis de GCs subiriam quando a biomassa de frutos aumentasse para atingir a demanda energética deste período, relacionada ao deslocamento dos animais.

Ainda sobre o efeito da oferta de frutos nos níveis basais de MFGs, salienta-se que sua distribuição na FBV se dá em manchas, o que o torna um recurso monopolizável e, portanto, gera disputas intragrupais (i.e., hierarquia bem definida entre os integrantes dos grupos e altos índices de interações agonísticas; Izar *et al*, 2012 e Verderane, 2010). Esta informação favorece a Hipótese Comportamental (Romero, 2002) que propõe que a principal função do cortisol em animais selvagens é modular a expressão de comportamentos. Tal hipótese se baseia nos resultados obtidos por Breuner e colaboradores (1998), os quais mostraram que a administração de glicocorticóides em uma espécie de ave do hemisfério norte (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) provoca rápidas mudanças comportamentais (em menos de 15 minutos). Assim, segundo esta hipótese, a necessidade de regular sazonalmente a expressão de certos comportamentos (neste caso disputas intragrupais), é o que condiciona os ritmos dos glicocorticóides.

De acordo com as hipóteses apresentadas acima, uma variação sazonal da biomassa de frutos permitiria, aos animais ali viventes, se adaptarem (evolutiva ou ontogeneticamente) a tal situação, de modo a elevarem seus níveis de cortisol na época em que os frutos são mais abundantes, permitindo a adequação dos comportamentos exibidos (agressividade voltada para defesa dos recursos alimentares: Hipótese Comportamental; e/ou a disponibilização de energia para possibilitar maiores deslocamentos: Hipótese da Mobilização Energética). Já na época em que a biomassa de frutos é menor, os níveis basais de GCs seriam reduzidos a fim de diminuir a agressividade intragrupal e/ou minimizar o gasto energético.

No entanto, a variação na oferta de frutos na FBV não é claramente sazonal. Com base em análises estatísticas, Izar e colaboradores (2012) consideraram a sazonalidade na oferta de frutos nesta população uma tendência (resultado obtido não foi significativo, embora tenha ficado

próximo do nível de significância; $p=0,12$), ou seja, a sazonalidade necessária para explicar as variações nos níveis basais de MFGs talvez não exista na FBV. Além disso, o PECB apresentou as mesmas características quanto à biomassa de frutos que a FBV (i.e. tendência para sazonalidade), mas nesta população, ao contrário da outra, não foi encontrado um efeito da biomassa de frutos sobre os níveis basais de MFGs. Em outras palavras, em termos da variação de biomassa de fruto, as duas áreas são equivalentes, logo, para que as hipóteses explicassem as variações dos níveis de GCs de macacos pregos selvagens das duas populações, seria necessário encontrar em ambas um efeito significativo da biomassa de frutos nos níveis basais de MFGs.

Assim, a variável ambiental (biomassa de frutos) e as comportamentais (cópula e encontro com outras espécies) com efeitos significativos nos níveis basais de MFGs na FBV favorecem a seguinte hipótese alternativa: as elevações observadas nos níveis basais mensais de cada população se relacionam a eventos estressores pontuais que foram capazes de elevar os níveis de MFGs da maioria (se não de todos) os indivíduos de uma dada população, “arrastando” o valor do nível basal mensal consigo.

Isso porque cópula e encontro com outras espécies são estressores que afetam se não a todos, à grande maioria dos integrantes do grupo. Estes comportamentos geram uma excitação coletiva que deve ser capaz de elevar os níveis de GCs de muitos indivíduos, de forma que nos meses em que estes estressores forem mais frequentes, os níveis de MFGs medidos serão mais altos e mesmo com a exclusão dos *outliers* selvagens, notaremos um aumento nos níveis basais de MFGs. Já os estressores encontro com predador, interação agonística com outros grupos e outros eventos extraordinários, embora também afetem muitos indivíduos, ocorrem raramente, não apresentando, portanto, frequência suficiente para elevar significativamente os níveis mensais de MFGs das populações. As vocalizações de alarme, apesar de parecerem frequentes, também entram nesta categoria por serem muitas vezes desconsideradas pelo grupo (vocalizações realizadas por infantes e juvenis são muitas vezes falsas. É comum ver estes indivíduos exibindo vocalizações de alarme para aves inofensivas – observação pessoal). Por outro lado alguns estressores não envolvem todos os integrantes do grupo. É o caso das interações agonísticas, que costumam envolver de dois a quatro integrantes por evento, além de serem muitas vezes evitadas em grupos com a hierarquia bem definida (Deag, 1977). Além disso, fêmeas que apresentam

comportamento proceptivo, nem sempre se encontram em período propício para a cópula sendo, portanto, ignoradas pelo grupo (Phillips et al, 1995; Manson et al, 1997).

O efeito de oferta de fruto sobre os níveis basais de MFGs também é contemplado nesta hipótese, mas sem o caráter sazonal exigido pelas hipóteses da Mobilização Energética e Comportamental. Isso porque sabemos que na FBV os frutos se distribuem em manchas (Verderane, 2010), constituindo um recurso monopolizável que leva a interações agonísticas intragrupais. Assim, a elevação na biomassa de frutos estaria associada a um aumento nas interações agonísticas entre integrantes de um mesmo grupo, levando a um incremento dos níveis basais de MFGs.

Por último, salienta-se que esta hipótese se baseia em dados coletados ao longo de dois anos e pesquisas baseadas em conjuntos de dados temporalmente mais extensos são necessárias para dar maior suporte a ela.

5.2.3 Análises Individuais

Os resultados desta análise mostram que uma grande gama de fatores, desde intrínsecos aos grupos até extrínsecos a eles, é capaz de gerar picos de GCs em macacos-prego selvagens. Era esperado que alguns deles, devido ao claro distúrbio que geram nos grupos/indivíduos, tivesse um efeito sobre os níveis de GCs, como por exemplo, interações agonísticas no grupo, instabilidade na dominância, vocalizações de alarme. Por outro lado, certos fatores, mesmo não desencadeando reações marcantes nos grupos/indivíduos, resultaram em picos de GCs (presença de um filhote recém-nascido ou aceitação de um novo integrante no grupo). Além disso, os resultados mostram que a influência antrópica na FBV, conforme indicada por Izar e colaboradores (2012), tem um efeito nas variações dos níveis de MFGs. Ainda, depreende-se dos resultados que cada indivíduo reage de forma muito particular a diferentes fatores, sendo às vezes, um deles estressor para um animal e não para outro. Também há diferença, evidentemente, na abrangência dos fatores que por vezes afetam todo o grupo e às vezes possuem efeito pontual, mas mesmo os fatores de ampla atuação nem sempre geram respostas em todos os animais envolvidos.

Pesquisas com uma coleta de dados mais extensa são necessárias para confirmar os resultados aqui encontrados e verificar se outros eventos podem ser causadores de estresse.

6. CONCLUSÕES

Os objetivos de estudos que investigam a fisiologia do estresse de primatas vão desde prover entendimento e, conseqüentemente, melhoramento do bem-estar e da reprodução de animais cativos (Machatschke et al., 2006; Ulyan et al., 2006), até a formação de uma base para o monitoramento de impactos ambientais e sociais de estressores no comportamento, saúde e reprodução de populações selvagens (Bahr et al., 2000; Chapman et al., 2006; Martínez-Mota et al., 2007). O presente trabalho buscou contribuir com esta linha de pesquisa, visando validar um protocolo experimental de dosagem de hormônios ligados ao estresse (que permite monitorar o bem-estar de forma não invasiva); definir um nível basal de MFGs para o gênero *Sapajus* e determinar os agentes estressores de macacos-prego de vida-livre. As principais conclusões foram:

- 1) Os dados obtidos permitiram validar o protocolo experimental de extração e dosagem hormonal de MFGs para duas espécies de macacos-prego (*S. libidinosus* e *S. nigritus*).
- 2) A partir dos resultados obtidos pela dosagem hormonal das fezes de sujeitos selvagens de duas populações do gênero *Sapajus*, concluiu-se que não é possível definir um nível basal de MFGs para este gênero, pois a diferença apresentada entre os sujeitos destas duas populações é estatisticamente significativa. A busca por uma causa para tal diferença foi infrutífera, no entanto as análises deixaram claro que eventos capazes de estressar todo um grupo modificaram os níveis basais mensais. Considerando estes eventos como ruídos nos níveis basais de MFGs, sugere-se que pesquisas com coletas de dados ainda mais extensas sejam realizadas para determinar se as hipóteses da Mobilização Energética e Comportamental (Romero, 2002) devem ou não ser descartadas para estas populações.

3) As análises individuais realizadas sugerem que as interações agonísticas entre integrantes do grupo foram o principal evento relacionado a picos de MFGs nos sujeitos estudados. Outros fatores importantes no desencadeamento de picos de MFGs fora os períodos proceptivos das fêmeas, as cópulas e as vocalizações de alarme. Encontros com outros grupos de macacos-prego, encontros com grupos de muriquis, influência do observador, filhote recém-nascido no grupo, influência antrópica, aceitação de novos indivíduos no grupo e períodos de dominância instável, foram eventos menos comuns, mas também associados a picos de MFGs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, D. H., Keverne, E. B., Bercovitch, F. B., Shively, C. A., Mendoza, S. P., Saltzman, W. (2003). Are subordinates always stressed ? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior*, 43, 67- 82.

Ahrens, F., Knies, K., Schneider, M., Köhler, F., Erhard, M. H. (2005). Influence of different training and outdoor conditions on plasma histamine and cortisol concentrations in search-and-rescue dogs. *Inflammation Research*, 1, 34-35.

Altmann, J. (1974). Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour*, 49, 227-265.

Anestis, S. F. (2005). Behavioral style , dominance rank , and urinary cortisol in young chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Behaviour*, 142, 1245-1268.

Bahr, N. I., Palme, R., Mo, U., Hodges, J. K., Heistermann, M. (2000). Comparative Aspects of the Metabolism and Excretion of Cortisol in Three Individual Nonhuman Primates. *General and Comparative Endocrinology*, 438, 427-438.

Bales, K. L., French, J. A., McWilliams, J., Lake, R. A., Dietz, J. M. (2006). Effects of social status, age, and season on androgen and cortisol levels in wild male golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *Hormones and Behavior*, 49, 88 - 95.

Boere, V. (2002). Efeitos do Estresse Psicossocial Crônico e do Enriquecimento Ambiental em Sagüis (*Callithrix penicillata*): Um Estudo Comportamental, Fisiológico e Farmacológico. Tese de Doutorado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 238p.

Boinski, S. U., Swing, S. P., Gross, T. S., Davis, J. K. (1999). Environmental Enrichment of Brown Capuchins (*Cebus apella*): Behavioral and Plasma and Fecal Cortisol Measures of Effectiveness. *American Journal of Primatology*, 68, 49-68.

Breuner, C. W., Greenberg, A. L., Wingfield, J. C. (1998). Noninvasive Corticosterone Treatment Rapidly Increases Activity in Gambel's White-Crowned Sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *General and Comparative Endocrinology*, 111, 386–394.

Brown, J. L., Citino, S. B., Shaw, J. and Miller, C. (1994). Endocrine profiles during the estrous cycle and pregnancy in the Baird's tapir (*Tapirus bairdii*). *Zoo Biology*, 13, 107–117.

Carroll, B. J., Schroeder, K., Mukhopadhyay S., Greden, J. F., Feinberg, M., Ritchie, J., Tarika, J. (1980). Plasma Dexamethasone Concentrations and Cortisol Suppression Response in Patients with Endogenous Depression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 51, 433-437.

Chapman, C. A., Wasserman, M. D., Gillespie, T. R., Speirs, M. L., Lawes, M. J., Saj, T. L., (2006). Do food availability , parasitism , and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments? *American Journal of Physical Anthropology*, 534, 525-534.

Chelini, M. O. M, Souza, N. L., Cortopassi, S. R. G., Felipe, E. C. G., Oliveira, C. A. (2006). Assessment of the Physiologic Stress Response by Quantification of Fecal Corticosteroids. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45, 8–11.

Coelho, L. R., Santos, L. S. (2008). Representação social e discurso sobre o sertão nos jornais de salvador. *Revista Internacional de Folkcomunicação*, 12.

Dantzer, B., McAdam, A. G., Palme, R., Fletcher, Q. E., Boutin, S., Humphries, M. M., Boonstra, R. (2010). Fecal cortisol metabolite levels in free-ranging North American red squirrels: Assay validation and the effects of reproductive condition. *General and Comparative Endocrinology*, 167, 279-86.

Deag, J. M. (1977). Aggression and Submission in Monkey Societies. *Animal Behavior*, 25, 465-474.

Desborough, J. P. (2000). The Stress Response to Trauma and Surgery. *British Journal of Anaesthesia*, 85, 109-117.

Elder, C. M., Menzel, C. R. (2001). Dissociation of Cortisol and Behavioral Indicators of Stress in an Orangutan (*Pongo pygmaeus*) During a Computerized Task. *Primates*, 42, 345-357.

Goymann, W., Möstl, E., Van't Hof, T., East, M. L., Hofer, H. (1999). Noninvasive Fecal Monitoring of Glucocorticoids in Spotted Hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology*, 114, 340–348.

Hair, J. F., White, W. C., Babin, B. J., Anderson, R. E. (2010). Multivariate Data Analysis. Prentice Hall.

Heintz, M. R., Santymire, R. M., Parr, L. A., Lonsdorf, E. V. (2011). Validation of a cortisol enzyme immunoassay and characterization of salivary cortisol circadian rhythm in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, 73, 903–908.

Isbell, L. A., Young, T. P. (1993). Human Presence Reduces Predation in a Free-Ranging Vervet Monkey Population in Kenya. *Animal Behavior*, 45, 1233-1235.

Izar, P. (2004). Female Social Relationships of *Cebus apella nigrinus* in a Southeastern Atlantic Forest: an analysis through ecological models. *Behaviour*, 141, 71-99.

Izar, P., Stone, A. A., Carnegie, S. D., Nakai, E. S. (2008). Sexual selection, female choice and mating systems. In P. Garber, A. Estrada, J. Bicca-Marques, E. Heymann, K. Strier, *South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*. New York: Springer Press, 157–189.

Izar, P., Verderane, M. P., Peternelli-dos-Santos, L., Mendonça-Furtado, O., Presotto, A., Tokuda, M., Visalberghi, E., Frigaszy, D. (2012). Flexible and Conservative Features of Social

Systems in Tufted Capuchin Monkeys: Comparing the Socioecology of *Sapajus libidinosus* and *Sapajus nigritus*. *American Journal of Primatology*, 73, 1–17.

Kersey, D. C., Wildt, D. E., Brown, J. L., Snyder, R. J., Huang, Y., Monfort, S. L. (2010). Endocrine milieu of perioestrus in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), as determined by non-invasive hormone measures. *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 901–912.

Kriegsfeld, L. J., Silver, R. (2006). The Regulation of Neuroendocrine Function: Timing is Everything. *Hormones and Behavior*, 49, 557–574.

Künzl, C., Kaiser, S., Meier, E., Sanchser, N. (2003). Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal? *Hormones and Behavior*, 43, 187-196.

Lynch-Alfaro, J. W., Silva-Jr, J. S, Ryland, A. B. (2012). How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. *American Journal of Primatology*, 00, 1–14.

Machatschke, I. H., Wallner, B., Dittami, J. (2006). Impact of social environment on female chimpanzee reproductive cycles. *Hormones and Behavior*, 50, 126-131.

Manson, J. H., Perry, S., Parish, A. R. (1997). Nonconceptive Sexual Behavior in Bonobos and Capuchins. *International Journal of Primatology*, 18, 767-786.

Martínez-Mota, R., Valdespino, C., Rebolledo, J. A. R., Palme, R. (2008). Determination of Fecal Glucocorticoid Metabolites to Evaluate Stress Response in *Alouatta pigra*. *International Journal of Primatology*, 29, 1365-1373.

Martínez-Mota, R., Valdespino, C., Sánchez-Ramos, M., Serio-Silva, J. (2007). Effects of Forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Animal Conservation*, 10, 374-379.

Mendonça-Furtado, O. (2006). Uso de Ferramentas como Enriquecimento Ambiental para Macacos-Prego (*Cebus apella*) Cativos. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 77p.

Moreira, C. M. (2010). Análise endócrino-comportamental dos macacos-prego (*Cebus nigritus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 152p.

Moreira, N., Monteiro-Filho, E. L. A., Moraes, W., Swanson, W. F., Graham, L. H., Pasquali, O. L., Gomes, M. L. F., Morais, R. N., Wildt, D. E., Brown, J. L. (2001), Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biology*, 20, 103–116.

Möstl, E., Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 67–74.

Mülleder, C., Palme, R., Menke, C., Waiblinger, S. (2003). Individual differences in behaviour and in adrenocortical activity in beef-suckler cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 84, 167-183.

Nakai, E. S. (2007). Fissão-fusão em *Cebus apella nigritus*: flexibilidade social como estratégia de ocupação de ambientes limitantes. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 116p.

Norusis, M. (1998) Guide to data analysis: SPSS 8. NJ: Prentice Hall, p. 101

Oliveira, M. M., Langghuth, A. (2006). Rediscovery of Marcgrave's capuchin monkey and designation of a neotype for *Simia flavia* Schreber, 1774 (Primates, Cebidae). *Boletim do museu Nacional*, 523, 1-16.

Palme, R. (2005). Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 75–80.

Palme, R., Möstl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammal Biology*, 62, 192–197.

Phillips, K. A., Bernstein, I. S., Dettmer, E. L., Devermann, H., Powers, M. (1995). Sexual behavior in brown capuchins (*Cebus apella*). *International Journal of Primatology*, 16, 907-917.

Presotto, A. (2009). Mapas cognitivos de primatas: análise de movimentos e rotas de *Cebus apella nigratus* apoiada por sistemas de informação geográfica. Tese de Doutorado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 174p.

Pride, R. E. (2005). Foraging Success, Agonism, and Predator Alarms: Behavioral Predictors of Cortisol in *Lemur catta*. *International Journal of Primatology*, 26, 295-319.

Robbins, M. M., Czekala, N. M. (1997). A Preliminary Investigation of Urinary Testosterone and Cortisol Levels in Wild Male Mountain Gorillas. *American Journal of Primatology*, 64, 51-64.

Romero, L. M. (2002). Seasonal Changes in Plasma Glucocorticoid Concentrations in Free-living Vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 128, 1–24.

Romero, L. M. (2004). Physiological Stress in Ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 249-255.

Rylands, A. B., Kierulff, M. C., Mittermeier, R. A. (2005). Notes on the taxonomy and distributions of the tufted capuchin monkeys (*Cebus*, Cebidae) of South America. *Lundiana*, 6, 97-110.

Sapolsky, R. M. (1990). Stress in the Wild. *Scientific American*, 262, 106-113.

Scarlata, C. D., Elias, B. A., Godwin, J. R., Powell, R. A., Shepherdson, D., Shipley, L. A., Brown, J. L. (2011). Characterizing gonadal and adrenal activity by fecal steroid analyses in

pygmy rabbits (*Brachylagus idahoensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 171, 373–380.

Schapiro, S.J. Bloomsmith, M.A. Kessel, A.L. Shively, C. (1993). Effects of enrichment and housing on cortisol response in juvenile rhesus monkeys. *Applied Animal Behaviour Science*, 37, 251-263.

Schatz, S., Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: A non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications*, 25, 271-287.

Selye, H. (1936). A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138, 32.

Setchell, J. M., Smith, T., Wickings, E. J. and Knapp, L. A. (2008), Factors affecting fecal glucocorticoid levels in semi-free-ranging female mandrills (*Mandrillus sphinx*). *American Journal of Primatology*, 70, 1023–1032.

Sheriff, M. J., Bosson, C. O., Krebs, C. J., Boonstra, R. (2009). A non-invasive technique for analyzing fecal cortisol metabolites in snowshoe hares (*Lepus americanus*). *Journal of Comparative Physiology b: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 179, 305-313.

Silva Jr., J. S. (2001). Especiação nos macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae). Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 377p.

Smith, C. J. & Norman, R. L. (1987). Influence of the gonads on cortisol secretion in female rhesus macaques. *Endocrinology*, 121, 2192-2198.

Stavisky, R. C., Adams, M. R., Watson, S. L., Kaplan, J. (2001). Dominance, cortisol, and behavior in small groups of female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Hormones and Behavior*, 39, 232-238.

Strauss, A., Mascher, E., Palme, R., Milesi, E. (2007). Sexually mature and immature yearling male European ground squirrels : A comparison of behavioral and physiological parameters. *Hormones and Behavior*, 52, 646-652.

Taira, J. T. (2007). Consumo do palmito juçara (*Euterpe edulis*) por macacos-prego (*Cebus nigritus*): estratégia de forrageamento ótimo ou requinte de um gourmet? Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 80p.

Teskey-Gerstl, A., Bamberg, E., Steineck, Th., Palme, R. (2000). Excretion of corticosteroids in urine and faeces of hares (*Lepus europaeus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 170, 163-168.

Torres-Farfan, C., Valenzuela, F. J., Ebensperger, R., Mendez, N., Campino, C., Richter, H. G., Valenzuela, G. J., Serón-Ferré, M. (2008). Circadian Cortisol Secretion and Circadian Adrenal Responses to ACTH are Maintained in Dexamethasone Suppressed Capuchin Monkeys (*Cebus apella*). *American Journal of Primatology*, 70, 93–100.

Touma, C. & Palme, R. (2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 54–74.

Touma, C., Palme, R., Sachser, N. (2004). Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: A noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, 45, 10-22.

Ulyan, M. J., Burrows, A. E., Buzzell, C. A., Ann, M., Marcinkiewicz, J. L., Phillips, K. A., (2006). The effects of predictable and unpredictable feeding schedules on the behavior and physiology of captive brown capuchins (*Cebus apella*). *Applied Animal Behaviour Science*, 101, 154-160.

Verderane, M. P. (2010). Socioecologia de macacos-prego (*Cebus libidinosus*) em área de ecótono cerrado/caatinga. Tese de Doutorado, São Paulo, Universidade de São Paulo. 235p.

Visalberghi, E., Frigaszy, D., Ottoni, E. B., Izar, P., Oliveira, M. G., Andrade, F. R., (2007). Characteristics of Hammer Stones and Anvils Used by Wild Bearded Capuchin Monkeys (*Cebus libidinosus*) to Crack Open Palm Nuts. *American Journal of Physical Anthropology*, 444, 426-444.

Weingrill, T., Gray, D. A., Barrett, L., & Henzi, S. P. (2004). Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. *Hormones and Behavior*, 45, 259-269.