UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Psicologia

Departamento de Psicologia Experimental

CAIO MARGARIDO MOREIRA

Análise endócrino-comportamental dos macacos-prego (*Cebus
nigritus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho

Orientadora Profa. Dra. Patrícia Izar

São Paulo

2010

CAIO MARGARIDO MOREIRA

Análise endócrino-comportamental dos macacos-prego (*Cebus
nigritus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho

Dissertação apresentada ao Instituto
de Psicologia da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Psicologia.

Área de Concentração: Psicologia
Experimental – Comportamento
Animal.

Orientadora: Profa. Dr. Patrícia Izar

São Paulo

2010

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
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Moreira, Caio Margarido.

Análise endócrino-comportamental dos macacos-prego (*Cebus nigrinus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho / Caio Margarido Moreira; orientadora Patrícia Izar -- São Paulo, 2010.

157 f.

Dissertação (Mestrado -- Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) -- Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Stress 2. *Cebus* 3. Variação sazonal 4. Reprodução sexual
I. Título.

BF575.S75

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caio Margarido Moreira

Análise endócrino-comportamental dos macacos-prego (*Cebus nigrinus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Psicologia.

Área de Concentração: Psicologia Experimental – Comportamento Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho a todas as pessoas que
não se acostumam. Aos sonhos.
Torcendo para que ele seja digno disso.**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer muito à minha orientadora, professora Patrícia. É impressionante vê-la pesquisar, ensinar e cuidar de vários outros aspectos que não seriam de sua obrigação. Devido a sua competência, inteligência e empatia, seus alunos conseguem desenvolver os projetos com todo o apoio teórico, financeiro, logístico e muitas vezes emocional de que necessitam. Obrigado por permitir que eu conhecesse o mundo dos primatas selvagens.

Quero agradecer muito também à minha família. Depois que terminamos a graduação e decidimos buscar novos caminhos, o apoio da família fica ainda mais explícito. Meus pais e minhas irmãs são pessoas lindas e muito boas. O amor deles permitiu que este trabalho existisse, espero que eu retribua. Agradeço aos meus avôs e avós, tios e primos. Em especial ao Fábio Moreira, e às nossas mochilas.

Agradeço:

À professora Maria Bernardete Cordeiro de Sousa por me receber no seu laboratório em Natal, permitir que parte dessa pesquisa fosse realizada e me ajudar a estudar a fisiologia dos animais;

Ao Lucas, que é um dos amigos mais companheiros que uma pessoa pode ter;

À Andrea, à sua alegria e ao seu apoio, que veio sempre na hora certa;

Ao Eraldo, que me ensinou como pensar no meio de tantas árvores. E pelos seus assobios de macaco-prego, cuja lembrança sempre me fará sentir muito bem;

À Ana Maria, que fez companhia profunda ao meu coração enquanto eu estava na mata ou em São Paulo;

Ao César, pela alegria, energia e vontade de fazer a diferença;

Aos meus amigos cientistas e artistas: Rafael, Luís Fernando, Milton, Cleiton e Lézio. Por torcerem o mundo como uma toalha molhada, e beberem toda a água;

Aos meus amigos: Leandro, Fábio, Rodrigo, Marcella e Rafael, por guardarem, ao meu lado, parte da inocência de tempos atrás;

Aos outros componentes do grupo de primatas savaneadores: José, Raphael, Marco, Altay e Jerry, pelos ótimos momentos em que fizemos parte de algo juntos;

Às pessoas que me ensinaram a enxergar ciência, em especial ao Professor Marcus Brandão e ao Professor Camargo;

A Marcos Tokuda, Eduardo Darvin, Edione, Michele e Noemi, por estarem comigo de forma tão próxima quando eu comecei a entrar no mundo dos macacólogos;

À Olívia, por essa trajetória, que ainda não terminou, em busca do que é o stress;

Ao time de basquete da Psico;

Aos meus colegas de laboratório Mariana, Thiago, Camila, Anna, Luiz, Marilee, Eliza e Bianca pela cordialidade;

Aos órgãos financiadores da bolsa e do projeto: FAPESP e CNPQ.

Aos funcionários do Parque Estadual Carlos Botelho pelo suporte. Em especial ao Diretor Maia, aos guardas Edmilson, Douglas, Fernando e Nercy, à Dona Vera, Natanael, Tânia e Kátia.

Aos professores e funcionários do Instituto de Psicologia da USP.

Algumas dessas pessoas me suportaram em momentos em que eu me perdi, assentindo que "o único modo de estarmos de acordo com a vida é estarmos em desacordo com nós próprios" (F. Pessoa).

E todas participaram deste trabalho de alguma forma. Valeu mesmo!

RESUMO

Moreira, C. M. **Análise endócrino-comportamental dos macacos-prego (*Cebus nigrinus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho.** 2010. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A resposta ao stress, que inclui a liberação de glucocorticóides (GCs), ajuda animais a lidarem com mudanças ambientais. Espécies selvagens de muitos *taxa* modulam sazonalmente a liberação de GCs. Segundo a Hipótese Preparatória, a variação sazonal destes hormônios aumenta a eficácia da resposta fisiológica em períodos de maior frequência de estressores. Hormônios sexuais interagem com GCs e podem modificar a resposta ao stress no contexto reprodutivo. Neste trabalho, nós testamos a Hipótese Preparatória por meio da análise de metabólitos fecais de hormônios e do comportamento de um grupo de macacos-prego (*Cebus nigrinus*) selvagens, e de dados ambientais da região da Mata Atlântica do Parque Estadual Carlos Botelho onde o grupo vive. Nós comparamos os níveis hormonais entre indivíduos, categorias etárias, sexos, ranking, períodos do dia e meses, e com o ambiente físico e social durante o período de agosto de 2007 a julho de 2008. Os principais resultados foram: picos de metabólitos de cortisol (MC) do macho alfa no período de acasalamento e da fêmea adulta grávida durante o final do período de gravidez, acompanhados por níveis elevados de metabólitos de andrógenos e de progesterona, respectivamente. O macho subordinado, jovens e infantes apresentaram um pico de MC durante a baixa disponibilidade de frutos. Estes dados indicam que a reprodução, para adultos, e a disponibilidade de alimentos ricos em energia, para subordinados e imaturos, são fatores importantes para a variação sazonal de glucocorticóides em macacos-prego selvagens da Mata Atlântica.

Palavras-chave: Stress, macaco-prego, reprodução, sazonal, Hipótese Preparatória, cortisol, M. Atlântica.

ABSTRACT

Moreira, C. M. Endocrine and behavioral analysis of capuchin monkeys (*Cebus nigrinus*) inhabiting the Parque Estadual Carlos Botelho. 2010. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The stress response, including the release of glucocorticoids (GCs), helps animals to cope with environmental changes. Wild species of many taxa seasonally modulate the release of GCs. According to the Preparatory Hypothesis, the seasonal variation of these hormones increases the effectiveness of the physiological response during periods of high frequency of stressors. Sex hormones interact with GCs and can modify the stress response in the reproductive context. In this work we investigate this hypothesis by measuring fecal hormones metabolites and by behavioral observation of a wild black-capped capuchins monkeys (*Cebus nigrinus*) group living in the Brazilian Atlantic Forest. We analyzed data collected from August 2007 to July 2008. We compared hormones levels among individuals, age-sex classes, rankings, periods of day and seasons, and environmental features and social context. The main results were: peak of cortisol metabolites (CM) of the alpha male during the breeding season, CM peak of the pregnant adult female during the late period of pregnancy, both accompanied by high levels of sexual hormones metabolites (androgens and progesterone, respectively). Subordinate male, juveniles and infants showed a peak of CM during the low fruit availability. These data indicate that the reproduction to adults and the availability of high energetic food to subordinates, juveniles and infants are important factors for the seasonal variation of glucocorticoids of wild capuchin monkeys in the Atlantic Forest.

Key words: stress, capuchin monkey, reproduction, seasonal, preparatory hypothesis, glucocorticoids, Atlantic forest.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mediadores fisiológicos e suas ações nos sistemas fisiológicos.	56
Tabela 2. Médias de MC ($\pm$ erro padrão) dos indivíduos adultos dentro e fora do período de procriação (*p < 0,05).....	91
Tabela 3. Médias de Hormônios Cortisol ($\pm$ erro padrão) das fêmeas adultas dentro e fora do período de gravidez (*p < 0,05)	92
Tabela 4. Médias de Hormônios Sexuais ($\pm$ erro padrão) dos indivíduos adultos dentro e fora do período de procriação (*p < 0,05).....	92
Tabela 5. Médias de Hormônios Cortisol ($\pm$ erro padrão) das fêmeas adultas dentro e fora do período de gravidez (*p < 0,05)	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A interação de GCs e seus receptores. A linha de base de GC reflete a variação circadiana nas concentrações de GC (indicada pela região sombreada). Receptores do Tipo I apresentam baixa capacidade para GCs e são saturados primeiro (linha azul). Receptores do Tipo II ligam-se aos GCs assim que a concentração de GC aumenta e os receptores do Tipo I já estão saturados (linha verde). Também estão esquematizadas duas situações hipotéticas de concentrações de GC, linha de base (A_1 e B_1) e induzidas por stress (A_2 e B_2) – Modificado de Romero (2004). 28

Figura 2. Estrutura de modelagem das necessidades energéticas (E) de organismos durante o ciclo de vida. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. (a) Linhas contínuas. (b) Mudanças sazonais. (c) Custos adicionais após mudanças no ambiente. (d) E_O em condições flutuantes (McEwen e Wingfield, 2003b). 50

Figura 3. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. Um esquema representativo dos efeitos de E_O , uma linha mostra o aumento dos custos energéticos necessários para sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições não ideais. Se isso ocorre no final da primavera (a), então o aumento sazonal no E_G e a queda no E_I e E_E podem cobrir os custos de E_O . (b) Um modelo dos efeitos caso ferimentos, doenças ou estilo de vida deletério permanentes aumentem E_E e E_I para perto dos recursos disponíveis (E_G), neste caso, o indivíduo pode estar susceptível a uma perturbação (E_O) resultando em sobrecarga. Uma perturbação (E_O) ocorrendo no inverno, ou em um período quando recursos estão em declínio, podem resultar em uma

sobrecarga alostática praticamente imediata. (c) Um cenário no qual E_G é reduzido substancialmente. Isso pode ocorrer na natureza como resultado de uma mudança climática ou outra perturbação. Adicionalmente, em sociedades de primatas, o *status* reduz os recursos disponíveis (E_G). Então no inverno os indivíduos podem estar sempre em sobrecarga alostática do tipo I, e mesmo no verão o E_G não aumenta o suficiente para prevenir a sobrecarga alostática de ocorrer se acontecer uma perturbação. A mesma perturbação (E_O) no inverno pode resultar em uma sobrecarga alostática do tipo I imediata. (d) efeitos caso ferimentos, doenças ou estilo de vida deletério permanentes aumentam E_E e E_I , e o *status* ou perturbações ambientais reduzem os recursos disponíveis (E_G), então o indivíduo apresentará sobrecarga alostática do tipo I durante o inverno e mesmo na primavera. Mesmo no verão, a susceptibilidade à perturbação (E_O) resultará em uma sobrecarga rápida (McEwen e Wingfield, 2003b). 51

Figura 4. Os Modelos Gráficos do Modelo da Esfera de Ação de Reatividade. (A) Modelo Básico, (B) Modelo Básico para espécies não sazonais e (C) Modelo Básico com estressores agudos (Romero et al., 2009). 54

Figura 5. Vista do Parque Estadual Carlos Botelho no Município de São Miguel Arcanjo (Fotografia de Lucas Peternelli). 59

Figura 6. Distribuição geográfica de *Cebus* (www.icb.ufmg.br/zoo/primatas/cebus_map.htm). 61

Figura 7. Macho adulto, Ceni (Direita), em raro momento de brincadeira com dois jovens (Fotografia de Caio Moreira). 62

Figura 8. Macho alfa, Benjamin, deslocando-se entre as árvores da área de estudo (Fotografia de Caio Moreira). 63

Figura 9. Jovem forrageando o pecíolo da folha da juçara (Fotografia de Andréa Presotto). 65

Figura 10. Esforço de campo mensal (horas) total e com o grupo Pimenta. Acima das barras, o número de dias inteiros de coleta de cada mês. 68

Figura 11. Esquema da secreção, metabolismo e excreção do cortisol (Modificado de Möstl e Palme, 2002).....	71
Figura 12. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MP das categorias etárias: Fêmeas adultas e jovens e infantes (*p < 0,05).	82
Figura 13. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MA das categorias etárias: machos adultos e jovens e infantes (*p < 0,05).	83
Figura 14. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MP das fêmeas adultas, Ruiva e Olívia, e dos jovens (*p < 0,05).	83
Figura 15. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MA dos machos adultos, Benjamin e Ceni, e dos jovens (*p < 0,05).....	84
Figura 16. Médias e erros padrões das concentrações de MC nos três períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h) das categorias etárias: machos adultos, fêmeas adultas e jovens e infantes (*p < 0,05).....	85
Figura 17. Médias e erros padrões das concentrações de MC nos três períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h) dos indivíduos: Benjamin, Ceni e dos jovens (*p < 0,05).	86
Figura 18. Médias e erros padrões das concentrações de MC nos três períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h) dos indivíduos: Ruiva, Olívia e dos jovens (*p < 0,05).....	86
Figura 19. Médias das concentrações mensais de MC e MA de machos adultos (*p < 0,05).....	87
Figura 20. Médias das concentrações mensais de MC e MA de Benjamim (*p < 0,05).88	
Figura 21. Médias das concentrações mensais de MC e MA de Ceni (*p < 0,05).....	88
Figura 22. Médias das concentrações mensais de MC e MA de jovens e infantes (#p < 0,05 para MC).....	89

Figura 23. Médias das concentrações mensais de MC e MP de fêmeas adultas (*p < 0,05).....	89
Figura 24. Médias das concentrações mensais de MC e MP de Ruiva (*p < 0,05).	90
Figura 25. Médias das concentrações mensais de MC e MP de Olívia (*p < 0,05).	90
Figura 26. Médias das concentrações mensais de metabólitos de cortisol e MP de jovens e infantes (#p < 0,05 apenas para MC).	91
Figura 27. Médias mensais de (A) Metabólitos de Cortisol entre machos adultos, fêmeas adultas, jovens e infantes, (B) Porcentagem de scans de todos os indivíduos do grupo destinados ao descanso, deslocamento e forrageamento e (C) Porcentagem dos itens alimentares (fruto, folha e insetos) consumidos por todos os indivíduos do grupo.	95
Figura 28. Médias mensais dos MC e da porcentagem do consumo de frutos de jovens e infantes.	96
Figura 29. Médias mensais dos MC de Ceni e da porcentagem do consumo de frutos de machos adultos.	96
Figura 30. Distância mensal percorrida diariamente pelo grupo (*p < 0,05).	97
Figura 31. Variação mensal das médias de precipitação e temperatura no Parque Estadual Carlos Botelho ao longo deste estudo.	98
Figura 32. Médias mensais das ocorrências: brigas, predadores e encontros.	98
Figura 33. Médias mensais das ocorrências: brincadeira, catação e amamentação.	98
Figura 34. Variação mensal de metabólitos de cortisol (cinza) e do Fator TDO (laranja) calculado para cada categoria etária (machos adultos, fêmeas adultas, jovens e infantes). No eixo y da esquerda de cada gráfico estão representadas as medidas das	

concentrações de metabólitos de cortisol (ng/g de fezes). No eixo y da direita estão representados os valores do Fator TDO. 99

Figura 35. Modelagem das necessidades energéticas de Ceni. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. 100

Figura 36. Modelagem das necessidades energéticas de jovens e infantes. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais..... 101

Figura 37. Modelagem das necessidades energéticas de Benjamim. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. 101

Figura 38. Modelagem das necessidades energéticas de Olívia. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. 102

Figura 39. Modelagem das necessidades energéticas de Ruiva. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. 102

Figura 40. Esquema do método utilizado na montagem dos Modelos Gráficos. A linha preta une as médias mensais de MC. A linha azul une os erros padrões dessas médias mensais. A linha laranja representa a variação circadiana calculada a partir dos valores máximo e mínimo da variação circadiana do indivíduo ou classe etária representada pela barra amarela. 103

Figura 41. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para adultos machos do grupo Pimenta I. A barra azul representa a variação de MC. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 104

Figura 42. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para fêmeas adultas do grupo Pimenta I. A barra azul representa a variação de MC. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 104

Figura 43. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para jovens e infantes do grupo Pimenta I. A barra azul representa a variação de MC. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 105

Figura 44. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para o macho adulto Benjamim. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 105

Figura 45. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para a fêmea adulta Ruiva. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 106

Figura 46. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para o macho adulto Ceni. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 106

Figura 47. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para a fêmea adulta Olívia. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana. 107

Figura 48. Comparação entre os gráficos de modelagem das necessidades energéticas. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. 130

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CRF	Fator liberador de corticotropina
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzima
Fator TDO	Fator de Todas as Ocorrências
FSH	Hormônio folículo estimulante
GCs	Glucocorticóides
CBG	Globulina ligante a cortisteróides
GR	Receptores de Glucocorticóides
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPG	Hipotálamo-pituitária-gonadal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Precisão
LH	Hormônio luteinizante
MA	Metabólitos de Andrógenos
MC	Metabólitos de Cortisol
MP	Metabólitos de Progesterona
PECB	Parque Estadual Carlos Botelho
SCN	Núcleo Supraquiasmático do Hipotálamo

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	21
1.1. Resposta corporal ao stress.....	21
1.2. Sazonalidade	24
1.3. O stress e a dominância.....	31
1.4. O stress e a reprodução em machos.....	38
1.5. O stress e a reprodução em fêmeas	42
1.6. Interações entre os eixos HPA e HPG.....	44
1.7. Falhas no conceito de stress, e a alostase	45
1.8. Modelo da Esfera de Ação de Reatividade (<i>Reactive Scope Model</i>)	53
 2 – OBJETIVO	 57
 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	 59
3.1. Área de estudo e sujeitos.....	59
3.2. Espécie em estudo	61
3.3. Grupo estudado	62
3.4. Coleta dos dados do ambiente	64
3.5. Coleta dos dados comportamentais	65
3.6. Amostras fecais	68
3.7. Extração e dosagem dos hormônios	76
3.8. Análise dos dados.....	80
 4 – RESULTADOS	 82
4.1. Comparação das concentrações dos hormônios entre as categorias etárias e entre os indivíduos.....	82
4.2. Concentrações dos hormônios entre os períodos do dia	84
4.3. Concentrações mensais dos hormônios	87
4.4. Médias hormonais durante diferentes períodos da reprodução	91
4.5. Correlações entre as concentrações dos hormônios	93
4.6. Correlações entre as médias mensais de metabólitos de cortisol, do orçamento de atividades e dos itens alimentares consumidos	94
4.7. Clima e os metabólitos de cortisol.....	97

4.8. Todas as ocorrências e os metabólitos de cortisol.....	98
4.9. Modelagem das necessidades energéticas.....	100
4.10. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade.....	103
5 - DISCUSSÃO.....	108
5.1. Comparação das concentrações dos hormônios entre as categorias etárias e entre os indivíduos.....	108
5.2. Concentrações dos hormônios entre os períodos do dia	114
5.3. Concentrações mensais dos hormônios	116
5.4. Médias hormonais durante diferentes períodos da reprodução	119
5.5. Correlações entre as concentrações dos hormônios	121
5.6. Correlações entre as médias mensais de metabólitos de cortisol, do orçamento de atividades e dos itens alimentares consumidos	123
5.7. Clima e metabólitos de cortisol	126
5.8. Todas as ocorrências e os metabólitos de cortisol.....	126
5.9. Modelagem das necessidades energéticas.....	128
5.10. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade.....	131
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
BIBLIOGRAFIA	137
ANEXO A – Amostras individuais	152

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Resposta corporal ao stress

Um estressor pode ser definido como tudo o que tira o corpo do balanço homeostático, como um ferimento, uma mudança no ambiente físico ou a visão de um predador. A resposta ao stress, por sua vez, é a tentativa do corpo de restaurar o balanço perdido (Sapolsky, 1994). Embora as respostas ao stress não sejam tão estereotipadas quanto se imaginava durante as primeiras descobertas científicas de Selye nos anos 30 (1936 a, b), elas envolvem, tipicamente, a liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) a partir dos nervos simpáticos e medula da adrenal, liberação de hormônios esteróides adrenocorticais como glucocorticóides (GCs), e o início de uma variedade de outras respostas endócrinas (Orth e Kovacs, 1998; Sapolsky et al., 2000).

A quantificação dos níveis do GC cortisol tem sido utilizada para monitorar respostas do corpo de diversos vertebrados a situações estressoras. O cortisol é liberado pela glândula adrenal em resposta a estressores agudos como captura e hemorragia (Coe et al., 1978) e em resposta ao stress de longa duração produzido por interações sociais e ansiedade (Eberhart et al., 1980). Quando um animal está sob condições adversas, os níveis de cortisol podem aumentar até níveis patológicos, podendo inibir a função reprodutiva (Chatterton et al., 1991). Concentrações de cortisol também são moduladas por muitas variáveis comportamentais e fisiológicas, incluindo atividade física (Girard e Garland, 2002), função imunológica (Hermus e Sweep, 1990), obtenção de comida, *status* nutricional e função reprodutiva (Kime et al., 1980; Saltzman et al., 1998).

A liberação de GCs pela glândula adrenal está sob controle do cérebro, mais especificamente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Quando algo estressante acontece, ou quando pensamos em algo estressante, o hipotálamo secreta o hormônio promotor CRF (fator liberador de corticotropina) para o sistema circulatório entre o

hipotálamo e a pituitária. Em quinze segundos ou menos, o CRF sinaliza à pituitária para liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Após o ACTH ser liberado na corrente sanguínea, ele atinge a glândula adrenal e em poucos minutos inicia a liberação de GCs. Juntos, GCs e secreções do sistema nervoso simpático (catecolaminas) contribuem para uma grande porcentagem do que acontece no corpo durante o stress (Sapolky, 1994).

Adicionalmente, em períodos de stress o pâncreas é estimulado a liberar glucagon. GCs, glucagon e o sistema nervoso simpático aumentam os níveis de glicose circulante, mobilizando energia durante o stress. Outros hormônios também são ativados. A pituitária secreta prolactina que, entre outros efeitos, age na supressão da reprodução durante o stress. Ambos, pituitária e cérebro, também secretam uma classe de substâncias endógenas semelhantes à morfina, chamadas endorfinas, que, entre outras coisas, ajudam a diminuir a percepção da dor. Finalmente, a pituitária secreta vasopressina, ou hormônio antidiurético, que tem um papel na resposta ao stress cardiovascular (Sapolky, 1994).

Assim como várias glândulas são inibidas durante a resposta ao stress, vários sistemas hormonais podem ser inibidos nesse período, como a secreção de hormônios reprodutivos: estrógeno, e andrógenos. O mesmo pode ocorrer com hormônios relacionados ao crescimento e com a secreção de insulina (Sapolky, 1994).

Além disso, muitos fatores psicológicos, como o grau de controle do animal sobre esses estímulos (revisado por Levine et al., 1989), conseguem alterar a secreção de GCs. Um exemplo clássico da importância do controle sobre o estímulo estressor é o estudo de Weiss e colaboradores (1968), no qual dois ratos foram colocados em gaiolas cujo piso dava choques nas patas destes animais. Em uma das gaiolas, o rato podia parar o choque das duas gaiolas por meio de uma barra. O rato que controlava a barra

apresentou níveis de GCs muito menores do que o outro animal, sugerindo que o grau de controle sobre o estressor podia determinar a resposta hormonal. Mas, em geral, estímulos aplicados em contextos psicológicos similares produzem secreções de GCs de magnitudes similares em indivíduos de uma dada espécie (Sapolsky, 1994).

Variação circadiana

A secreção de GCs também está sujeita a ritmos circadianos intrínsecos dos organismos. Kriegsfeld e Silver (2006) detalharam este processo coordenado pelo Núcleo Supraquiasmático (SCN) do hipotálamo. Segundo os autores, os neurônios do SCN fazem, em alguns casos, conexões diretas com neurônios neurosecretores. Em outros casos, sinais do SCN ajustam os “genes relógio” das células neurosecretoras, regulando a função circadiana em nível celular. Estes genes relógio foram propostos depois da constatação de que células do SCN isoladas em culturas exibem ritmos circadianos de atividade elétrica (Welsh et al., 1995).

Órgãos alvo respondem de forma diferente à mesma informação dependendo do período do dia (ou de condições locais). Essa constatação indica que os sistemas alvo do SCN têm mecanismos próprios de controle temporal. Apesar das diferenças entre os órgãos periféricos, dados mostram que as propriedades oscilatórias de células derivadas de glândulas periféricas são similares às aquelas encontradas no SCN dos indivíduos, corroborando a idéia de que o funcionamento dos genes relógio apresenta um núcleo comum em todos os tecidos (Yagita et al., 2001).

Torres-Farfan e colaboradores (2008) aplicaram as idéias acima em um estudo com macacos-prego cativos e demonstraram que o córtex da adrenal destes macacos mantém o ritmo circadiano do cortisol – com valores máximos pela manhã coincidindo com o início da atividade locomotora – e que este ritmo não é gerado pelo ACTH

produzido na hipófise. O ACTH apresentaria, segundo os autores, um papel de amplificar o ritmo originado por outros mecanismos.

Estudos com outros hormônios mostram que, embora estrógeno não apresente variação circadiana no sangue ou nas fezes (Norjavaara et al., 1996; Hess et al., 1981), testosterona e progesterona exibem uma variação marcada ao longo do dia (Whitten et al., 1998). Em homínídeos, a testosterona apresenta um ritmo semelhante ao do cortisol. Em macacos do Velho Mundo machos, no entanto, picos de testosterona no meio da noite e pontos mais baixos ao amanhecer formam um padrão diferente (Perachio et al., 1977; Beattie e Bullock, 1978; Plant, 1981). Fêmeas e machos de cercopitécoídes castrados, por outro lado, exibiram o mesmo padrão de homínídeos, sugerindo que este padrão reflete ritmos produzidos nas glândulas adrenais (Perachio et al., 1977).

1.2. Sazonalidade

A liberação de GCs minutos após o início do estímulo estressor induz uma variedade de efeitos comportamentais e fisiológicos, mas ainda não há um entendimento amplo sobre como os GCs ajudam animais selvagens e de vida-livre a responder apropriadamente a condições ambientais adversas.

A observação de que estímulos nocivos conseguem causar a morte de ratos adrenalectomizados sugere que GCs são cruciais para a sobrevivência (Darlington et al., 1990b). Embora a adrenalectomia impeça completamente a produção de GCs, a reinjeção de pequenas quantidades de GCs falha em manter estes animais vivos (Darlington et al., 1990a). Este resultado implica que níveis de GC maiores do que os de manutenção são requeridos para a sobrevivência a estímulos nocivos. Mesmo assim, ainda se sabe pouco sobre *como* concentrações elevadas de GC auxiliam a sobrevivência (Romero, 2002).

Se a falta de GCs pode levar à morte, níveis cronicamente elevados também podem ser deletérios ao indivíduo. Essa sugestão é favorecida pela observação de que GCs conseguem suprimir o eixo gonadal (Free e Tillson, 1973; Moberg, 1985; Sapolsky, 1987), sistema fisiológico essencial para o sucesso da reprodução. Além disso, exposição de longa duração a GCs pode induzir efeitos deletérios múltiplos, incluindo morte neuronal (Sapolsky, 1992b). Conseqüências fisiopatológicas do stress crônico são, essencialmente, meras extensões das ações dos GCs – supressão da energia armazenada ao ponto da miopatia; aumento do tônus cardiovascular resultando em hipertensão; supressão do anabolismo ao ponto de ulceração peptídica, parada do crescimento e reparo de tecidos; e aumento do risco de doenças, impotência e amenorréia (Sapolsky, 1993).

Presumivelmente, deve ocorrer um balanço entre a necessidade de GCs para a resposta a estímulos nocivos e a prevenção a exposições deletérias. A importância dos GCs para a sobrevivência sugere que estes esteróides apresentem um papel importante na aptidão do animal.

Resultados de estudos da década de 80 e do início da década de 90 indicaram que a magnitude da liberação de GCs a estímulos idênticos é consideravelmente semelhante por toda a vida do animal, com exceções da gravidez (Smith e Thomson, 1991), do início do desenvolvimento (Sapolsky e Meaney, 1986), das mudanças no ranking social (Sapolsky, 1987) e de algumas mudanças patológicas durante o envelhecimento (Sapolsky, 1992b). Evidências mais recentes, no entanto, indicam que algumas espécies de vida livre modulam sazonalmente a liberação de GCs. O que induz estas mudanças – sejam o fotoperíodo, a temperatura e a disponibilidade de comida – ainda é desconhecido para a maioria das espécies (Romero, 2002).

Uma vez que estudos indicam que grande parte das espécies de vertebrados selvagens varia os GCs de forma sazonal (e.g. Romero, 2002) e presumindo-se que esses padrões sejam adaptativos, podemos nos perguntar *por que* faria sentido animais variarem as concentrações de GC sazonalmente?

Tradicionalmente, explicações para a modulação sazonal têm sido colocadas em duas categorias: aquelas que enfocam os efeitos metabólicos dos GCs (Hipótese da Mobilização de Energia) e aquelas que enfocam os efeitos comportamentais (Hipótese Comportamental). Romero (2002) propôs uma terceira categoria (Hipótese Preparatória) enfocando o papel dos GCs na preparação de um animal para estressores subseqüentes.

De acordo com a hipótese da Mobilização de Energia, as concentrações de GC serão mais altas durante os períodos energeticamente mais custosos do ano. Sob esse ponto de vista, altas concentrações de GC durante a procriação, por exemplo, resultam do fato de que este é o período do ano em que os animais têm maiores demandas energéticas (Ketterson e Nolan, 1999).

Segundo a Hipótese Comportamental, as mudanças anuais nas concentrações de GCs resultam do fato de os animais apresentarem diferentes necessidades de expressar (ou não expressar) os comportamentos mediados por GCs em diferentes períodos do ano, como evitar o comportamento de abandonar o ninho durante condições ambientais adversas (O'Reilly, 1995). A descoberta de um receptor de membrana que ativa uma proteína G quando ligado a GCs (Moore and Orchinik, 1994; Orchinik et al., 1991), acompanhada de evidências de mudanças rápidas (antes de 15 minutos) do comportamento após a administração de GCs (Breuner et al., 1998), sugere que o principal papel destes esteróides em animais selvagens pode ser comportamental.

Hipótese Preparatória

Em uma revisão recente, Sapolsky e colaboradores (2000) categorizaram ações conhecidas dos GCs em quatro categorias de efeitos fisiológicos: *efeitos permissivos*, que facilitam o funcionamento de outros sistemas fisiológicos (e.g. ação da epinefrina) permitindo um melhor desempenho sob condições de stress; *efeitos estimulatórios*, que aumentam a resposta dos GCs após a resposta inicial ao stress; *efeitos supressivos*, que “desligam” a resposta inicial ao stress prevenindo, então, que a própria resposta possa ser danosa ao organismo (e.g. ativação imunológica crônica, levando a problemas de autoimunidade); e, por último, *efeitos preparatórios*, que ajudam a preparar o organismo para repostas a estressores subsequentes. Ponto central dessa categorização é o conhecimento de que os GCs são apenas parte da resposta ao stress. Outros neurotransmissores (especialmente adrenalina e noradrenalina, 5-HT), neuro-hormônios (e.g. CRH), peptídeos opióides, citocinas (e.g. IL-6), assim como outras funções cerebrais, exercem seus efeitos rapidamente com o início do stress e sem o envolvimento da pituitária ou da adrenal (Romero, 2002).

Um resultado claro da revisão de Sapolsky e colaboradores (2000) é que as concentrações basais e sob stress de GCs resultam em efeitos fisiológicos muito diferentes. Na década de 80, acreditava-se que, de um modo ótimo, concentrações de GCs deveriam ser minimizadas durante períodos sem stress. Portanto, a secreção deveria ser elevada rapidamente com o início do stress, e terminar prontamente após o seu fim (Sapolsky, 1993). Hoje, evidências sugerem que efeitos permissivos são geralmente ativados em concentrações basais, usualmente através dos receptores de Tipo-I (mineralocorticóides), enquanto os efeitos estimulatórios, supressivos e preparatórios são geralmente ativados em concentrações de stress através de receptores do Tipo-II (GCs), como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. A interação de GCs e seus receptores. A linha de base de GC reflete a variação circadiana nas concentrações de GC (indicada pela região sombreada). Receptores do Tipo I apresentam baixa capacidade para GCs e são saturados primeiro (linha azul). Receptores do Tipo II ligam-se aos GCs assim que a concentração de GC aumenta e os receptores do Tipo I já estão saturados (linha verde). Também estão esquematizadas duas situações hipotéticas de concentrações de GC, linha de base (A_1 e B_1) e induzidas por stress (A_2 e B_2) – Modificado de Romero (2004).

A revisão da literatura permitiu a Sapolsky e colaboradores (2000) concluir que os GCs apresentam um efeito preparatório sobre as respostas ao stress: cardiovasculares, imunológicas, cognitivas e metabólicas, assim como na regulação inibitória do comportamento e da fisiologia da reprodução. Em outras palavras, concentrações basais específicas de GCs fazem todos esses sistemas apresentarem um desempenho melhor sob situações estressoras.

Se concentrações basais de GCs acima das concentrações basais nulas podem promover melhores efeitos de preparação para o organismo, como esses efeitos estão relacionados a variações intra-anuais das concentrações de GCs?

Todos os sistemas que os GCs auxiliam a preparar são necessários para a sobrevivência sob condições adversas. O aumento antecipado dos efeitos desses sistemas pode, portanto, ser visto como uma preparação para um período em que condições adversas são mais comuns (Dallman et al., 1987; Romero, 2002).

Muitos estímulos diferentes são conhecidos por causar stress em animais selvagens, incluindo tempestades severas (e.g., Smith et al., 1994); predação (e.g., Mason, 1998); doenças (e.g., Dunlap e Schall, 1995) e competição por parceiros (e.g., Sapolsky, 1992a). Muitas espécies, em função de seu longo período evolutivo de exposição a estressores sazonais, podem possuir a habilidade de “prever” que a exposição a esses estímulos pode ocorrer durante, por exemplo, a estação de procriação (Romero, 2002).

A Hipótese Preparatória abrange a Hipótese da Mobilização de Energia e a Hipótese Comportamental, uma vez que gera as mesmas previsões sobre a relação entre as concentrações de GCs e a variação sazonal do gasto de energia ou a necessidade de expressar (ou não expressar) diferentes comportamentos.

A hipótese também prediz que o aumento da frequência de eventos adversos (i.e. estressores) deve resultar em concentrações basais mais altas de GC. Uma análise do risco de predação e risco de ferimento durante competições intra-específicas, e risco de doenças durante estágios sazonais diferentes de uma espécie, deve revelar correlação com as concentrações das linhas de base de GC.

Uma análise das mudanças sazonais dos riscos também deve ajudar a responder por que algumas espécies não apresentam variação intra-anual das concentrações de GC (i.e. a frequência dos estressores não variaria sazonalmente nessa espécie) ou por que algumas espécies apresentam concentrações de GC maiores em períodos diferentes da procriação – i.e. em seu ciclo de vida, estressores são menos frequentes durante esse período (Romero, 2002).

É importante ter em mente que a Hipótese Preparatória não requer que o animal esteja sujeito a mais estressores em um determinado período do ano, apenas que a chance de estar sujeito a um estressor seja mais provável. Mudanças na frequência e

intensidade dos estressores devem ocorrer durante milhares de anos para resultar em variações sazonais preparatórias de GC. Como resultado, indivíduos que nunca estiverem sujeitos a um estressor durante aquela estação ainda mostrarão altas concentrações de GC (Romero, 2002).

Estudos recentes indicam que fêmeas cativas e selvagens de algumas espécies de macacos neotropicais apresentam diferenças significativas nas taxas reprodutivas, sendo o intervalo entre partos significativamente menor em fêmeas cativas (para muriqui ver Ziegler et al., 1997 e para macaco-prego ver Izar et al., 2008). Os autores atribuem essa diferença aos suplementos de vitamina e proteínas providos aos macacos em cativeiro. Estes e outros estudos sugerem que a sazonalidade reprodutiva em primatas pode ser adaptativa e relacionada à previsibilidade de variação da disponibilidade de comida, do clima ou de predação (e.g. Boinsky, 1987; Strier, 1996). A maior parte das espécies de macacos do Novo Mundo apresenta sazonalidade no nascimento de filhotes – principalmente aquelas como as de macaco-prego, que apresentam médio porte e comem frutos – sendo que a maioria dos nascimentos ocorre antes do pico na disponibilidade de comida (Di Bittetti e Janson, 2000).

No Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), área onde este estudo foi realizado, a variação de alimentos ocorre de forma paralela à variação de temperatura (Taira, 2007), com queda acentuada na disponibilidade de alimentos durante o inverno. A baixa taxa reprodutiva das fêmeas (Izar et al., 2008), o regime de fissão-fusão do grupo (Nakai, 2007), o tamanho da área de uso acima dos padrões da espécie e a baixa densidade populacional (Izar et al., 2008) nos indicam um déficit alimentar provavelmente em função da baixa oferta de frutos e invertebrados na área durante o período entre o final de abril e agosto.

Temperatura

Babuínos de savana são uma das poucas espécies de primatas que não apresentam padrão de reprodução sazonal. Dessa forma, quando Weingrill e colaboradores (2004) estudaram as fêmeas destes animais, eles podiam ter acesso aos efeitos do *status* reprodutivo (ciclo ovariano, gravidez e lactação) e das condições ambientais (temperatura, fotoperíodo e disponibilidade de alimentos) sobre as concentrações de cortisol, independentemente de fatores que variam de acordo com estações de procriação. Neste estudo, os autores não encontraram efeitos do *status* reprodutivo dos babuínos sobre os níveis de cortisol (Weingrill et al., 2004).

Embora Weingrill e colaboradores (2004) tenham encontrado correlação entre a diminuição dos níveis de cortisol e o aumento do fotoperíodo, os autores acreditam que a variação deste hormônio está relacionada principalmente com as mudanças sazonais de temperatura. Os babuínos da reserva natural de De Hoop, onde o estudo foi realizado, estão submetidos a temperaturas mínimas de 3 graus Celsius nos meses mais frios. Segundo os autores, os altos níveis de cortisol durante estes meses podem representar uma resposta ao stress causado pelo frio, como uma adaptação às condições climáticas adversas. Respostas similares foram encontradas em cervos quando a temperatura ambiente mínima teve o maior efeito sobre os níveis de cortisol (Huber et al., 2000).

1.3. O stress e a dominância

Nesse item, apresentaremos uma revisão da literatura sobre a relação da dominância com os perfis hormonais somente para machos, uma vez que, na população estudada na presente pesquisa, apenas os indivíduos machos adultos apresentam relações de dominância claras (Izar, 2004, 2008).

O stress, a dominância e os níveis de cortisol

Grande parte dos estudos endócrino-comportamentais de primatas machos vinha focando a dominância em relação ao eixo testicular, enquanto estudos de pesquisadores como Manogue, Keverne, Kaplan e Sapolsky, nas décadas de 70 e 80 do século passado deram visibilidade à importante relação entre o ranking social e o funcionamento do eixo adrenocortical. A partir do início da compreensão da fisiologia do stress, dos mecanismos mediadores de doenças a ele relacionados, e das bases das diferenças nas repostas de cada indivíduo a eventos dessa natureza, o interesse no eixo adrenocortical tornou-se bastante compreensível (Sapolsky, 1993).

Apesar das atividades dos GCs serem críticas para a sobrevivência a um estressor físico agudo, todas elas são ações catabólicas altamente custosas. De um modo ótimo, os efeitos desses hormônios devem ser minimizados durante períodos sem stress. Estudos de machos dominantes de primatas em hierarquias estáveis têm mostrado que seus eixos adrenocorticais possuem precisamente estes atributos. Em geral, eles têm as concentrações basais de cortisol mais baixas (Sapolsky, 1993).

Manogue e colaboradores (1975) relataram esse padrão em populações de micos de cheiro (*Saimiri sciureus*) cativos, cuja liderança e hierarquia não tiveram mudanças por sete anos. Keverne e colegas (1982) registraram a mesma observação em um grupo cativo de macacos talapoin (*Miopithecus talapoin*) após o estabelecimento de uma hierarquia estável. Finalmente, Sapolsky (1982, 1989) observou o mesmo padrão de baixas concentrações basais de cortisol em machos de alto ranking em babuínos selvagens (*Papio anubis*). Estudos subseqüentes desses animais mostraram que essas baixas concentrações eram devido à baixa taxa de secreção do hormônio, mais do que ao aumento da retirada do hormônio da circulação (Sapolsky, 1983b). Shively e Kaplan

(1984) registraram que, entre os macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), machos dominantes tendiam a ter menores glândulas adrenais. Estes resultados apoiaram as observações gerais do sistema adrenocortical.

Os indivíduos dominantes parecem não ter apenas o padrão adaptativo de concentrações basais baixas de cortisol, mas, quando um estressor ocorre, eles mostram as maiores e/ou mais rápidas elevações das concentrações desse hormônio. Isso foi observado em respostas de populações estáveis de micos de cheiro às situações estressantes como ficar preso em uma cadeira e exposição a uma cobra (Manogue, 1975). O mesmo resultado foi observado em babuíños selvagens quando o estressor era o processo de atirar-lhes dardos e anestesiá-los (Sapolsky, 1982).

Finalmente, machos dominantes em hierarquias estáveis parecem ser mais sensíveis à regulação de retro-alimentação que ajuda a diminuir a resposta ao stress. Normalmente, o eixo adrenocortical – assim como a maioria dos eixos endócrinos – é sujeito ao controle da retro-alimentação negativa, no qual níveis elevados do hormônio final inibem a atividade inicial do eixo. Durante um estressor, essa regulação inibitória é excedida, e a hipersecreção continua. Ao fim do estressor, tal sensibilidade à retro-alimentação negativa é reinstalada (Keller-Wood e Dallman 1984). Babuíños com baixas concentrações basais de cortisol – ou seja, predominantemente machos de alto ranking – foram mais sensíveis à regulação de retro-alimentação negativa do que os subordinados. Eles também mostraram diminuição da concentração de cortisol mais rápida em resposta aos efeitos inibitórios do GC sintético, dexametasona (Sapolsky, 1983b).

Portanto, machos dominantes em uma hierarquia estável tendem a ter um nível mais baixo de cortisol durante o descanso do que machos subordinados, uma habilidade para aumentar rapidamente a secreção desse hormônio durante o stress e uma

sensibilidade aumentada à retro-alimentação negativa da secreção do hormônio (Sapolsky, 1993a).

Da mesma forma, devemos considerar a taxa à qual um indivíduo é exposto a estressores psicológicos. Como já mencionado, uma literatura extensa tem demonstrado que variáveis psicológicas podem estimular a resposta ao stress e podem modular a resposta a estressores físicos de forma acentuada (Bakshi and Kalin, 2000; Levine et al., 1989; Lui et al., 1997; McEwen, 2001; Sapolsky et al., 2000). Normalmente, para estressores físicos semelhantes, a probabilidade de indivíduos apresentarem uma resposta ao stress ou doenças relacionadas ao stress é maior se eles não têm controle ou perdem o controle sobre a previsibilidade do estressor. Isso torna importante o entendimento de como diferenças relacionadas ao ranking podem fazer com que os indivíduos consigam controlar o acesso aos recursos, estejam sujeitos a agressões e consigam estabelecer relações sociais estáveis e previsíveis (Abbot et al., 2003).

Finalmente, a resposta a estressores físicos ou sociais é consideravelmente enfraquecida pela disponibilidade de canais de saída para frustrações sociais ou de apoio social (Sapolsky, 2002). Portanto, diferenças relacionadas à posição hierárquica na disponibilidade de contato social, cuidado social, comportamento sexual e deslocamento de frustração agressiva tornam-se tão relevantes quanto a própria posição e o grau do estressor (Abbott et al., 2003).

De acordo com Abbott e colaboradores (2003), relações de parentesco podem afetar a resposta ao stress em ao menos dois modos. Primeiro, parentes próximos são particularmente predispostos a prover apoio em coalizões, e, através disso, diminuir os estressores sociais. Segundo, a proximidade entre parentes e as atividades que advêm dessa proximidade - como a catação - são um ótimo meio de amenizar estressores resultantes da vida em sociedade.

Esses pontos são, talvez, melhor apreciados quando contrastamos a vida social altamente baseada em parentesco de fêmeas de sagüis (*Callithrix jacchus*) com a vida social de babuínos e macacos talapoin machos, que não se baseia em parentesco. Neste contexto, machos subordinados foram identificados como apresentando riscos significativos para hipercortisolismo, sugerindo que as interações comportamentais não freqüentes com parentes próximos podem ter grandes implicações para mudanças no eixo HPA de machos ao longo do tempo (Abbott et al., 2003).

O stress, a dominância e os níveis de testosterona

Em geral, altas taxas de agressividade têm sido correlacionadas positivamente com concentrações elevadas de testosterona em primatas. Podemos observar as concentrações de testosterona e as taxas de agressão de forma correlacionada em muitas espécies; assim como o aumento da agressividade e da testosterona na puberdade; e as flutuações sazonais de ambos, agressividade e testosterona, de muitas espécies.

Entretanto, essa relação deve ser interpretada com cuidado. Em primeiro lugar, os hormônios não são nem necessários nem suficientes para a agressão ocorrer; castração nem sempre resulta em queda de agressividade; e a queda de agressividade após a castração nem sempre é restabelecida após a administração de testosterona. Além disso, quantidades extremamente pequenas de esteróides podem reinstalar a agressão tão eficientemente quanto o restabelecimento das concentrações pré-castração, o que implica em uma relação não linear entre a concentração de hormônio e a taxa de agressão (Sapolsky, 1993).

Entre primatas, fatores sociais, como aprendizado, apresentam papéis importantes na determinação desses eventos (Sapolsky, 1993). A testosterona, portanto,

parece ter um papel mais modulatório do que de fato um efeito de ativação da agressão (Dixson, 1979).

Além destes parâmetros, estudos mostram que o *status* social elevado de machos em uma hierarquia estável não está associado com altas taxas de agressão e altas concentrações de testosterona. Em tais instâncias, machos de alto ranking parecem não ser os mais agressivos (Dixson, 1979; Eberhart et al., 1980; Jolly, 1985; Rowell, 1972; Sapolsky, 1982), até porque um indivíduo não tem que reafirmar constantemente sua dominância através da luta para obter uma dominância estável (Jolly, 1985). Em casos nos quais os machos dominantes estão frequentemente em interações agonísticas, eles raramente são os iniciadores (Sapolsky 1983a, 1993).

O eixo testicular de machos de alto ranking em hierarquias estáveis, no entanto, parece ter ao menos algumas características distintas (Sapolsky 1982, 1986b). Em praticamente todas as espécies de mamíferos analisadas, a secreção de testosterona é inibida dramaticamente pelo stress, ou por uma causa psicogênica (Rose, 1985). Entre os babuínos oliva selvagens estudados por Sapolsky (1982), concentrações de testosterona foram suprimidas tanto por um estressor agudo, como os processos de atirar os dardos e de anestesiá-los, quanto por um sustentado, como a aridez (Sapolsky, 1986a).

Enquanto machos dominantes não tinham concentrações mais elevadas de testosterona em condições basais, eles eram relativamente mais resistentes aos efeitos inibitórios do stress. Portanto, após tiros de dardos ou anestesia, as concentrações de testosterona caíam prontamente em machos subordinados e continuavam seu declínio por pelo menos oito horas. Em contraste, machos de alto ranking tinham as concentrações de testosterona elevadas durante as primeiras horas pós-stress (Sapolsky 1982, 1986b).

Os mecanismos desses fenômenos estão sendo compreendidos. A diminuição das concentrações de testosterona durante o stress provém do declínio da secreção do hormônio, mais do que do declínio da sua liberação no sangue (Sapolsky 1985). O declínio da secreção ocorre devido a uma liberação de opióides induzida por stress (ativada principalmente através de receptores μ -opio) que suprime a secreção de hormônio luteinizante (LH) pela pituitária (Sapolsky e Krey, 1988), e pela liberação de GCs induzida pelo stress, que inibem a sensibilidade testicular ao LH (Sapolsky, 1985). Machos de babuíno pertencentes ao topo do ranking são resistentes a esses fenômenos. Em testes, eles eram menos sensíveis às ações supressoras dos GCs (Sapolsky, 1985).

Além disso, a liberação de catecolaminas simpáticas induzida por stress aumentou a secreção de testosterona apenas em machos de alto ranking (Sapolsky 1986b), o que pode ser devido a dois fatores: maior fluxo simpático e/ou maior sensibilidade dos tecidos alvos. Por meio da ação de catecolaminas, ambos resultam diretamente na estimulação da esteroideogênese testicular ou na vasodilatação do parênquima testicular, aumentando, portanto, a quantidade de LH que alcança os testículos (Frankel e Ryan 1981).

Portanto, enquanto os machos de babuínos de alto ranking pertencentes a uma sociedade de hierarquia estável não têm as concentrações basais de testosterona mais altas, eles são capazes de manter – e mesmo elevar – essas concentrações durante o stress (Sapolsky 1990a, 1993).

Lynch e colaboradores (2002) estudaram, durante um ano, as variações fisiológicas e comportamentais de macacos-prego (*Cebus nigritus*) machos que vivem em um fragmento de Mata Atlântica na Estação Ecológica de Caratinga (MG). Seus resultados sugerem que o macho alfa apresenta perfis de andrógenos similares aos dos machos adultos subordinados durante todo o ano. E, embora os pesquisadores não

tenham medido a variação da resposta de andrógenos a estressores, os níveis de testosterona aumentaram juntamente com a elevação da concentração de cortisol independentemente do ranking durante o período de procriação.

Além disso, durante a estação na qual machos mostraram as taxas mais altas de agressão, foram encontradas baixas concentrações de testosterona (Lynch et al., 2002).

1.4. O stress e a reprodução em machos

Em alguns primatas poligínicos, como micos de cheiro, cerca de um mês antes do início da estação de acasalamento ocorre um aumento nos níveis de cortisol (Wiebe et al., 1996). Este fenômeno pode estar relacionado ao padrão de engorda (*fattening*), uma estratégia reprodutiva de machos para armazenagem de energia em forma de gordura. A energia extra aumenta a habilidade de competir pelo acesso a cópulas em potencial e, portanto, é esperada em espécies com alta competição sazonal (como visto em macacos rhesus, *Macaca mulatta*: Bercovitch, 1992).

Em contraste, no macaco promíscuo muriqui (*Brachyteles arachnoides*), que demonstra alta tolerância entre machos, o nível de cortisol não aumenta antes da estação de acasalamento (Strier et al., 1999).

Em macacos-prego, e em outras espécies com pouca competição observável entre machos, não se espera um aumento nos níveis de cortisol antes do pico de atividade sexual das fêmeas. O estudo de Lynch e colaboradores (2002) com *Cebus nigrinus* obteve resultados que seguem nessa direção, de forma que não houve aumento nas concentrações de cortisol na estação de pré-procriação. Esse aumento só foi observado após a exibição crônica de corte por fêmeas proceptivas, que dura horas ou dias, e pode estar relacionado a uma resposta ao estímulo sexual dessas demonstrações. Além disso, durante o início da estação chuvosa, na qual machos mostraram as taxas

mais altas de agressão, todos os machos tinham consistentemente baixas concentrações de cortisol (Lynch et al., 2002).

Os andrógenos e a reprodução

O comportamento de cópula de ratos machos é dependente de testosterona (Meisel e Sachs, 1994) e o aumento deste hormônio aumenta a preferência pelo odor de fêmeas no estro (Stern, 1970). Testosterona, em conjunto com o hormônio folículo estimulante (FSH), parece ser essencial para a maturação da espermatide, e pode influenciar a fertilidade em machos (Williams-Ashman, 1988; McLachlan et al., 1996).

Estímulos sociais ou ambientais podem influenciar o aumento da testosterona em primatas (Strier et al., 1999). Para machos de macacos rhesus cativos, Herndon e colaboradores (1996) observaram que os níveis de testosterona flutuam sazonalmente mesmo sem a presença de fêmeas sugerindo que estímulos ambientais por si só podem ser suficientes para ativar respostas gonadais de machos. O contato visual com fêmeas é suficiente para manter as concentrações sazonais de testosterona em machos ou mesmo para iniciar um aumento dos níveis deste hormônio, sugerindo que as flutuações de testosterona podem ser mediadas socialmente (Gordon et al., 1978; Schiml et al., 1996; Brockman et al., 1998).

A hipótese de desafio

A hipótese de desafio (Wingfield et al., 1990) pressupõe uma relação direta entre padrões temporais de andrógenos masculinos e sistemas de acasalamento ou estratégias de procriação dos indivíduos. Em espécies poligínicas, prediz-se que níveis de testosterona são positivamente relacionados ao grau de agressão de machos em competição sexual por acasalamentos (Wingfield *et al.*, 1990; Wingfield *et al.*, 1999).

Em modelos baseados em estudos empíricos com aves, nos quais machos atraem fêmeas para um território e protegem esse território de intrusos, são esperados níveis basais de andrógenos durante as estações sem acasalamento, um pico durante a época de competição entre machos por fêmeas no princípio da estação de acasalamento e níveis reprodutivos de testosterona intermediários durante a estação de acasalamento (Wingfield et al., 1990). Enquanto a hipótese do desafio mostrou-se eficiente para explicar resultados de estudos posteriores de aves (Beletsky et al., 1995; Wingfield e Farner, 1993; Vleck e Brown, 1999), répteis (Marler e Moore, 1988; Klukowski e Nelson, 1998) e anfíbios (revisado em Houck e Woodley, 1994), ela pode necessitar de modificações quando aplicada a mamíferos sociais cujos machos viajam juntos durante o ano dentro de grupos sociais coesos (i.e., Creel et al., 1993; Creel *et al.*, 1997; Holekamp e Smale, 1998).

Na maioria dos mamíferos poligínicos, machos perseguem ativamente as fêmeas para adquirir cópulas (Dixson, 1998; Clutton-Brock, 1989). A competição pelo acesso a um número limitado de fêmeas frequentemente resulta em níveis altos de agressão entre machos (Darwin, 1871; Trivers, 1972). O aumento da agressão entre machos no pico da estação de acasalamento dificulta distinguir os efeitos da agressão versus a flutuação sazonal nas concentrações de andrógenos devido à atividade sexual (Wingfield *et al.*, 1999). Em contraste, algumas espécies de mamíferos sociais, como machos de macaco-prego (*Cebus sp*), mostram alta tolerância entre os indivíduos durante a estação de procriação, com uma competição sexual por cópulas pouco observável (Janson, 1984, 1986; Robinson e Janson, 1987; Lynch, 1998; Phillips *et al.*, 1994; Linn *et al.*, 1995).

Entre machos de muriquis (*Brachyteles arachnoides*), por exemplo, os níveis de testosterona não variam significativamente entre períodos copulatórios e não copulatórios (Strier et al., 1999). Estes primatas são altamente tolerantes, apresentando

relações igualitárias durante todo o ano e escolha de cópulas pelas fêmeas baseadas em preferências sociais e evitação de parentesco (Strier, 1997).

Segundo Lynch e colaboradores (2002), a disputa agressiva pelas cópulas também não era esperada entre os machos de *Cebus nigritus* da Estação Ecológica de Caratinga. Em macacos-prego, embora relações de dominância entre machos sejam mantidas por interações agonísticas, praticamente não ocorre competição agressiva por acesso a fêmeas sexualmente receptivas. Assim, a associação entre a atividade sexual e as variações sazonais de andrógenos pode ser analisada sem interferência da agressividade. Os dados dos pesquisadores mostraram que o macho alfa – apesar de ter sido claramente preferido pelas fêmeas para a corte, e de ter demonstrado um estilo estendido de corte (montas múltiplas e exibições pós-copulatórias) – apresentou um perfil de andrógenos similar aos dos machos adultos subordinados durante todo o ano. Inclusive durante o período de atividade sexual sincrônica das fêmeas adultas.

A Hipótese de balanço

A Hipótese de balanço (Ketterson e Nolan, 1999), por sua vez, propõe que concentrações de testosterona em machos de espécies bi-parentais reflitam o balanço entre o esforço reprodutivo do macho direcionado à cópula *versus* seu esforço parental. A hipótese prediz que machos monogâmicos e bi-parentais mostrarão diminuição de testosterona durante os períodos em que o comportamento de conflito entre machos for desnecessário ou incompatível com outros comportamentos, como o cuidado com infantes. Apesar de esta predição ter sido, assim como a predição da hipótese de desafio, bastante testada em aves, muitas espécies de mamíferos também têm sido utilizadas para validá-la. Por exemplo, os níveis de testosterona caíram durante a expressão de cuidado parental em hamsters bi-parentais (*Phodopus campbelli*), e não houve queda

similar em hamsters não-parentais (*P. sungorus*, Reburn e Wynne-Edwards, 1999). Os níveis de testosterona também caíram durante o período de alto cuidado parental em machos de sagüis-de-tufos-pretos-de-Wied (*Callithrix kuhli*, Nunes et al., 2000).

Apesar de macacos-prego não apresentarem um cuidado bi-parental como o observado em calitriquídeos, os machos participam da vigilância dos filhotes e estão geralmente próximos deles, inclusive durante a alimentação (Ferreira et al., 2006), o que poderia estar relacionado a menores níveis de andrógenos no período após o nascimento dos filhotes. Apesar destes indicativos, os níveis de testosterona dos machos dos macacos-prego (*Cebus nigritus*) da Estação Ecológica de Caratinga não diminuíram no período pós-parto (Lynch et al., 2002).

Embora Lynch e colaboradores (2002) não tenham encontrado a queda de andrógenos sugerida pela Hipótese do Balanço, no presente estudo esta hipótese será testada novamente, uma vez que estudos anteriores realizados no PECB têm demonstrado que o macho alfa mantém proximidade e é tolerante ao forrageamento de recursos importantes por jovens e infantes (Peternelli, 2009), o que é indicativo de um grau de cuidado parental (Izar, 1994).

1.5. O stress e a reprodução em fêmeas

Muitos estudos têm focado a elevação de GCs em relação a mudanças sociais e ambientais (revisado em Sapolsky, 2002, citado por Weingrill et al., 2003; Wingfield e Ramenofsky, 1999), mas apenas alguns deles envolvem fêmeas de mamíferos de vida livre (e.g., Cavigelli, 1999; Creel et al., 1997; Goymann et al., 2001; van Schaik et al., 1991). Embora estressores sazonais tenham tido um forte efeito sobre os níveis fecais de cortisol em fêmeas de babuínos, independentemente do *status* reprodutivo (Weingrill et al., 2003), vários estudos indicam que hormônios ovarianos estimulam o eixo HPA.

Estrógeno exógeno, por exemplo, aumenta os níveis de cortisol em muitos primatas (Coe et al., 1986; Pepe et al., 1982; Smith e Norman, 1987; Stavisky et al., 2003).

Embora já tenhamos comentado que altos níveis de stress por longos períodos podem ter um impacto sobre a reprodução, podendo causar sua supressão, dados indicam que a supressão da fertilidade em sagüis e micos não está associada a altas concentrações de cortisol (Saltzman et al., 1994; Ziegler et al., 1995). Bercovitch e Ziegler (2002) sugerem que ajustes metabólicos relacionados à reprodução podem promover elevações de esteróides adrenais e gonadais, e que o cortisol pode até mesmo aumentar a fertilidade de fêmeas.

As concentrações de cortisol variam durante o ciclo ovariano em muitas espécies, aumentando durante a fase folicular, tendo o pico durante o final desta fase e início da fase luteal, e declinando do meio até o final da fase luteal (para ratos ver Raps et al., 1971 e Phillips e Poolsanguan, 1978, para camondongos ver Nichols e Chevins, 1981, para humanos ver Genazzini et al., 1975, para micos ver Ziegler et al., 1995, e para sagüis ver Saltzman et al., 1998).

Em macacos *Cebus* do sexo feminino, um experimento recente mostrou que desde a metade da infância, e ao longo da idade adulta, o hipercortisolismo parece ser a norma (Lahoz et al., 2007). Lahoz e colaboradores observaram que fêmeas jovens apresentaram uma resposta maior de cortisol a estressores do que fêmeas adultas e que os altos valores de cortisol continuaram elevados durante o ciclo ovariano apesar de mudanças nas concentrações de estradiol e progesterona.

Além disso, os pesquisadores injetaram dexametasona (um GC sintético que suprime a produção de GCs endógenos) e observaram os níveis de progesterona. Fêmeas jovens apresentaram uma supressão rápida de progesterona e cortisol causada por injeções de dexametasona. Esta correlação indicou que a maior parte da

progesterona circulante era originária do mesmo local em que os GCs são produzidos, ou seja, das glândulas adrenais. Fêmeas adultas, por outro lado, apresentaram um aumento nos níveis de progesterona e cortisol em resposta a estressores, mas esse efeito foi exacerbado pela dexametasona (Lahoz et al., 2007).

Estes resultados sugerem que, em macacos-prego, o hipercortisolismo é insuficiente para prejudicar o desenvolvimento ovariano em uma função cíclica normal, e que esteróides ovarianos não influenciam os níveis de cortisol diários. Além disso, é improvável que o aumento dos níveis de progesterona induzidos por stress e/ou por GCs interfira no desenvolvimento da fase luteal – fase após a ovulação na qual o corpo lúteo produz grandes quantidades de progesterona – mais prematura.

1.6. Interações entre os eixos HPA e HPG

Embora a inibição da liberação de hormônios gonadais seja uma das funções melhor conhecida dos GCs em algumas espécies (Sapolsky et al., 2000), estudos mostram que a injeção de testosterona eleva os níveis de GCs em aves de vida livre (e.g., Ketterson et al., 1991; Schoech et al., 1999). Estes resultados sugerem uma interação complexa entre os sistemas gonadal e adrenal, na qual os GCs regulam a liberação de andrógenos gonadais, e estes aumentam, concomitantemente, a liberação de GCs.

O ovário apresenta receptores para GCs, sendo também susceptível à ação destes hormônios. Em adição a um efeito direto sobre os ovários, os GCs afetam a função ovariana indiretamente através do eixo HPA (Omura e Morohashi, 1995). Hormônios gonadais podem, portanto, ser importantes reguladores fisiológicos das mudanças sazonais das concentrações de GCs (Romero, 2002).

1.7. Falhas no conceito de stress, e a alostase

Após a criação do conceito de stress por Canon (1932) e Seyle (1946), pesquisadores tentaram refiná-lo (e.g. Levine, 2005). Romero e colaboradores (2009) propõem que grande parte da insatisfação em relação aos conceitos existentes originou-se a partir de dois problemas. O primeiro é que o termo stress passou a abranger três conceitos relacionados – estímulos (internos e externos) que causam stress, a emergência fisiológica e as respostas comportamentais ativadas em resposta a esses estímulos imediatos, e as consequências patológicas do excesso de estimulação das respostas de emergência (Le Moal, 2007; Romero, 2004). Usualmente nos referirmos a estímulos como estressores, a respostas de emergência como resposta ao stress, e ao excesso de estimulação das respostas de emergência como o stress crônico. O stress crônico é então associado ao aumento do risco de doenças associadas ao stress e à patologia (Romero, 2004).

A segunda insatisfação vem da falta de habilidade para definir rigorosamente esses três conceitos. Quando um estímulo é um estressor? Usualmente, um estressor é definido como um estímulo que inicia a resposta ao stress. Mas que respostas fisiológicas e comportamentais são respostas ao stress? Considera-se que uma resposta fisiológica ou comportamental é uma resposta ao stress se é iniciada por um estressor. Esta definição é claramente circular, e o problema é agravado quando tentamos determinar quando uma resposta ao stress presumivelmente benéfica torna-se patológica (Romero et al., 2009).

A tentativa mais comum de resolver este dilema tem sido definir estressor como um estímulo que desfaz a homeostase, como fizemos no início da introdução. No entanto, o conceito de homeostase também apresenta limitações (Schulkin, 2003).

Segundo Romero e colaboradores (2009), a tentativa mais recente de redefinir stress foi a criação do conceito de *alostase* (Sterling e Eyer, 1988). Embora este conceito venha sendo aplicado em inúmeros contextos biomédicos, o trabalho de McEwen e Wingfield (2003b) foi a primeira - e continua sendo uma das únicas - tentativa de usar alostase para ligar dados ecológicos e biomédicos.

McEwen e Wingfield (2003b) definem alostase como um processo de manutenção da estabilidade (homeostase) através da mudança de mecanismos fisiológicos. Alostase conta, portanto, com ajustes fisiológicos diários e sazonais (nomeados estados alostáticos) que mantêm os parâmetros fisiológicos – como a glicose sanguínea – dentro dos parâmetros estreitos de sustentação da vida. Em outras palavras, enquanto homeostase refere-se à manutenção de parâmetros fisiológicos, a alostase se refere a mecanismos fisiológicos que mantêm estes parâmetros. Como consequência, existe uma diferença entre as variáveis fisiológicas que são mantidas constantes e aqueles mediadores que variam para manter essa constância.

Neste contexto, **estado alostático** (*allostatic state*) refere-se a níveis de atividade alterados ou sustentados de mediadores primários como GCs (ver Tabela 1 para mais exemplos), que integram a fisiologia e o comportamento em resposta à variação do ambiente físico e social.

Mudanças ambientais – como tempestades ou condições de inverno – e mudanças no ciclo de vida – como gravidez, podem fazer o animal trabalhar mais para manter a estabilidade dos parâmetros fisiológicos. McEwen e Wingfield (2003b) nomearam o aumento da carga de trabalho como **carga alostática** (*allostatic load*) e propuseram que ela pode ser medida pelo gasto total de energia. Ela pode ser considerada o resultado de rotinas diárias ou sazonais que organismos apresentam para

sobreviver. Dentro de limites, a carga alostática é uma resposta adaptativa a demandas sazonais (McEwen e Wingfield, 2003b).

Mudanças no ambiente ou no ciclo de vida, no entanto, podem ser aditivas. Dessa forma, um animal pode ter que se esforçar ainda mais se existirem mudanças concomitantes, “como uma tempestade ocorrendo durante a gravidez” (Romero et al., 2009). Se cargas adicionais de eventos imprevisíveis forem impostas a um indivíduo, então a carga alostática pode aumentar substancialmente (McEwen e Wingfield, 2003b).

Os autores identificaram duas formas de um animal ter problemas causados pelo aumento excessivo da carga alostática. A primeira é nomeada **sobrecarga alostática** (*allostatic overload*) **do Tipo I**, que ocorre quando a demanda energética do animal para a manutenção da homeostase excede a energia que ele consegue obter do ambiente. A sobrecarga alostática do Tipo I inicia então um estágio de emergência do ciclo de vida, no qual o animal ajusta seu comportamento e fisiologia para diminuir a carga alostática (Romero et al., 2009). Esta medida é particularmente útil no nosso estudo, uma vez que temos acesso à porcentagem do forrageamento que compreende itens alimentares de baixo valor energético (folhas) e alto valor energético (frutos), e a flutuação deste consumo ao longo do ano.

O segundo tipo é denominado **sobrecarga alostática do Tipo II**, que ocorre quando a carga alostática é alta por um longo período. Como consequência, a própria ativação prolongada de sistemas fisiológicos que medeiam a alostase torna-se patológica, apesar da presença adequada de energia (Romero et al., 2009).

McEwen e Wingfield (2003b) propõem que os conceitos de alostase, carga alostática e sobrecarga alostática podem prover uma estrutura para o entendimento de como um animal lida com mudanças imprevisíveis, e que esta estrutura pode ser testada rigorosamente avaliando os orçamentos de energia dos animais.

Neste contexto, redefinimos os termos. *Stress* é utilizado para descrever eventos que ameaçam um indivíduo e que podem elicitar respostas fisiológicas ou comportamentais como parte da alostase, juntamente com o que já é imposto pelo ciclo normal de vida. A resposta ao stress pode agora ser incluída nos processos de alostase, carga alostática e sobrecarga alostática, de acordo com as repercursões dessa resposta na fisiologia do animal (McEwen e Wingfield, 2003b).

As respostas “previsíveis” do ciclo de vida, mais as respostas a eventos imprevisíveis que têm o potencial de serem estressores, requerem energia extra que será adquirida do ambiente e/ou de reservas endógenas de gordura, glicogênio e proteínas (McEwen e Wingfield, 2003b). Muitos estudos de campo em diversos habitats indicam que populações de vida livre apresentam níveis elevados de GCs quando estão em estágios de ciclo de vida emergenciais (Wingfield e Romero, 2000).

McEwen e Wingfield (2003b) criaram uma estrutura (Figura 2) para modelar as necessidades energéticas (E) de um animal durante o ciclo de vida. Esta estrutura diferencia-se da Hipótese Preparatória uma vez que não necessita que os estressores tenham ocorrido durante milhares de anos a ponto de serem “previstos” fisiologicamente. Aqui, variações imprevisíveis podem apresentar efeitos distintos nas concentrações de GCs.

Nas figuras 2 e 3, E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente (de Wingfield et al., 1998; Wingfield e Ramenofsky, 1999).

Na Figura 2a, essas necessidades energéticas são representadas como linhas contínuas. Na Figura 2b, as mudanças nos níveis de energia têm sido ajustadas para

representar prováveis variações em relação a estações. Espera-se que o E_G aumente substancialmente na primavera e no verão e, então, decline durante o outono até o inverno quando a produção primária é baixa. E_E deve ter seu ponto mais baixo no verão quando as temperaturas são altas. E_I deve ser constante (em condições ideais) e varia em paralelo com E_E (McEwen e Wingfield, 2003b).

Na Figura 2c, tendo em vista que os níveis de energia variarão de maneira potencialmente complexas, E_E e E_I são mantidas como linhas contínuas por simplicidade. Aqui, os autores introduziram custos adicionais incorridos após uma perturbação (como uma tempestade) que aumenta os custos acima de E_E e E_I . A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. A carga alostática aumenta quando E_O persiste no tempo. Se E_O excede E_G então a sobrecarga alostática do tipo I tem início, resultando na elevação dos níveis de GCs plasmáticos. Isso deve acionar um estágio de emergência do ciclo de vida que resulta em mudanças fisiológicas e comportamentais que “tentam” reduzir a sobrecarga alostática (McEwen e Wingfield, 2003b).

Na Figura 2d, se os autores representarem os efeitos de E_O em condições naturalmente mais flutuantes, então no inverno a sobrecarga alostática do tipo I ocorre rapidamente (McEwen e Wingfield, 2003b).

Figura 2. Estrutura de modelagem das necessidades energéticas (E) de organismos durante o ciclo de vida. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. (a) Linhas contínuas. (b) Mudanças sazonais. (c) Custos adicionais após mudanças no ambiente. (d) E_O em condições flutuantes (McEwen e Wingfield, 2003b).

Se eventos adicionais ocorrem no ambiente, como tempo ruim, mudanças no habitat, entre outros (veja Wingfield, 1994), há um aumento da energia necessária para obter comida sob essas condições não ideais (E_O , Figura 2c) e a secreção de GCs também aumenta. Enquanto a soma de E_E , E_I e E_O continua abaixo de E_G , então o indivíduo pode continuar a seguir seu ciclo de vida normal. Se E_E , E_I e E_O exceder E_G , então o balanço energético pode aumentar a secreção de GCs, resultando em uma mudança fisiológica e comportamental delineada para promover a sobrevivência (o estágio de emergência do ciclo de vida; Wingfield and Ramenofsky, 1999). A carga alostática aumenta quando E_E , E_I e E_O aumentam, e se torna sobrecarga alostática do Tipo I quando excede E_G (Figura 2c). Se a mesma perturbação (E_O) ocorre no inverno,

então a sobrecarga alostática é alcançada mais rapidamente (Figura 3d) comparada ao verão (Figura 3a).

Adicionalmente, se condições ambientais, ou *status* social, aumentam E_E e E_I , então o mesmo E_O resulta em uma sobrecarga alostática do tipo I, mesmo no verão (Figura 3b). Um resultado similar é obtido se E_G decai (Figura 3c). Se E_E e E_I aumentam junto com um aumento de E_G , então no inverno o indivíduo pode estar constantemente com sobrecarga alostática do tipo I, necessitando de uma resposta prioritária – o estágio de emergência do ciclo de vida (Figura 3d). Mesmo no verão E_O pode resultar em sobrecarga alostática do tipo I muito rapidamente (Figura 3d).

Figura 3. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais. Um esquema representativo dos efeitos de E_O , uma linha mostra o aumento dos custos energéticos necessários para sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições não ideais. Se isso ocorre no final da primavera (a), então o aumento sazonal no E_G e a queda no E_I e E_E podem cobrir os custos de E_O . (b) Um modelo dos efeitos caso ferimentos, doenças ou estilo de vida deletério permanentes aumentem E_E e E_I para perto dos recursos disponíveis (E_G), neste caso, o indivíduo pode estar susceptível a uma perturbação (E_O) resultando em sobrecarga. Uma perturbação (E_O) ocorrendo no inverno, ou um período quando recursos estão em declínio, podem resultar em uma sobrecarga alostática praticamente imediata. (c) Um cenário no qual E_G é reduzido substancialmente. Isso

pode ocorrer na natureza como resultado de uma mudança climática ou outra perturbação. Adicionalmente, em sociedades de primatas, o *status* reduz os recursos disponíveis (E_G). Então no inverno os indivíduos podem estar sempre em sobrecarga alostática do tipo I, e mesmo no verão o E_G não aumenta o suficiente para prevenir a sobrecarga alostática de ocorrer se acontecer uma perturbação. A mesma perturbação (E_O) no inverno pode resultar em uma sobrecarga alostática do tipo I imediata. (d) efeitos caso ferimentos, doenças ou estilo de vida deletério permanentes aumentam E_E e E_I , e o *status* ou perturbações ambientais reduzem os recursos disponíveis (E_G), então o indivíduo apresentará sobrecarga alostática do tipo I durante o inverno e mesmo na primavera. Mesmo no verão, a susceptibilidade à perturbação (E_O) resultará em uma sobrecarga rápida (McEwen e Wingfield, 2003b).

O *status* social pode também apresentar efeitos substanciais sobre o E_E e E_G . Indivíduos dominantes terão um acesso maior a recursos restritos (aumento do E_G), enquanto indivíduos subordinados terão um acesso menor (diminuição do E_G). Além disso, indivíduos dominantes poderão explorar regiões com recursos mais ricos – reduzindo, portanto, o E_E – enquanto os subordinados serão forçados a explorar regiões com recursos mais pobres, o que provavelmente aumenta o E_E . Efeitos substanciais também podem decorrer de condições sociais e ambientais combinadas (e.g. Figura 3d). Um exemplo é quando um clima imprevisível e severo durante o inverno reduz a disponibilidade de alimento (E_G) e o *status* de subordinação dos indivíduos aumenta o E_E e o E_I em *blackbirds* europeus (*Turdus merula*). Os pássaros subordinados desenvolvem rapidamente uma sobrecarga alostática do tipo I e migram a partir da sua área normal de inverno na Alemanha para um ambiente mais benigno na Itália (McEwen e Wingfield, 2003b).

Os modelos de trabalho apresentados por McEwen e Wingfield (2003b) são importantes para o nosso estudo uma vez que hipotetizamos, assim como previsto pelos autores, que a variação na disponibilidade de frutos durante o ano e a variação de *status* dos indivíduos poderão resultar em modificações na secreção de GCs. Ao contrário da Hipótese Preparatória, este modelo abrange modificações agudas das concentrações de GCs. Por outro lado, ele é mais específico, restringindo-se às modificações causadas por

déficits energéticos. A sobrecarga alostática do tipo II não pode ser aqui testada uma vez que não temos dados, como as massas dos indivíduos, que possam nos indicar que ela está ocorrendo.

1.8. Modelo da Esfera de Ação de Reatividade (*Reactive Scope Model*)

Romero e colaboradores (2009) consideraram os pontos fortes e fracos do modelo alostático para montar um modelo gráfico (Figura 4) que incorporasse as respostas a estressores aos quais o animal está submetido, sem requerer mecanismos fisiológicos detalhados.

Segundo os autores, o objetivo foi criar uma estrutura abrangente para o stress focando apenas em como um animal responde para sobreviver a estressores, e como essas respostas adaptativas agudas podem se tornar patológicas se sustentadas.

Este tipo de abordagem é mais comum em estudos ecológicos que visam a compreensão de um evento fisiológico. Em contraste, a abordagem biomédica típica tem sido entender os mecanismos de resposta sem integrá-los para, então, construir uma hipótese de como e por que um organismo responde daquela forma (Romero et al., 2009). Este tipo de abordagem de baixo para cima, ou reducionista, de gerar uma teoria do stress não tem obtido sucesso. Por exemplo, já faz 60 anos desde que Selye (1946) identificou os GCs como mediadores primários da resposta ao stress, mas ainda não temos uma compreensão total de como eles ajudam os animais a sobreviver a um estressor.

Romero e colaboradores (2009) consideram que o uso do termo alostase pode provocar as mesmas confusões que o termo stress. Alostase é frequentemente descrita de forma diferente em diferentes publicações. Segundo os autores, uma definição restrita de alostase pode corresponder à faixa de Homeostase Preditiva, enquanto uma

definição mais ampla pode corresponder às faixas de Homeostase Preditiva e Reativa juntas. A fronteira entre estas duas faixas corresponde, aproximadamente, à definição de quantidade de energia que um animal necessita para a manutenção básica do forrageamento definidas por McEwen e Wingfield (2003b), embora a estrutura de trabalho de Romero et al. (2009) não se baseie mais somente em medidas energéticas.

Os Modelos Gráficos podem representar concentrações de diferentes mediadores fisiológicos (*eixo y* – exemplos de mediadores fisiológicos podem ser vistos na Tabela 1) sobre o tempo (*eixo x*). As concentrações dos mediadores são divididas em 4 faixas. A faixa mais inferior mostra as concentrações que são muito baixas para manter a homeostase e é chamada de faixa de **Falha Homeostática**. Acima deste limiar está a faixa de **Homeostase Preditiva**, que representa a variação do mediador fisiológico de acordo com as mudanças do ciclo de vida. A variação circadiana das concentrações do mediador está retratada como linha azul claro (Romero et al., 2009).

Figura 4. Os Modelos Gráficos do Modelo da Esfera de Ação de Reatividade. (A) Modelo Básico, (B) Modelo Básico para espécies não sazonais e (C) Modelo Básico com estressores agudos (Romero et al., 2009).

A faixa de Homeostase Preditiva varia dependendo das demandas do ciclo de vida e, portanto, de variações sazonais (Figura 4A). A faixa Preditiva se estende um pouco acima do pico circadiano em cada estação para englobar eventos diários previsíveis, como forrageamento, representados pela linha azul escuro que se encontra acima da linha azul claro (Romero et al., 2009).

Acima da faixa de Homeostase Preditiva está a faixa de **Homeostase Reativa**, que representa as concentrações de mediadores fisiológicos necessárias para manter a homeostase quando eventos imprevisíveis que ameaçam a homeostase ocorrem. As faixas de Homeostase Preditiva e Reativa formam uma esfera de ação para aquele mediador fisiológico. O limite superior da faixa de Homeostase Reativa é a concentração na qual o próprio mediador começa a causar danos, e é chamada de **Sobrecarga Homeostática**. Presume-se que o limiar entre a Homeostase Reativa e a Sobrecarga Homeostática não varie diária ou sazonalmente (Romero et al., 2009).

Na Figura 4B está representada uma versão simplificada do modelo gráfico apresentado em A para espécies não sazonais, como os humanos. A Figura 4C representa uma descrição gráfica da resposta a estressores. Cada linha vertical representa ambos: um aumento rápido do mediador dentro da faixa de Homeostase Reativa a fim de manter a homeostase diante de um estressor, e uma diminuição rápida no mediador uma vez que o estressor teve fim. O *estressor #2* é mais forte do que o *#1* e, portanto, requer uma resposta maior para manter a homeostase. Os estressores *#2* e *#3* são equivalentes, mas ocorrem em diferentes períodos do ano. Conseqüentemente, o mediador está em diferentes concentrações na faixa de Homeostase Preditiva. Portanto, o estressor *#3* tem menos probabilidade de iniciar uma resposta do mediador que se estenda para a faixa de Sobrecarga Homeostática (Romero et al., 2009).

Os mediadores fisiológicos

A Tabela 1 (também construída por Romero et al., 2009) lista os cinco sistemas que são geralmente considerados como os principais envolvidos na resposta ao stress e exemplos dos seus mediadores mais comuns. Os mediadores fisiológicos são especificamente os mediadores homeostáticos discutidos por McEwen e WingField (2003b).

Tabela 1. Mediadores fisiológicos e suas ações nos sistemas fisiológicos.

Sistema Fisiológico	Mediador Fisiológico	Faixa de homeostase Preditiva	Faixa de homeostase reativa	Faixa de homeostase de sobrecarga	Faixa de falha da homeostase
Imunológico	Prostaglandina Ativação da Célula-T Anti-copos Citocinas	Variação sazonal de combate a infecções	Mobilização do sistema imunológico	Doença autoimune Imunosupressão	Falha imunológica
HPA	Glucocorticóide ACTH	Necessidades Sazonais do ciclo de vida a. Necessidades energéticas b. Necessidades comportamentais c. Necessidades preparativas	Inibição do sistema imunológico Mobilização de energia Mudança de comportamento Inibição da reprodução Inibição do crescimento	Imunosupressão Diabetes Perda muscular Supressão reprodutiva Diminuição da sobrevivência	Desregulação energética Falha no balanço hídrico Insuficiência de catecolaminas Diminuição da sobrevivência
Cardiovascular (catecolaminas)	Taxa de batimentos Variação da taxa de batimentos	Necessidades energéticas do ciclo de vida	Luta ou fuga Mobilização de energia	Hipertensão Infarto do miocárdio Perda muscular	Hipertensão Letargia Diminuição da sobrevivência
Comportamental	Forrageamento Locomoção Migração Agressão conspécifica	Mudanças no ciclo de vida a. Necessidades energéticas b. Disponibilidade energética c. Presença de predadores d. Acesso a cópulas	Fuga Congelamento Aumento/diminuição do forrageamento Aumento do consumo de alimentos Aumento da vigilância Luta conspécifica	Imobilidade tônica Obesidade Ansiedade Medo Violência	
Sistema Nervoso Central	Neurogênese Arborização dendrítica Concentração de neurotransmissores Citocinas	Mudanças de conectividade neural do ciclo de vida Aprendizado e memória	Aumento da neurotransmissão Aumento do aprendizado e memória	Morte ou atrofia neural Depressão Diminuição da memória e do aprendizado	Stress pós-traumático

2 – OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi investigar quais são os principais fatores que modificam a fisiologia e o comportamento dos macacos-prego (*Cebus nigrinus*) que habitam o PECB. Embora alguns estudos tenham demonstrado que variações ambientais e sociais apresentam efeitos sobre as concentrações de GCs e de hormônios sexuais, a relevância destas variações para o ciclo de vida das diferentes espécies animais tem sido raramente testada (Romero, 2002).

Objetivos específicos:

1. Os objetivos iniciais do estudo foram calcular as médias das concentrações dos diferentes metabólitos para cada indivíduo ou categoria etária, determinar o quanto da variação dessas médias refletia o ritmo circadiano e estabelecer seus níveis mensais basais, relacionando os resultados aos diferentes desafios a que indivíduos de cada sexo, categoria etária e posição hierárquica estavam sujeitos. Esses dados são necessários para investigar se a variação das concentrações de cortisol está associada a respostas dos macacos-prego estudados a diferentes contextos. Para tanto, inicialmente, os níveis hormonais do seu ciclo normal de vida devem ser estabelecidos, para que as respostas a estressores possam ser distinguidas.

2. Verificar se existe variação sazonal de glucocorticóides ou de hormônios sexuais nos *Cebus nigrinus* do PECB por meio da comparação das médias mensais dos metabólitos destes hormônios, e se há fatores do ambiente físico e social que possam estar relacionados a esta variação por meio do cálculo da correlação entre as médias mensais dos metabólitos destes hormônios e as médias mensais destes possíveis fatores.

3. Testar a *Hipótese Preparatória*, verificando se o aumento dos níveis de metabólitos de cortisol antecede o inverno, período em que ocorre redução na oferta de alimentos no PECB, e pode levar os macacos-prego a um déficit alimentar, como sugerido pela baixa taxa reprodutiva das fêmeas (Izar et al., 2008), o regime de fissão-fusão do grupo (Nakai, 2007) e o tamanho da área de uso acima dos padrões da espécie e a baixa densidade populacional (Izar et al., 2008).

5. Testar a *Hipótese do desafio* por meio da comparação das médias de metabólitos de andrógenos e de taxas de agressão entre os períodos: estação sem procriação e estação de procriação.

6. Testar a *Hipótese do Balanço* por meio da comparação das médias de metabólitos de andrógenos entre os períodos: estação sem procriação; estação de procriação, período após o nascimento de filhotes.

7. Verificar se andrógenos e progesterona interagem com o cortisol por meio do cálculo da correlação entre as médias mensais dos metabólitos destes hormônios sexuais e as médias mensais de metabólitos de cortisol.

8. Verificar se a gravidez aumenta a carga alostática das fêmeas grávidas, comparando as médias de metabólitos de cortisol do período de gravidez com outros períodos.

9. Aplicar nossos dados ao modelo de trabalho proposto por McEwen e Wingfield (2003b) para verificar se mudanças na disponibilidade de energia no meio modificam os níveis de cortisol dos indivíduos do grupo.

10. Gerar modelos gráficos segundo a proposta de Romero e colaboradores (2009) a fim de disponibilizar uma estrutura abrangente das modificações de cortisol que ocorrem em indivíduos e classes etárias do grupo Pimenta I.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e sujeitos

O Parque Estadual Carlos Botelho é um lugar impressionante. Localizado no sudeste do estado de São Paulo (24°00' a 24°15'S, 47°45' a 48°10'O), sua área de cerca de 380 Km² de Mata Atlântica na Serra de Paranapiacaba – entre os municípios de São Miguel Arcanjo, Sete Barras, Tapiraí e Capão Bonito – tem duas características distintas e marcantes para quem estuda espécies selvagens: a beleza das árvores de cerca de 30 metros de altura cobertas de bromélias, e a dificuldade de se locomover pelo terreno bastante acidentado. No PECB a altitude varia de 30 a 1.003 m. A altitude do local de estudo variou entre 720 a 890 m.

O clima é subtropical úmido, com precipitação anual média de 1683,2 mm, não ocorrendo déficit hídrico na estação mais seca. De acordo com Dias *et al.* (1995), a média anual de temperatura é de 19,01°C, com mínima de 3,00°C e máxima de 29,00°C. A cobertura vegetal do PECB é formada por uma “Floresta Latifoliada Pluvial Tropical”, sendo em sua maior parte representada por floresta não perturbada ou com perturbações pouco significativas (Figura 5).

Figura 5. Vista do Parque Estadual Carlos Botelho no Município de São Miguel Arcanjo (Fotografia de Lucas Peternelli).

No PECB são encontradas três espécies de primatas, o muriqui ou monarcoveiro (*Brachyteles arachnoides*), o bugio (*Alouatta fusca*) e o macaco-prego (*Cebus nigrinus*). São encontradas quatro espécies de carnívoros predadores em potencial de primatas: *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Leopardus pardalis* e *Eira barbara* (Beisiegel, 1999). Ocorre também um grande predador aéreo, *Spizaetus tyrannus* e mais nove espécies menores de Accipitridae. A densidade populacional de *Cebus nigrinus* no PECB foi estimada em 2,3 indivíduos/km². No período de 2001 a 2004 foram registrados 14 grupos de macacos-prego com tamanho variável de 1 a 15 indivíduos, vivendo na área (Izar, 2004).

Engana-se quem imagina que animais frugívoros encontram abundância de alimentos em todas as áreas preservadas de Mata Atlântica. Além de os animais passarem a maior parte do dia em busca de alimentos no PECB, a oferta de frutos é sazonal, ocorrendo redução acentuada nos meses de inverno, fator que interfere no sucesso reprodutivo das fêmeas (Izar, 2004, 2008). O trabalho de Taira (2007) nos permite observar que, embora haja uma variabilidade supra-anual, de forma geral a disponibilidade de insetos e de frutos é maior no verão.

Segundo Izar (2004), a taxa de predação sobre os macacos-prego (*Cebus nigrinus*) que habitam o Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) é baixa em comparação a outros estudos de macacos neotropicais (i.e. Boinski, 1987). Ao longo deste estudo, foram observados apenas 16 episódios de reação a predadores em todos os grupos de macacos-prego observados no parque, totalizando 0,03 episódios por hora de observação, sendo que nenhum destes eventos resultou em predação.

3.2. Espécie em estudo

Assim como o PECB, os macacos-prego são impressionantes. A forma como manuseiam os objetos, seu comportamento social e seus movimentos rápidos e precisos despertam o interesse de muitos pesquisadores. Quem estuda esses animais no PECB não consegue se aproximar muito dos indivíduos, o que pode ser um pouco frustrante no início. Com o passar do tempo, eventos pequenos – como a catação de mãe no seu filhote – tornam o trabalho muito proveitoso e fazem valer os dias de campo intensos.

Anteriormente, os macacos-prego eram considerados uma única espécie, *Cebus apella*, com diversas sub-espécies classificadas de acordo com a região geográfica ocupada. Recentemente, quatro sub-espécies foram classificadas como espécies por Groves (2001): *C. apella* (Linnaeus, 1758), *C. libidinosus* (Spix, 1823), *C. nigrinus* (Golgluss, 1809) e *C. xanthosternos* (Wied-Neuwied, 1826) - Figura 6.

Figura 6. Distribuição geográfica de *Cebus* (www.icb.ufmg.br/zoo/primatas/cebus_map.htm).

Provavelmente, foi o ajuste às características variadas dos diversos ambientes que permitiu ao gênero *Cebus* a segunda distribuição geográfica mais ampla entre os primatas neotropicais (Izar e Ferreira, 2005), ocorrendo em toda a América do Sul e ocupando os mais diversos ecossistemas como cerrado, caatinga, matas semi-decíduas e a região amazônica (Mittermier e Coimbra-Filho, 1982).

No presente trabalho, estudamos os macacos-prego da espécie *Cebus nigrinus*, que vivem em áreas de Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil e são caracterizados pela pelagem de cor marrom bem escura e pela face branca, que contrasta com o resto do corpo (Rylands et al., 2005; Fragaszy et al., 2004).

3.3. Grupo estudado

O grupo que estudamos neste trabalho é denominado “Pimenta I” e está habituado à presença de observadores humanos, tendo sido registrado desde junho de 2001 e sistematicamente estudado desde fevereiro de 2003. O grupo é composto por 14 indivíduos (2 machos adultos [Benjamim e Ceni], 3 fêmeas adultas [Ruiva, Olívia e Elis], 7 juvenis e 2 infantes; Figura 7). São considerados jovens os indivíduos que não apresentaram interações sexuais.

Figura 7. Macho adulto, Ceni (Direita), em raro momento de brincadeira com dois jovens (Fotografia de Caio Moreira).

Apenas os machos adultos do grupo apresentam hierarquia de dominância (Izar, 2004; Izar, 2008). Benjamim e Ceni tiveram média de 0,02 interações agonísticas por hora de observação. Em todas essas interações, foi Ceni quem evitou o confronto físico deixando o local e evidenciando a dominância de Benjamim. Além disso, Benjamim (Figura 8) é maior do que Ceni e foi claramente preferido pelas fêmeas adultas: Olívia, Ruiva e Elis para a cópula (observação pessoal).

Figura 8. Macho alfa, Benjamin, deslocando-se entre as árvores da área de estudo (Fotografia de Caio Moreira).

Durante o início da coleta de dados (agosto a setembro de 2007) a fêmea adulta Ruiva estava no final do período de gravidez e, durante o final da coleta de dados (maio a julho de 2008), as fêmeas Olívia e Elis estavam no início do período de gravidez.

Há um histórico recente de trocas de fêmeas entre grupos no PECB, as quais tiveram fim possivelmente pelo nascimento, também recente, de filhotes (Izar et al., 2008). Nos períodos de escassez de alimento o grupo formado pelos sub-grupos Pimenta I e II adotava a estratégia de fissão-fusão, forrageando em subunidades dentro da área de uso (Izar, 2004; Nakai, 2007). Esta estratégia não foi observada ao longo deste estudo.

3.4. Coleta dos dados do ambiente

O planejamento inicial compreendia coletarmos os dados climáticos por meio de uma estação meteorológica (Campbell Scientific). No entanto, a seleção de uma frequência de coleta de dados maior do que a planejada resultou em uma rápida ocupação da memória e consequente perda de informação sobre alguns meses do período de estudo. Dessa forma, utilizamos os dados climáticos – pluviosidade, umidade e temperatura – fornecidos pela secretaria do PECB. Estes dados foram analisados junto aos parâmetros endócrino-comportamentais.

Como ocorre desde 2001, a oferta mensal de frutos maduros e de insetos na mata foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Izar (2004), utilizando coletores de frutos (bandejas de alumínio de 25,0x16,5cm) para frutos que caem das copas, e armadilhas *pitfall* (copos descartáveis de plástico preenchidos com água enterrados no solo) para insetos que caem na sua superfície. Ambos estão dispostos em 170 pontos sorteados ao longo de trilhas (1 m de distância lateral) dentro da área de uso do grupo estudado e são esvaziados para a quantificação da massa.

No presente estudo, esta metodologia não resultou em dados confiáveis. A primeira falha ocorreu devido à irregularidade no tempo em que esvaziávamos os coletores e as armadilhas. Coletas quinzenais provaram ser suficientes para a quantificação da massa de insetos e frutos (e.g. Taira, 2007 e Nakai, 2007). No entanto, este intervalo de tempo não foi obedecido em todos os meses ao longo deste estudo, passando de 30 dias em alguns dos meses iniciais.

Além disso, os dados, mesmo quando coletados quinzenalmente, algumas vezes não correspondiam ao que observávamos no campo. É muito incomum observar os macacos-prego do PECB não se alimentarem de frutos que estejam disponíveis. Alguns dados referentes à massa de frutos apresentaram valores altos quando o consumo de

frutos foi baixo, e vice-versa. Dessa forma, decidimos utilizar o consumo de frutos para indicar, também, sua disponibilidade.

3.5. Coleta dos dados comportamentais

Amostras de varredura (Altmann, 1974) – que correspondem a anotar o primeiro comportamento observado dos indivíduos que estão no seu campo de visão – foram realizadas uma vez a cada cinco minutos, com duração de um minuto por amostragem, entre agosto de 2007 e julho de 2008. Tentamos observar os animais ao longo de dias inteiros, durante todo o seu período de atividade: do momento em que acordavam até a hora em que paravam para dormir.

Cada amostra incluiu a identificação de todos os indivíduos observados, suas distâncias sociais e a atividade que cada um estava exibindo. As atividades foram anotadas como: deslocamento, descanso, forrageamento (Figura 9) e interações sociais.

Figura 9. Jovem forrageando o pecíolo da folha da juçara (Fotografia de Andréa Presotto).

Eventos relevantes para o estudo – como conflitos agonísticos, coalizões, catação, encontro de grupos, presença de migrantes, desaparecimento de indivíduos, fêmeas exibindo comportamento proceptivo e nascimento de filhotes – foram registrados utilizando-se o método “todas as ocorrências” (Altmann, 1974). Dessa forma, procuramos evitar que mudanças hormonais casuais fossem confundidas com

mudanças sazonais, assim como pudemos verificar se existe sazonalidade de estressores.

Sempre que possível, foram registrados os indivíduos que participaram destas ocorrências, e seu tempo de duração. Não foi observada predação durante o estudo. Entretanto, todas as ocorrências de chamados de alarme e de encontros do grupo Pimenta I com predadores em potencial foram anotadas.

A atividade sexual foi caracterizada pela frequência de seqüências copulatórias, frequência de corte, número de fêmeas demonstrando comportamentos proceptivos e a proporção de dias de observação com atividade sexual. O comportamento proceptivo das fêmeas de macacos-prego é caracterizado por atividades como elevação dos olhos, movimentos repetitivos, aproximações e retiradas freqüentes ao macho alvo, e a emissão de choros ou gritos (Janson, 1984; Phillips et al., 1994; Linn et al., 1995; Carosi et al., 1999). Carosi e colaboradores (1999) validaram a correlação entre a ciclicidade de tais comportamentos proceptivos e o ciclo ovariano. De acordo com o estudo, o ciclo de progesterona (21,9 dias) correspondeu ao ciclo de comportamentos proceptivos (21,3 dias) para fêmeas cativas de *Cebus apella*. Os resultados mostraram que cada período de comportamento proceptivo foi de $2,7 \pm 0,8$ dias, e que os níveis de progesterona na urina sempre se elevaram no último dia.

Diferentes eventos apresentam repercussões variadas na liberação de GCs pelo eixo HPA (Sapolsky, 1994). Não foi possível, a partir da metodologia utilizada no nosso estudo, quantificar padrões no aumento dos níveis de cortisol para cada evento registrado. No entanto, Romero (2009) propõe que eventos concomitantes, como uma tempestade durante a gravidez, fazem com que o animal tenha que aumentar sua carga alostática para manter a homeostase.

Nossa única alternativa para explorar, ao menos superficialmente, os dados coletados sobre *todas as ocorrências* foi dar-lhes o mesmo peso de acordo com o que consideramos serem eventos “positivos” (cuja ocorrência depende da escolha do indivíduo) e eventos “negativos” (cuja ocorrência independe da escolha do indivíduo). Subtraímos as ocorrências negativas das positivas e demos o nome de *Fator TDO* para esta somatória.

Consideramos também que cada categoria etária ou cada indivíduo é influenciado de forma diferente pelos eventos que ocorrem no grupo. Foram consideradas ocorrências positivas: *catação* para machos adultos; *catação* para fêmeas adultas; *catação* e *brincadeira* para jovens; e *catação*, *brincadeira* e *amamentação* para infantes.

As ocorrências negativas foram: *presença de predador*, *brigas* e *encontro entre grupos* para machos adultos e infantes; *presença de predador*, *brigas*, *encontro entre grupos*, *amamentação* e *carregar filhotes* para Ruiva; *presença de predador*, *brigas*, *encontro entre grupos* e *carregar filhotes* para Olívia; e *presença de predador*, *brigas* e *encontro entre grupos* para jovens.

O esforço de campo de todos os pesquisadores do nosso grupo de pesquisa juntos somou 1643 horas entre agosto de 2007 e julho de 2008. Destas, 706 horas foram acompanhando o grupo Pimenta I. No total foram coletados dados em 47 dias inteiros (Figura 10).

A diferença entre o esforço de campo total e as horas de observação do grupo tem alguns motivos. Primeiro, a grande área de uso do grupo, cerca de 700 hectares, faz com que encontrá-lo seja uma tarefa que ocupa, todo mês, cerca de dois a três dias completos. Além disso, a alta declividade do terreno faz com que nossa locomoção, em alguns momentos, não seja rápida o suficiente para acompanhar o grupo e, em períodos

de chuva (novembro a março), perder o grupo não é um evento esporádico como nos outros meses. Como pode ser observado na Figura 10, em janeiro de 2008 o grupo não foi encontrado, provavelmente por ter se deslocado para áreas distantes da área habitual.

Figura 10. Esforço de campo mensal (horas) total e com o grupo Pimenta. Acima das barras, o número de dias inteiros de coleta de cada mês.

3.6. Amostras fecais

No passado, os glucocorticóides eram quantificados principalmente via amostragem sanguínea (i.e. Sapolsky, 1983a, 1983b, 1985; Widmaier et al., 1994; Wingfield et al., 1994; Gregory e Schmid, 2001; Harlow et al., 1990; Hood et al., 1998; Mathies et al., 2001). Entretanto, a amostragem de cortisol pelo sangue contém algumas limitações, particularmente para animais de pequeno porte ou para animais em liberdade.

A técnica invasiva afeta rapidamente os níveis de hormônios circulantes pelo stress que provém do manejo dos animais. A contenção física e a amostragem sanguínea, por si próprias, conseguem alterar substancialmente os parâmetros fisiológicos e comportamentais investigados nos experimentos (von Holst, 1998; Romero, 2004; Hennessy e Levine, 1978). Uma desvantagem adicional da quantificação

de cortisol pelo plasma é que as amostras sanguíneas representam concentrações de apenas um único corte temporal. Uma vez que hormônios esteróides, especificamente os GCs, podem exibir mudanças episódicas regulares ao longo do tempo (i.e. variações circadianas e padrões de secreção pulsáteis), níveis hormonais representando uma fração de tempo muito reduzida podem gerar dados não confiáveis (Axelrod. e Reisine, 1984; von Holst, 1998; Sapolsky et al., 2000; Romero, 2004; Touma e Palme, 2005).

O ímpeto inicial para o desenvolvimento de métodos endócrinos não invasivos foi a análise de ciclos ovarianos (Millspaugh e Washburn, 2004). Atualmente, a quantificação de outros esteróides fecais tem sido muito útil para auxiliar a compreensão da endocrinologia comportamental de diversas espécies, principalmente as selvagens (Touma e Palme, 2005).

Amostras fecais podem ser coletadas facilmente e estão livres de retroalimentação, uma vez que não há necessidade de captura ou manuseamento dos animais. Além disso, amostragens repetidas do mesmo indivíduo são possíveis sem afetar seu comportamento ou seu *status* endócrino. Este método permite o monitoramento de mudanças de curto-prazo em reação a situações específicas – como encontros sociais ou tratamentos farmacológicos – assim como permite o acesso a variações diárias e o estabelecimento de perfis endócrinos de longo-prazo (Touma e Palme, 2005).

Adicionalmente, níveis circulantes dos hormônios nas fezes são integrados ao longo de determinados períodos. Dessa forma, mais do que a concentração atual do esteróide, metabólitos de hormônios nas fezes refletem a taxa de produção, que é a secreção acumulativa e a eliminação dos hormônios, dentro de várias horas (Palme et al., 2005; Goymann, 2005). Conseqüentemente, dependendo da pergunta da pesquisa, a concentração de metabólitos de esteróides nas fezes pode representar o *status* hormonal

de um animal de forma mais acurada do que uma simples amostragem sanguínea. A quantificação não específica para picos de curto-prazo na secreção hormonal, no entanto, podem ser uma desvantagem deste método (Touma e Palme, 2005).

As concentrações de metabólitos fecais de GCs refletem concentrações de cortisol na circulação em estado livre, ou seja, não ligado à globulina ligante a corticosteróides (CBG) - proteína que se liga especificamente aos GCs da circulação (Robinson et al, 1985; Yamamoto et al, 1977). Primatas do Novo Mundo, incluindo *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus* e *Saguinus Oedipus*, apresentam pouca ou nenhuma CBG circulante. Portanto o cortisol circula desligado de proteínas ligantes circulantes ou apenas liga-se fracamente à albumina (Klosterman et al., 1986; Pugeat et al., 1984; Robinson et al., 1985).

A aparente resistência a níveis basais extremamente altos de cortisol livre em primatas do Novo Mundo não é devida à fraca afinidade dos receptores de glucocorticóides (GR) a estes hormônios (Scammell et al., 2001). Ao invés, há uma expressão excessiva de uma proteína citosólica ligante a GCs, FK-506 imunofilina ligante (FK BP51; Reynolds et al., 1999), que inibe especificamente a ligação de GCs aos GRs (Denny et al., 2000; Scammell et al., 2001) e auxilia a ausência de patologias causadas pelo excesso de cortisol. O grau de ativação do eixo HPA em primatas do Novo Mundo, entretanto, parece similar àquele encontrado em primatas do Velho Mundo. Primatas do Novo Mundo, por exemplo, são utilizados como modelos para o estudo do eixo HPA, do stress e de psicopatologias humanas (e.g. Cilia e Piper, 1997; Johnson et al., 1996; Abbott et al., 2003).

Em geral, hormônios esteróides circulantes são metabolizados pelo fígado e secretados como conjugados pela urina ou pelas fezes (Taylor, 1971; Whitten et al., 1998; Möstl e Palme, 2002). Embora os esteróides estejam sujeitos a uma circulação

enterohepática (i.e. reabsorção para a corrente sanguínea) em partes do intestino e sejam intensivamente metabolizados pela flora microbiana, a estrutura esquelética de esterano não é degradada (Taylor, 1971; Lindner, 1972 – Figura 11).

Figura 11. Esquema da secreção, metabolismo e excreção do cortisol (Modificado de Möstl e Palme, 2002).

Sendo assim, metabólitos esteróides específicos podem ser detectados nas fezes de mamíferos e nas excreções das aves (Millspaugh e Washburn, 2004; Touma e Palme, 2005). Quando um intervalo entre os eventos hormonais no plasma e o aspecto do respectivo sinal nas fezes é considerado, um padrão similar àqueles achados no plasma é refletido nas fezes (Touma e Palme, 2005).

Apesar das vantagens da técnica, a quantificação de hormônios pelas fezes apresenta algumas desvantagens. Em uma revisão, Millspaugh e Washburn (2004) levantaram os maiores problemas da quantificação de GCs por meio de metabólitos presentes nas fezes ou na urina. Segundo os autores, as medidas podem ser afetadas por questões relativas à amostragem ou por artefatos dos ensaios como: o horário do dia que a amostra foi obtida (Touma et al., 2003), a idade da amostra (Washburn e Millspaugh,

2002) e as técnicas de curto e de longo prazo de armazenagem das amostras (Khan et al., 2002; Lynch et al., 2003; Millspaugh et al., 2003; Terio et al., 2002).

Segundo os autores, é esperado que ocorram variações circadianas entre amostras coletadas em diferentes períodos do dia (Millspaugh e Washburn, 2004). No nosso estudo, este problema foi minimizado por meio do registro do horário de coleta – que coincide com o horário de defecação – de todas as amostras coletadas.

Existiu, no entanto, um problema referente ao número de amostras de cada período do dia entre os diferentes meses. Nem todas as categorias, e principalmente nem todos os indivíduos, tiveram o mesmo número de amostras por período do dia em todos os meses. Dessa forma, as médias mensais sofreram interferências referentes ao número de amostras que cada período continha. Por exemplo, uma vez que encontramos níveis maiores de MC durante as primeiras horas do dia, meses com mais amostras entre as 6 e 10 horas da manhã podiam ter médias mais elevadas.

Por outro lado, se utilizássemos as médias de cada período para calcular a média mensal, alguns indivíduos teriam médias de um período calculadas por apenas uma amostra ou mesmo, para alguns indivíduos, não haveria amostras para todos os períodos do mês. Desta forma, decidimos que o cálculo da média mensal utilizando todas as amostras, independentemente do período do dia, pode representar melhor os níveis de MCs de cada animal ou categoria.

Em relação à idade das amostras, Washburn e Millspaugh (2002) sugerem que micróbios presentes nas amostras podem, com o passar do tempo, metabolizar os GCs fecais transformando-os em compostos com maior afinidade aos anti-corpos dos ensaios, o que resultaria em medidas mais elevadas dos MC. Estes fatores podem estar sujeitos a condições físicas do ambiente, como temperatura e umidade (Touma e Palme,

2005). Para diminuir este efeito, buscamos realizar a extração dos hormônios em períodos semelhantes para cada grupo de amostras.

Não houve, no entanto, exatidão neste processo. As amostras foram enviadas para Natal/RN em três viagens – as amostras de agosto a setembro de 2007 foram transportadas no dia 25/05/2008, as amostras de outubro e dezembro de 2007 foram transportadas no dia 05/08/2008 e as amostras de fevereiro a julho de 2008 foram transportadas no dia 28/04/2009 – e o processo de extração não ocorreu em intervalos regulares para as amostras dos diferentes meses. Por outro lado, utilizamos o resfriamento sem tratamento químico como técnica de armazenagem das nossas amostras, tanto para curto como para longo prazo, justamente o método recomendado por Washburn e Millspaugh (2004).

Metabólitos de cortisol podem não estar distribuídos homogeneamente por toda a amostra (Wasser et al, 1996). Para evitar medidas não representativas, homogeneizamos as amostras antes da extração. Entretanto, Washburn e Millspaugh (2004) mostram que amostras de pequena massa (menores do que 0,02g) podem resultar em medidas mais elevadas das concentrações de MCs. Nem todas as nossas amostras apresentavam massas semelhantes, mas mesmo as menores amostras não tinham massa tão pequena.

Uma vez que vários estudos têm mostrado que ensaios diferentes resultam em concentrações diferentes de metabólitos hormonais, assim como são diferentes as concentrações destes metabólitos quando analisamos as fezes ou a urina, (i.e. Millspaugh e Washburn, 2004, Touma e Palme, 2005), não comparamos os valores absolutos encontrados no nosso estudo com os encontrados em outros trabalhos, mesmo os que estudaram a mesma espécie.

Uma série de problemas relacionados a fatores biológicos também pode dificultar a interpretação dos dados provindos de amostras fecais ou de urina. O período do tempo de cativeiro (Marra et al., 1995), mudanças sazonais normais (Dawson and Howe, 1983; Raminelli et al., 2001; Wingfield, 1994), *status* reprodutivo (Whittier et al., 1997; Wingfield et al., 1994), sexo (Touma et al., 2003), condição corpórea (Heath and Dufty, 1998; Smith et al., 1994) e a dieta são os principais fatores levantados por Millspaugh e Washburn (2004).

Nós coletamos amostras fecais dos macacos-prego do grupo Pimenta I durante um período relativamente longo (um ano) e registramos o *status* reprodutivo, a hierarquia, o sexo e a categoria etária dos indivíduos justamente para estabelecer o padrão de variação sazonal normal das diferentes categorias de sexo e idade. Este procedimento resolve ou minimiza parte dos problemas relacionados aos fatores biológicos que poderiam afetar a interpretação dos dados.

Entretanto, não tivemos acesso à condição corpórea dos animais (i.e. se eles tinham doenças causadas por fatores ambientais, como parasitas, ou se apresentavam doenças genéticas). Também não sabemos como, ou se, diferentes dietas (i.e. folhas mais fibrosas *versus* frutos mais gordurosos) podem refletir em diferentes tempos de processamento pelo trato digestivo dos animais, resultando em diferentes concentrações dos MCs excretados. Em humanos, uma dieta mais fibrosa pode diminuir o trânsito no trato digestivo e aumentar as concentrações de estrogênio fecal (Goldin et al., 1981, 1982).

Os problemas de amostragem levantados foram considerados na discussão dos resultados deste trabalho. Uma melhor validação dos dados coletados poderia ser realizada caso houvesse uma validação fisiológica das técnicas empregadas para a espécie estudada. Este procedimento corresponde a uma indução farmacológica de

mudanças fisiológicas dos níveis de GCs do sangue e a verificação subsequente de como essas mudanças são refletidas nas concentrações dos metabólitos de GC fecais. Infelizmente, a validação dos procedimentos de quantificação dos metabólitos aqui utilizados ainda não havia sido realizada para *Cebus nigrinus*.

A doutoranda Olívia de Mendonça do nosso laboratório, no entanto, realizou os experimentos de validação das técnicas de dosagem aqui empregadas em *Cebus apella*, o que pode auxiliar as pesquisas realizadas em *Cebus*, inclusive a interpretação futura dos resultados obtidos aqui.

Para análise do ciclo ovariano, tanto em cativeiro como em populações selvagens, amostragens diárias ou quase diárias são ideais, enquanto três amostras por semana permitem informação suficiente para determinar se existe desenvolvimento folicular ou formação de corpo lúteo para algumas espécies (Millspaugh e Washburn, 2004). Segundo Whitten e Russel (1996) uma amostragem diária é necessária para a determinação do período da ovulação.

No nosso estudo, amostras fecais frescas foram coletadas em tubos de 15 mL e mantidas em isopor com gelo até serem armazenadas, dentro de 10-12 horas da coleta, a -20°C. Os tubos permaneceram em baixa temperatura até o final do transporte ao Laboratório de Endocrinologia Comportamental da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram analisadas seguindo o protocolo de Sousa e Ziegler (1998).

Uma vez que tentamos traçar o perfil hormonal de cada indivíduo e de jovens e infantes da população estudada, foram coletadas apenas amostras fecais frescas e cujo indivíduo que as fez foi identificado. Além disso, os horários da coleta foram registrados para que as variações circadianas fossem consideradas.

3.7. Extração e dosagem dos hormônios

3.7.1 - Determinação dos esteróides nas fezes

Para determinação dos esteróides fecais pelo método imunoenzimático (ELISA) foram coletadas amostras de fezes, as quais foram submetidas previamente a um processo de extração constituído de duas etapas, hidrólise e solvólise, conforme descrição a seguir.

3.7.2 - Pesagem das amostras

As amostras de fezes foram retiradas do freezer e colocadas à temperatura ambiente por um período de aproximadamente 10 minutos para descongelamento. A seguir, com o auxílio de uma espátula, cada amostra fecal foi homogeneizada e utilizando-se uma balança de precisão foi pesada uma alíquota de 0,1g de fezes que foi transferida para um tubo plástico de 15mL, devidamente identificado.

3.7.3 - Hidrólise

Após a pesagem as amostras foram submetidas ao processo de hidrólise para separação dos esteróides existentes nas fezes. Nesta fase da extração são separados os esteróides livres e os encontrados na forma de conjugação simples com o ácido glicurônico e sulfatos. Os esteróides de conjugação simples são solúveis em água e foram extraídos da amostra por um processo de hidrólise conforme passos a seguir discriminados.

- a) Foi adicionado ao tubo contendo a amostra de fezes (0,1g), 1,25mL de etanol e 1,25mL de água destilada, a seguir o material foi agitado por 5 minutos no vortex.
- b) Após agitação, foi realizada uma centrifugação durante 10 minutos utilizando-se uma rotação de 3000rpm; o sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro de 7mL.

- c) As amostras assim tratadas foram encaminhadas imediatamente para o processo de solvólise ou foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior execução da segunda fase da extração (solvólise).

3.7.4 – Solvólise

Ziegler e colaboradores (1996) demonstraram que a solvólise é essencial para a quantificação de esteróides em duas espécies de calitriquídeos (*Saguinus oedipus* e *Callithrix jacchus*). Cerca de 80% dos estrógenos eram quantificados apenas quando os esteróides eram separados dos conjugados por solvólise. Uma vez que utilizamos a adaptação do protocolo experimental desenvolvido de trabalho de Ziegler e colaboradores (1996), a solvólise foi realizada em todas as nossas amostras.

Os esteróides excretados nas fezes na forma de glicuronídeos e sulfatos de dupla conjugação somente são extraídos pela solvólise ácida. Com esta finalidade o material proveniente da hidrólise foi tratado conforme descrição abaixo:

- a) As amostras hidrolisadas recém obtidas ou após descongelamento (10min à temperatura ambiente) foram homogeneizadas por 10 segundos, sendo a seguir transferidos 500 μL de cada amostra para tubos de extração (pirex/15ml).
- b) Foram adicionados aos tubos de extração contendo as amostras 100 μL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), 50 μL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e 4 mL de acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$).
- c) Os tubos foram fechados com tampas de roscas esmerilhadas e incubados em banho-maria à 40°C durante toda à noite.
- d) Na manhã seguinte os tubos foram retirados do banho-maria e foram adicionados mais 4 mL de acetato de etila a cada tubo;
- e) Os tubos foram agitados no vortex por 5 minutos e em seguida centrifugados durante 3 minutos;
- f) Os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram transferidos com o auxílio de pipetas de Pasteur para novos tubos de extração aos quais foram adicionados 2,5 mL de água destilada;

- g) Os tubos foram fechados, agitados por 5 minutos e mais uma vez centrifugados a 1000 rpm por 3 minutos;
- h) A fase superior do material centrifugado foi separada com uma pipeta de Pasteur e transferida para tubos de ensaio (12 x 75 mm), os quais foram colocados em banho-maria, a 40°C contendo fluxo de ar, para secagem das amostras;
- i) Após desidratação total do material, o volume inicial da amostra foi recomposto adicionando-se 500 µL de etanol (C₃H₇OH); e acondicionado em freezer à -20°C até o momento das análises.

3.7.5 - Ensaio imunoenzimático nas fezes

Após a extração dos esteróides fecais foi utilizada a técnica imunoenzimática (ELISA) para determinação da concentração dos hormônios. A metodologia empregada seguiu o protocolo experimental desenvolvido por Munro & Stabenfeldt (1984) para dosagens de esteróides no sangue e posteriormente adaptada por Ziegler et al, (1996) para determinações de esteróides nas fezes. Esta metodologia já foi anteriormente validada no Laboratório de Medidas Hormonais da UFRN, sendo utilizada rotineiramente em pesquisas nessa área. Os dados da padronização analítica demonstram a existência de paralelismo ($p < 0,05$) para todos os hormônios dosados (progesterona, andrógenos e cortisol). O pool utilizado nos testes de validação foi obtido a partir de amostras de fezes de fêmeas ou de machos em diferentes condições reprodutivas. As curvas padrão dos diferentes hormônios analisados foram preparadas a partir cristais de hormônios obtidos da Sigma Chemical CoTM. Para a preparação da curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações dos padrões, que incluíram aquelas provavelmente existentes nas amostras.

As determinações dos hormônios (progesterona, andrógenos e cortisol) pelo ELISA apresentam pequenas variações metodológicas e por esse motivo optamos por

fazer uma descrição única dos procedimentos técnicos, destacando-se as modificações para cada analítico:

As placas para microtitulação de fundo plano (Nunc) para realização do ELISA foram previamente sensibilizadas com o anticorpo específico de cada hormônio (Anticortisol policlonal R4866, Antitestosterona policlonal R156/7 e Antiprogesterona policlonal CL425). A enzima conjugada ao antígeno utilizada foi horseradish Peroxidase (HRP). Todo o procedimento ocorreu segundo a metodologia descrita por Munro e Stabenfeldt (1984) e Munro e Lasley (1988).

Após a retirada das amostras do refrigerador e agitação no vórtex por 5 minutos, ocorreu a transferência (50 µL – progesterona; 100 µL - cortisol ou 50µL – andrógeno) deste material para um tubo de ensaio a fim de proceder a análise conforme os seguintes passos:

- a) Os tubos de ensaio contendo as alíquotas da amostra foram transferidos para um banho-maria com fluxo de ar, a 40°C, para secagem total do volume inicial.
- b) A seguir foram adicionados aos resíduos 300 µL de uma solução preparada com a enzima e o respectivo hormônio, diluídas com tampão monofosfato nas seguintes concentrações: (progesterona - 1:20K; cortisol – 1:16K; e andrógeno – 1:20).
- c) Os tubos foram agitados e seus conteúdos transportados para tubos de plásticos menores (1,6mL).
- d) Utilizando-se uma pipeta multi-canal (T-12; Eppendorf), foram pipetados 100 µL desse material para as placas (Nunc) que contiverem o anticorpo específico para cada hormônio. Foram preenchidas todas as cavidades das placas com exceção das denominadas A1 a D1, C2 e C11 e de C3 a C10 para os quais foram pipetadas respectivamente, apenas solução tampão (NSB), o tampão contendo a enzima (BO) e as soluções padrão segundo as diluições já referidas.
- e) A seguir as placas foram cobertas com filme adesivo e incubadas durante 40 minutos em câmara de umidade.

- f) Após este tempo, as placas foram retiradas da câmara e lavadas com uma solução de NaCl a 1,5M e Tween 20 a 0,5%.
- g) Após este procedimento, foi adicionado a cada cavidade da placa 100µL do substrato, constituído de uma solução preparada a partir de 25mL de tampão citrato a 10% (ácido cítrico anidro $C_6H_8O_7$ – SIGMA), 250 µL de ABTS (2,2-azino-bis 3 ethylbenthiazone-6-sulfonic acid / SIGMA) e 80 µL de peróxido de hidrogênio a 15% (H_2O_2).
- h) As placas foram incubadas por mais 40 minutos em câmara úmida e em seguida foram adicionados 100 µL de uma solução ácida para interromper a reação. Esta solução foi preparada a partir de 5,048 mL de ácido fluorídrico e 1,2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 5N qsp 500mL de água destilada.
- i) A leitura da densidade foi feita utilizando-se um espectrofotômetro MR 5000, Dynatech com filtro de 410 nm.

3.8. Análise dos dados

As médias das concentrações dos MC, MA ou MP foram analisadas entre as categorias etárias (machos adultos, fêmeas adultas, jovens e infantes), indivíduos, sexo, períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h), período reprodutivo e entre os meses do período analisado (agosto de 2007 e julho de 2008) através do programa SPSS 13.0 para Windows.

Para os imaturos (jovens e infantes) do grupo, não foi possível identificar o indivíduo ou mesmo o sexo. Portanto, os dados de imaturos foram sempre agrupados para a categoria, mesmo na comparação entre os indivíduos.

As médias foram calculadas e comparadas utilizando ANOVA. Esta análise foi utilizada mesmo quando testamos apenas dois grupos, já que, de acordo com estudos estatísticos recentes, os resultados da ANOVA e do Teste *t* são iguais (como explicado no site: <http://www.socialresearchmethods.net/kb/statsimp.php>). Testes *post-hoc* de Bonferroni foram realizados para resultados significativos ($p < 0,05$) de amostras com mais de duas variáveis independentes.

Foram realizados testes de homogeneidade das variáveis em todas as análises. Quando a distribuição dos dados não era homogênea, foram realizadas as análises não paramétricas Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para comparações entre dados com duas ou três amostras independentes, respectivamente. Análises Mann-Whitney entre as variáveis testadas com Kruskal-Wallis nos mostraram quais variáveis eram responsáveis pelas diferenças encontradas.

As correlações entre as médias mensais das concentrações de MC, de MA e de MP foram calculadas através do coeficiente de correlação de Pearson. Também foram calculadas correlações entre as médias mensais destes hormônios e as médias mensais das atividades do orçamento de atividades, do consumo dos itens alimentares, do clima e das ocorrências, para todos os indivíduos e categorias etárias e de sexo.

Na análise dos hormônios, os coeficientes de variação intra-ensaio foram de $1,61 \pm 0,19\%$ a $3,47 \pm 2,47\%$ para MC, $2,61 \pm 0,13\%$ a $7,53 \pm 1,53\%$ para MA e $1,61 \pm 0,19\%$ a $3,47 \pm 0,69\%$ para MP. Os coeficientes de variação inter-ensaios foram de $6,6 \pm 5,19\%$ a $10,84 \pm 0,72\%$ para MC, $3,95 \pm 2,56\%$ a $13,26 \pm 1,59\%$ para MA e $0,73 \pm 0,71\%$ a $8,90 \pm 1,67\%$ para MP. Estes coeficientes medem a variação da dosagem dos metabólitos nos diferentes ensaios realizados. Coeficientes com até 12 a 15% de variação, como os encontrados neste estudo, são representativos de bons ensaios.

4 – RESULTADOS

Foram coletadas 228 amostras fecais ao longo deste estudo. As informações de cada amostra, separadas segundo o indivíduo, a data e o horário, estão no *Anexo A* deste trabalho. Uma vez que os perfis hormonais dos indivíduos adultos foram diferentes, ainda que pertencendo à mesma categoria etária e de sexo, apresentamos os resultados de cada indivíduo em todas as análises.

4.1. Comparação das concentrações dos hormônios entre as categorias etárias e entre os indivíduos

As fêmeas adultas apresentaram concentrações de MC e MP maiores do que as encontradas nas fezes de jovens e infantes (Figura 12; $F = 11,348$, $p < 0,001$, $df = 152$ e $F = 12,863$, $p < 0,001$, $df = 122$, respectivamente).

Figura 12. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MP das categorias etárias: Fêmeas adultas e jovens e infantes (* $p < 0,05$).

O mesmo aconteceu em relação às concentrações de MC e MA de machos adultos, que também foram maiores do que as concentrações encontradas nas fezes de jovens e infantes (Figura 13; $F = 5,679$, $p < 0,05$, $df = 165$ e $F = 47,122$, $p < 0,001$, $df = 146$, respectivamente).

Figura 13. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MA das categorias etárias: machos adultos e jovens e infantes (* $p < 0,05$).

Na comparação das concentrações dos hormônios entre os indivíduos do sexo feminino, a fêmea Ruiva apresentou diferenças significativas em relação a todos os indivíduos quando comparados os MC (Figura 14; $F = 11,348$, $p < 0,005$, $df = 144$). Em relação aos MP, a diferença ocorreu entre Ruiva e jovens e infantes e Olívia e jovens e infantes (Figura 14; $H = 14,700$, $p < 0,002$, $df = 122$ – $Z_{(ruiva/olívia)} = -0,385$, $p > 0,05$, $Z_{(ruiva/jovens)} = -2,857$, $p < 0,005$, $Z_{(olívia/jovens)} = -2,229$, $p < 0,05$).

Figura 14. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MP das fêmeas adultas, Ruiva e Olívia, e dos jovens (* $p < 0,05$).

A diferença dos MC entre Ruiva e Olívia é mantida mesmo quando não consideramos o mês de agosto ($Z_{(ruiva/olívia)} = -2,144$, $p < 0,05$, $df = 50$), no qual Ruiva apresenta os pontos mais elevados do grupo.

Em relação aos machos adultos, a comparação de MC entre indivíduos mostrou diferenças significativas entre Benjamin e os demais indivíduos (Figura 15; $F = 2,194$, $p < 0,05$, $df = 163$). A comparação dos MA revelou que o macho dominante, Benjamin, apresentava níveis significativamente maiores do todos os outros, enquanto Ceni tem concentrações de MA maiores do que a dos jovens (Figura 15; $H = 11,706$, $p < 0,001$, $df = 144$ - $Z_{(benjamim/jovens)} = -9,605$, $p < 0,001$; $Z_{(benjamim/ceni)} = -3,437$, $p < 0,005$; $Z_{(ceni/jovens)} = -4,843$, $p < 0,001$).

Figura 15. Médias e erros padrões das concentrações de MC e MA dos machos adultos, Benjamin e Ceni, e dos jovens (* $p < 0,05$).

4.2. Concentrações dos hormônios entre os períodos do dia

Não houve variação circadiana dos MA e dos MP quantificados nas fezes tanto de machos quanto de fêmeas de todas as categorias etárias ($F = 1,076$, $p > 0,05$, $df = 71$).

para machos adultos; $F = 0,760$, $p > 0,05$, $df = 71$ para machos jovens e infantes; $F = 1,803$, $p > 0,05$, $df = 56$ para fêmeas adultas; e $F = 0,470$, $p > 0,05$, $df = 52$ para jovens e infantes).

Houve variação circadiana dos MC quantificados nas fezes de machos adultos, fêmeas adultas e jovens e infantes (Figura 16; $H = 6,801$, $p > 0,05$, $df = 71$ para machos adultos; $F = 4,254$, $p > 0,05$, $df = 56$ para fêmeas adultas e $F = 4,571$, $p > 0,05$, $df = 91$ para jovens e infantes).

Figura 16. Médias e erros padrões das concentrações de MC nos três períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h) das categorias etárias: machos adultos, fêmeas adultas e jovens e infantes (* $p < 0,05$).

Quando analisamos os MC totais de Benjamim, não houve variação circadiana ($F = 2,606$, $p > 0,05$, $df = 57$). A variação volta a aparecer apenas quando tiramos os dados referentes aos meses de abril e maio, nos quais a variação de cortisol pode estar associada ao período de acasalamento (Figura 17; $F = 7,091$, $p < 0,005$, $df = 43$). Nestes meses, Benjamim não apresenta variação circadiana do glucocorticóide ($F = 1,759$, $p > 0,05$, $df = 14$). Ceni não apresentou variação circadiana significativa (Figura 17; $F = 1,550$, $p > 0,05$, $df = 11$). Já os jovens apresentaram variação significativa (Figura 17; $F = 4,608$, $p < 0,05$, $df = 83$).

Variação Circadiana

Figura 17. Médias e erros padrões das concentrações de MC nos três períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h) dos indivíduos: Benjamin, Ceni e dos jovens (* $p < 0,05$).

Ambas as fêmeas adultas apresentaram variação circadiana das concentrações dos MC nas fezes (Figura 18; $H = 8,800$, $p < 0,05$, $df = 34 - Z_{(6-10/14-18h)} = -2,517$, $p < 0,05$, para Ruiva e $F = 4,356$, $p < 0,05$, $df = 17$, para Olívia). Os jovens também apresentaram tal variação (Figura 18; $F = 4,608$, $p < 0,05$, $df = 83$).

Variação Circadiana

Figura 18. Médias e erros padrões das concentrações de MC nos três períodos do dia (6-10h, 10-14h e 14-18h) dos indivíduos: Ruiva, Olívia e dos jovens (* $p < 0,05$).

4.3. Concentrações mensais dos hormônios

O desvio padrão e o número de amostras utilizado para o cálculo das médias mensais não foram apresentados nos gráficos deste item para facilitar a visualização dos resultados. O número de amostras pode ser obtido no *Anexo A* deste trabalho, e os desvios padrões foram utilizados para gerar os modelos gráficos do item 5.10, e podem ser observados nas Figuras 41 a 47.

Nomeamos *picos* hormonais, aumentos significativos da média da concentração dos metabólitos em um determinado mês.

As concentrações de MC e MA de machos adultos variaram significativamente entre os meses devido aos picos ocorridos em abril (Figura 19; $F = 5,093$, $p < 0,001$, $df = 65$; $F = 3,911$, $p < 0,005$, $df = 65$, respectivamente).

Figura 19. Médias das concentrações mensais de MC e MA de machos adultos (* $p < 0,05$).

As concentrações de MC e MA de Benjamim variaram significativamente entre os meses devido aos picos ocorridos em abril (Figura 20; $F = 4,807$, $p < 0,001$, $df = 50$; $F = 3,175$, $p < 0,005$, $df = 50$, respectivamente).

Figura 20. Médias das concentrações mensais de MC e MA de Benjamim (* $p < 0,05$).

As concentrações de MC e MA de Ceni variaram significativamente entre os meses devido aos picos ocorridos em maio (Figura 21; $F = 6,958$, $p < 0,05$, $df = 7$; $F = 6,608$, $p < 0,05$, $df = 6$, respectivamente).

Figura 21. Médias das concentrações mensais de MC e MA de Ceni (* $p < 0,05$).

As concentrações de MC de jovens e infantes variaram significativamente entre os meses devido ao pico ocorrido em maio (Figura 22; $F = 2,714$, $p < 0,005$, $df = 84$). As concentrações de MA de jovens e infantes não variaram significativamente entre os meses ($F = 1,037$, $p > 0,05$, $df = 64$, respectivamente)

Figura 22. Médias das concentrações mensais de MC e MA de jovens e infantes (# $p < 0,05$ para MC).

As concentrações de MC e MP de fêmeas adultas variaram significativamente entre os meses devido aos picos ocorridos em agosto (Figura 23; $F = 4,345$, $p < 0,001$, $df = 50$; $F = 3,893$, $p < 0,005$, $df = 50$, respectivamente).

Figura 23. Médias das concentrações mensais de MC e MP de fêmeas adultas (* $p < 0,05$).

As concentrações de MC e MP de Ruiva variaram significativamente entre os meses devido aos picos ocorridos em agosto (Figura 24; $F = 6,121$, $p < 0,001$, $df = 27$; $F = 3,512$, $p < 0,005$, $df = 27$, respectivamente).

Figura 24. Médias das concentrações mensais de MC e MP de Ruiva (* $p < 0,05$).

As concentrações mensais de MC e MP de Olívia não variaram significativamente (Figura 25; $F = 0,243$, $p > 0,05$, $df = 12$; $F = 1,358$, $p > 0,05$, $df = 12$, respectivamente).

Figura 25. Médias das concentrações mensais de MC e MP de Olívia (* $p < 0,05$).

As concentrações de MC de jovens e infantes variaram significativamente entre os meses devido ao pico ocorrido em maio (Figura 26; $F = 2,714$, $p < 0,005$, $df = 84$). As concentrações de MP de jovens e infantes não variaram significativamente entre os meses (Figura 26; $F = 1,366$, $p > 0,05$, $df = 52$, respectivamente).

Figura 26. Médias das concentrações mensais de metabólitos de cortisol e MP de jovens e infantes (# $p < 0,05$ apenas para MC).

4.4. Médias hormonais durante diferentes períodos da reprodução

Como pode ser visto na Tabela 2, as concentrações de MC durante o período de procriação foram maiores em machos adultos em comparação com o período fora da estação de procriação ($F = 22,191$, $p < 0,001$, $df = 58$; $F = 1,358$, $p > 0,05$, $df = 12$, para Benjamim e Ceni, respectivamente). Nas fêmeas adultas, Ruiva e Olívia, tal variação não ocorreu ($F = 0,357$, $p > 0,05$, $df = 35$; $F = 0,013$, $p > 0,05$, $df = 18$, respectivamente).

Tabela 2. Médias de MC ($\pm$ erro padrão) dos indivíduos adultos dentro e fora do período de procriação (* $p < 0,05$)

Sexo	Indivíduo	Média de Metabólitos de Cortisol ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	
		Fora da Procriação	Procriação
Macho	Benjamim	$0,96 \pm 0,10$	$2,48 \pm 0,44^*$
	Ceni	$0,75 \pm 0,13$	$2,09 \pm 1,12^*$
Fêmea	Ruiva	$2,76 \pm 0,73$	$2,02 \pm 0,44$
	Olívia	$0,81 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0,19$

As médias das concentrações de MC dentro e fora do período de gravidez foram significativamente diferentes apenas para Ruiva (Tabela 3; $F = 31,217$, $p < 0,001$, $df = 35$). Os MC de Olívia não variaram significativamente entre os dois períodos (Tabela 3; $F = 0,158$, $p > 0,05$, $df = 18$).

Tabela 3. Médias de Hormônios Cortisol ($\pm$ erro padrão) das fêmeas adultas dentro e fora do período de gravidez (* $p < 0,05$)

Indivíduo	Média de metabólitos de cortisol ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	
	Sem Gravidez	Durante a gravidez
Ruiva	1,48 $\pm$ 0,21	7,20 $\pm$ 2,00*
Olívia	0,79 $\pm$ 0,10	0,88 $\pm$ 0,12

Como podemos observar na Tabela 3, as concentrações de MA durante o período de procriação foram maiores em machos adultos em comparação com o período fora da estação de procriação ($F = 7,113$, $p < 0,05$, $df = 57$; $F = 7,678$, $p > 0,05$, $df = 11$, para Benjamim e Ceni, respectivamente). Em fêmeas adultas, a variação de MP ocorreu para Olívia ($F = 4,101$, $p > 0,05$, $df = 17$), mas não para Ruiva ($F = 1,115$, $p > 0,05$, $df = 34$).

Tabela 4. Médias de Hormônios Sexuais ($\pm$ erro padrão) dos indivíduos adultos dentro e fora do período de procriação (* $p < 0,05$)

Sexo	Indivíduo	Média de metabólitos de andrógenos ou de progesterona ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	
		Fora da Procriação	Procriação
Macho	Benjamim	4,89 $\pm$ 0,54	12,03 $\pm$ 2,92*
	Ceni	1,72 $\pm$ 0,55	7,56 $\pm$ 3,03*
Fêmea	Ruiva	1,03 $\pm$ 0,22	0,70 $\pm$ 0,33
	Olívia	0,48 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,19*

Em machos, ao adicionarmos uma terceira divisão temporal (Período de Procriação, Período Fora da Procriação e *Período logo após o nascimento*) tanto para MC quanto para MA, verificamos que no Período de Procriação os níveis dos dois hormônios são significativamente maiores do que nos outros dois períodos, que não apresentam diferenças significativas entre si ($F = 14,732$, $p < 0,001$, $df = 71$).

Para fêmeas, não houve diferença significativa ao compararmos os três períodos quando as duas fêmeas adultas foram analisadas como uma única categoria ($F = 1,368$, $p > 0,05$, $df = 54$), ou como indivíduos separados ($F = 1,115$, $p > 0,05$, $df = 34$, para Ruiva e $H = 4,344$, $p > 0,05$, $df = 17$, para Olívia).

As médias das concentrações de MC dentro e fora do período de gravidez foram significativamente diferentes apenas para Ruiva (Tabela 5; $F = 24,702$, $p < 0,001$, $df = 35$). Os MC de Olívia não variaram significativamente entre os dois períodos (Tabela 5; $F = 0,546$, $p > 0,05$, $df = 18$).

Tabela 5. Médias de Hormônios Cortisol ($\pm$ erro padrão) das fêmeas adultas dentro e fora do período de gravidez (* $p < 0,05$)

Indivíduo	Média de metabólitos de progesterona ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	
	Sem Gravidez	Durante a gravidez
Ruiva	0,55 $\pm$ 0,14	2,25 $\pm$ 0,34*
Olívia	0,53 $\pm$ 0,19	0,76 $\pm$ 0,18

4.5. Correlações entre as concentrações dos hormônios

Houve correlação significativa entre metabólitos de cortisol e MA tanto para Benjamim quanto para Ceni ($r = 0,930$ e $0,958$, respectivamente, $p < 0,005$). Correlação significativa também foi encontrada entre os MC e os MP de Ruiva ($r = 0,828$, $p < 0,005$). Os MC e MP de Olívia não apresentaram tal correlação ($r = 0,173$, $p > 0,05$). MC e MA de jovens e infantes não apresentaram correlação significativa ($r = 0,597$, $p >$

0,05), no entanto os MC e os MP se correlacionaram nesta categoria ($r = 0,680$, $p < 0,05$).

Os hormônios de jovens e infantes se correlacionaram com os hormônios de Ceni ($r = 0,921$ para metabólitos de cortisol e $r = 0,833$ para MA, $p < 0,05$), enquanto os hormônios de Benjamim não se correlacionaram com os outros dois grupos. As médias mensais de MP de Olívia e dos jovens e infantes apresentaram correlação ($r = 0,736$, $p < 0,05$). Os hormônios de Ruiva não se correlacionaram com os hormônios de Olívia ou de jovens e infantes.

4.6. Correlações entre as médias mensais de metabólitos de cortisol, do orçamento de atividades e dos itens alimentares consumidos

Embora tenham ocorrido variações significativas dos MC entre os meses para todas as faixas etárias, elas ocorreram em momentos diferentes para cada categoria. Machos adultos (como categoria) tiveram o pico de MC em abril, fêmeas adultas em agosto e jovens e infantes em maio (Figura 27A). Não houve correlação da variação desses metabólitos com o orçamento de atividades e consumo de itens alimentares de todo o grupo.

Figura 27. Médias mensais de (A) Metabólitos de Cortisol entre machos adultos, fêmeas adultas, jovens e infantes, (B) Porcentagem de scans de todos os indivíduos do grupo destinados ao descanso, deslocamento e forrageamento e (C) Porcentagem dos itens alimentares (fruto, folha e insetos) consumidos por todos os indivíduos do grupo.

Houve, no entanto, correlação negativa entre a variação do consumo de frutos e a concentração de metabólitos de cortisol para jovens e infantes (Figura 28; $r = -0,667$, $p < 0,05$), quando utilizado a porcentagem do consumo de itens alimentares da própria categoria etária.

Figura 28. Médias mensais dos MC e da porcentagem do consumo de frutos de jovens e infantes.

A mesma correlação foi encontrada para o Macho Adulto subordinado Ceni (Figura 29; $r = -0,725$, $p < 0,05$) quando observado o consumo de frutos de machos adultos.

Figura 29. Médias mensais dos MC de Ceni e da porcentagem do consumo de frutos de machos adultos.

O grupo percorreu diferentes distâncias entre os meses, o que pode ser observado pelas médias mensais das distâncias percorridas na Figura 30. De forma significativa, em fevereiro (o mês com maior média de distância diária percorrida) o grupo percorreu uma distância maior do que em maio ($F = 2,910$, $p < 0,05$, $df = 30$). Não foram encontradas correlações entre as médias mensais das distâncias percorridas e dos MC de categorias etárias ou indivíduos.

Figura 30. Distância mensal percorrida diariamente pelo grupo (* $p < 0,05$).

4.7. Clima e os metabólitos de cortisol

A Figura 31 mostra as médias mensais da temperatura e da precipitação no PECB ao longo do nosso estudo. Estes fatores climáticos se correlacionaram ($r = 0,844$, $p < 0,001$). Em números absolutos, a temperatura variou de 12 a 28 graus Celsius, e a precipitação de 0,0 a 7,1 centímetros. Não houve correlações entre as médias mensais dos fatores climáticos e as médias mensais de MC tanto para categorias etárias quanto para indivíduos.

Figura 31. Variação mensal das médias de precipitação e temperatura no Parque Estadual Carlos Botelho ao longo deste estudo.

4.8. Todas as ocorrências e os metabólitos de cortisol

A distribuição mensal da média das ocorrências pode ser visualizada nas Figuras 32 e 33.

Figura 32. Médias mensais das ocorrências: brigas, predadores e encontros.

Figura 33. Médias mensais das ocorrências: brincadeira, catação e amamentação.

Não foi possível quantificar padrões na variação dos níveis de cortisol para cada evento registrado. A análise da variação das concentrações de MC em relação à ocorrência dos eventos: briga, encontro entre grupos, presença de predadores, brincadeira, catação ou amamentação, após períodos de 30 minutos a 24 horas não mostrou qualquer associação.

A Figura 34 representa graficamente as médias mensais de metabólitos de cortisol de cada indivíduo adulto e de jovens e infantes em relação aos valores mensais do Fator TDO calculado para cada faixa etária.

Figura 34. Variação mensal de metabólitos de cortisol (cinza) e do Fator TDO (laranja) calculado para cada categoria etária (machos adultos, fêmeas adultas, jovens e infantes). No eixo y da esquerda de cada gráfico estão representadas as medidas das concentrações de metabólitos de cortisol (ng/g de fezes). No eixo y da direita estão representados os valores do Fator TDO.

4.9. Modelagem das necessidades energéticas

As figuras 35 a 39 apresentam os gráficos segundo a modelagem das necessidades energéticas criada por McEwen e Wingfield (2003b).

A quantidade de energia disponível no ambiente é menor para Ceni, e resulta em uma elevação de E_O durante a baixa disponibilidade de frutos em maio (Figura 35).

Figura 35. Modelagem das necessidades energéticas de Ceni. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais.

A energia necessária para a manutenção da homeostase é mais alta em jovens e infantes, e resulta em uma elevação de E_O durante a baixa disponibilidade de frutos em maio (Figura 36).

Figura 36. Modelagem das necessidades energéticas de jovens e infantes. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais.

Embora tenha havido uma flutuação da disponibilidade de energia no meio, E_I e E_E não ultrapassaram E_G para Benjamim (Figura 37).

Figura 37. Modelagem das necessidades energéticas de Benjamim. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente.

Embora tenha havido uma flutuação da disponibilidade de energia no meio, E_I e E_E não ultrapassaram E_G também para Olívia (Figura 38).

Figura 38. Modelagem das necessidades energéticas de Olívia. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente.

A energia necessária para a manutenção da homeostase também é alta para Ruiva, mas não ultrapassou a energia disponível no meio (Figura 36).

Figura 39. Modelagem das necessidades energéticas de Ruiva. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente.

4.10. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade

Indivíduos e categorias etárias e de sexo apresentaram Modelos Gráficos distintos. Utilizamos o cortisol como mediador fisiológico da resposta ao stress durante o período do estudo. Dessa forma, nossos modelos apresentam a variação das médias das concentrações de MC, seu erro padrão e a variação circadiana durante um ano (agosto de 2007 a julho de 2008).

A barra azul representa a variação de metabólitos de cortisol durante o ano. A barra azul escuro representa os valores das médias mensais de MC mais o erro padrão. Como representado na Figura 40, esta barra foi desenhada a partir das linhas que unem os erros padrões acima e abaixo das médias mensais. A barra azul claro representa a variação circadiana. Esta barra foi desenhada utilizando os valores máximos e mínimos da variação circadiana de cada indivíduo ou classe etária – que foram calculados a partir da maior e da menor média entre os três períodos do dia – mais o erro padrão acima e abaixo de cada média, respectivamente (Figura 40).

Figura 40. Esquema do método utilizado na montagem dos Modelos Gráficos. A linha preta une as médias mensais de MC. A linha azul une os erros padrões dessas médias mensais. A linha laranja representa a variação circadiana calculada a partir dos valores máximo e mínimo da variação circadiana do indivíduo ou classe etária representada pela barra amarela.

No Modelo Gráfico dos Machos Adultos do Grupo Pimenta I (Figura 41), a concentração de cortisol teve seu maior valor em abril, mas não chegou à faixa de Sobrecarga Homeostática.

Figura 41. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para adultos machos do grupo Pimenta I. A barra azul representa a variação de MC. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

No Modelo Gráfico das Fêmeas adultas do Grupo Pimenta I (Figura 42), a concentração de cortisol chegou à faixa de Sobrecarga Homeostática em agosto, quando atingiu seu valor máximo.

Figura 42. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para fêmeas adultas do grupo Pimenta I. A barra azul representa a variação de MC. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

No Modelo Gráfico dos jovens e infantes do Grupo Pimenta I (Figura 43), a concentração de cortisol teve seu maior valor em maio, mas não ultrapassou a faixa de Homeostase Reativa.

Figura 43. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para jovens e infantes do grupo Pimenta I. A barra azul representa a variação de MC. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

No Modelo gráfico de Benjamim (Figura 44), assim como no Modelo Gráfico de machos adultos, a concentração de cortisol teve seu valor máximo em abril e não chegou à faixa de Sobrecarga Homeostática.

Figura 44. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para o macho adulto Benjamim. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

No Modelo Gráfico de Ruiva (Figura 45), a concentração de cortisol de Ruiva teve seu maior valor em agosto e foi ainda mais alta do que o encontrado para fêmeas adultas, ultrapassando a faixa de Homeostase Reativa de forma ainda mais evidente.

Figura 45. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para a fêmea adulta Ruiva. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

Não há amostras de Ceni em setembro e novembro, resultando em um Modelo Gráfico com valores não contínuos de cortisol (Figura 46). A variação circadiana de MC representou a maior variação da sua concentração, que teve seu valor máximo em maio.

Figura 46. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para o macho adulto Ceni. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

A ausência de amostras em setembro e dezembro também resultou em um Modelo Gráfico com valores não contínuos de cortisol para Olívia (Figura 47). A concentração de MC, com valor máximo em fevereiro, não apresentou grande variação.

Figura 47. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade para a fêmea adulta Olívia. A barra azul escuro representa as médias mensais das concentrações de MC mais o erro padrão. A barra azul claro representa a variação circadiana.

5 - DISCUSSÃO

5.1. Comparação das concentrações dos hormônios entre as categorias etárias e entre os indivíduos

Estudos com sagüis têm mostrado que a atividade do eixo HPA é maior no período pós-natal do que em qualquer outro estágio da vida, e que a reatividade do adulto é estabelecida no final da infância (Pryce et al., 2002). Em contraste, os valores de cortisol parecem ser substancialmente menores durante a infância de macacos do gênero *Cebus* em comparação com o estágio adulto (Byrne & Suomi, 1999; Dettmer et al., 1996). De fato, no presente estudo, ao compararmos as categorias etárias, as concentrações de metabólitos de cortisol e de hormônios sexuais foram menores em jovens e infantes em relação aos machos e fêmeas adultos do nosso grupo.

Cortisol em machos

Embora alguns estudos com primatas do Velho Mundo tenham encontrado níveis mais baixos de cortisol em machos dominantes (Manogue et al., 1975; Keverne et al., 1982; Sapolsky, 1982, 1989), e Lynch e colaboradores (2002) tenham encontrado concentrações semelhantes dos metabólitos deste hormônio nas fezes de todos os machos adultos do grupo de *Cebus nigrinus* que estudaram, a comparação das concentrações de MC entre os indivíduos do grupo Pimenta I mostrou que o macho alfa, Benjamim, apresentou níveis superiores aos do macho subordinado Ceni. É importante ressaltar que ambos mantiveram uma relação de dominância estável ao longo da pesquisa.

Para podermos discutir a diferença entre as médias de MC de Benjamim e de Ceni, precisamos primeiro discutir outro resultado. A razão entre as concentrações de

MC dentro e fora do período de procriação dos machos adultos estudados por Lynch e colaboradores (2002) é quase cinco vezes maior do que a razão encontrada entre esses mesmos períodos para os machos do grupo Pimenta I. Embora não se possa descartar diferenças metodológicas como responsáveis pela diferença de resultados entre os dois trabalhos, sugerimos que uma menor elevação dos hormônios masculinos no período de procriação possa estar relacionada à baixa disponibilidade de alimentos ricos em energia (frutos) no PECB.

A baixa disponibilidade de frutos resultaria, dessa forma, em um mecanismo de controle do gasto de energia por meio da regulação da liberação de cortisol – hormônio associado ao aumento da demanda energética (McEwen e Wingfield, 2003b). Embora esta ainda seja uma especulação, levando em conta que estamos comparando apenas 2 indivíduos do grupo que estudamos com apenas um outro estudo da mesma espécie, outros dados aqui encontrados apoiam esta idéia.

E por que a baixa disponibilidade de energia no meio resultaria em níveis maiores de MC em Benjamim em relação a Ceni?

Sugerimos que a diferença encontrada entre os dois machos seria resultado dos custos energéticos de atividades às quais o primeiro está sujeito – como liderança e reprodução – que aumentam sua demanda energética e que não podem ser evitadas pelo macho alfa.

Temos, como exemplo dessas atividades, os seguintes dados de Benjamim. Este macho adulto foi observado copulando com todas as fêmeas do grupo, participou de 35% das interações agonísticas intragrupo e interveio em 33% das interações agonísticas em que ele não estava envolvido. Ceni, por outro lado, não foi visto copulando, participou do mesmo número de interações agonísticas, mas não interveio em nenhuma outra briga. Além disso, durante o período de coleta de dados, o grupo

Pimenta I participou de 12 encontros agonísticos com outros grupos de macacos-prego, bugios ou muriquis. As aproximações do Pimenta I aos outros grupos sempre ocorreram lideradas pelo macho alfa, cuja aptidão mais elevada justificaria os riscos e desgastes físicos dessas atividades.

De acordo com a meta-análise realizada por Abbott e colaboradores (2003), a subordinação de Ceni deveria resultar em níveis de MC maiores do que os de Benjamim. Ceni *não controlava o acesso aos recursos* (todas as interações agonísticas entre Ceni e Benjamim resultaram na exclusão do primeiro da fonte de comida ou da árvore de dormida), *estava sujeito a agressões* (todas as agressões de Benjamim a indivíduos adultos foram destinadas a Ceni), *não estabeleceu relações sociais estáveis e previsíveis* (Ceni era o indivíduo mais afastado dos outros membros do grupo [Peternelli, 2009]), e *não tem disponíveis canais de saída para frustrações sociais ou suporte social* (Benjamim interveio em 25% das interações agonísticas entre Ceni e jovens, sempre a favor dos jovens).

Assim, o fato de Benjamim apresentar concentrações de MC mais elevadas do que o macho subordinado é um forte indício de que as atividades do macho alfa representam uma carga alostática maior do que as dificuldades relacionadas à subordinação de Ceni.

Como veremos na comparação entre as médias mensais de MC dos indivíduos (item 5.3), o pico de MC de Benjamim coincide com o período de procriação – assim como Lynch e colaboradores (2002) observaram para os macacos-prego da Estação Ecológica de Caratinga – e representa o maior aumento dos níveis de MC entre os dois machos adultos. Sugerimos, a partir deste resultado, que as atividades relacionadas ao período de procriação são responsáveis pela carga alostática de Benjamim que resultam em uma maior média de MC para este indivíduo em relação a Ceni.

Bercovitch e Ziegler (2002) mostram que, para um grande número de espécies, indivíduos subordinados que estão sujeitos a altas taxas de stress social e nutricional não são caracterizados por *altos níveis de cortisol e baixo sucesso reprodutivo*. Os pesquisadores propõem que os primatas apresentam uma flexibilidade fisiológica que os permite adequar a demanda energética da atividade reprodutiva – por meio do aumento concomitante das concentrações de GCs e hormônios sexuais – sem detrimento do sucesso reprodutivo. Nesta direção, nossos dados indicam que o macho dominante Benjamim apresenta níveis mais elevados de MC e maior sucesso reprodutivo do que o macho subordinado Ceni.

É necessário considerar, no entanto, os resultados de algumas pesquisas que apontam que os perfis de MC podem estar mais relacionados a características temperamentais dos indivíduos do que ao ranking (e.g. Sapolsky e Ray, 1989; Johnson et al., 1996). Características individuais – como experiências na infância (i.e. cuidado parental inadequado em sagüis: Levine, 1987) ou constituição genética (i.e. macacos rhesus e humanos: Suomi, 1987) – também podem representar parte das diferenças encontradas no presente estudo.

Andrógenos em machos

Entre os estudos com primatas, a maior parte das espécies caracterizadas por sistemas de acasalamento multi-macho/multi-fêmea apresenta correlação positiva entre testosterona e o ranking de dominância (Bercovitch, 1993; Kraus et al., 1999; Muller and Wrangham, 2004). Entretanto, embora seja esperada a manutenção dos níveis basais de MA em períodos de stress prolongado (como instabilidade hierárquica) apenas em machos dominantes (Rose, 1985; Sapolsky, 1982, 1986a e 1986b), tanto em estudos mais antigos de espécies de macacos do Velho Mundo (Sapolsky, 1990a e 1993), como

no estudo de Lynch e colaboradores (2002) com *Cebus nigrinus*, os níveis basais de MA não variaram em relação ao ranking. No nosso estudo, o macho dominante apresentou concentrações de MA consideravelmente maiores do que o macho subordinado.

A variação de andrógenos ranking-dependente também pode ser encontrada entre machos de mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*). Micos-leão-dourado são calitriquídeos monogâmicos que apresentam um sistema social de ajuda no cuidado parental, ou seja, machos subordinados aparentados ou não ajudam o macho dominante a cuidar de seus filhotes. Machos não aparentados não apresentam nenhum ganho genético ao ajudarem no cuidado dos filhotes dos outros machos e, portanto, supõe-se que eles permaneçam no grupo por falta de opção. Por este motivo, ou por inibição comportamental direta do macho dominante, ou mesmo por ambos, estes animais apresentam níveis de andrógenos menores até mesmo que os níveis encontrados em machos jovens aparentados (Bales et al., 2005).

Em macacos-prego, os machos normalmente não são aparentados devido a migrações desses indivíduos entre grupos (Fragaszy et al., 2004). No grupo Pimenta, uma vez que não há indícios de que Ceni participe ativamente do cuidado dos filhotes, a causa mais provável para seus baixos níveis de MA é a inibição comportamental de Benjamim, evidenciada pelo controle do acesso a recursos alimentares e interferências em conflitos agonísticos. Apesar da diferença encontrada entre os dois machos adultos, ambos apresentaram concentrações de MA superiores às de jovens e de infantes.

Cortisol em fêmeas

Enquanto utilizamos atividades relacionadas ao ranking para explicar as diferenças entre os níveis de cortisol de machos adultos, entre as fêmeas, e a exemplo de

outros estudos (e.g. Saltzman et al., 1994; Ziegler et al., 1995), as diferentes concentrações deste hormônio foram associadas ao *status* reprodutivo.

A média dos MC de Ruiva foi maior do que a média dos MC de Olívia. Visto que Bales e colaboradores (2005) observaram um aumento significativo das concentrações de cortisol, devido à gravidez, em fêmeas de mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), consideramos, inicialmente, que a diferença entre as concentrações de MC das duas fêmeas era ocasionada pelas altas concentrações de MC de Ruiva durante o terceiro bimestre da gravidez (meses de agosto e setembro). No entanto, Ruiva continuou apresentando níveis mais elevados do metabólito mesmo após a exclusão dos dados de agosto e setembro da análise. Olívia também esteve grávida em parte do período de estudo, mas os dados restringem-se ao primeiro bimestre de gravidez, quando não é esperado um aumento dos níveis de cortisol (Bales et al., 2005).

Estudos com diversas espécies de primatas têm demonstrado que os níveis de cortisol após o parto não retornam aos níveis encontrados em fêmeas em ciclo ovariano normal (Bahr et al., 1998; Bardi et al., 2003; Ziegler et al., 1995; Weingrill et al., 2004). Dessa forma, mesmo que os altos valores de MC durante o período de gravidez não expliquem, por si só, a diferença entre as médias destes metabólitos das duas fêmeas, ainda podemos associar essa diferença ao processo de gerar e cuidar do filhote.

Weingrill e colaboradores (2004) consideram que ambientes naturais demandam grande dispêndio de energia por parte das fêmeas com filhotes. Na pesquisa dos autores, as fêmeas com filhotes dos babuínos selvagens (*Papio anubis*) da reserva De Hoop gastavam mais tempo na vigília do que as outras fêmeas, principalmente devido ao perigo de infanticídio, o que refletiu em níveis mais elevados de cortisol.

O infanticídio não é uma prática comum entre os macacos-prego do PECB (não tendo sido registrado desde o início da observação desta população, ver Izar et al. 2008,

para uma revisão). Entretanto, enquanto a disponibilidade de alimentos não é um fator crítico para as fêmeas dos babubínos de De Hoop (Weingrill, 2004), o aumento da carga alostática devido à lactação pode resultar em maiores concentrações de MC para as fêmeas do PECB, assim como observado para fêmeas de *Cebus apella* (Dettmer et al., 1992; Kling et al., 1992).

Olívia e jovens e infantes apresentaram os mesmos níveis de MC. Este resultado apóia os resultados de Lahoz e colaboradores (2007). Segundo os autores, os níveis de cortisol de fêmeas adultas em ciclo ovariano normal e de jovens não deveriam apresentar diferenças significativas. Isso ocorre porque o padrão de hipercortisolismo, “norma” entre fêmeas de *Cebus*, tem início na metade da infância e continua durante a idade adulta. Não foi possível distinguir, no entanto, o sexo de jovens e infantes, tornando mais frágil a comparação entre as categorias etárias.

Progesterona em fêmeas

Em relação aos MP, as médias das concentrações encontradas para Ruiva e Olívia não são significativamente diferentes entre si, mas diferem de forma significativa das médias encontradas para jovens e infantes. Este resultado era esperado, uma vez que níveis maiores de progesterona são associados a fêmeas em ciclo ovariano (Lahoz et al., 2007).

5.2. Concentrações dos hormônios entre os períodos do dia

Estudos recentes têm sugerido que a glândula adrenal de macacos do gênero *Cebus* possui propriedades oscilatórias intrínsecas que participam do ritmo circadiano da secreção de cortisol e da resposta circadiana do cortisol ao ACTH. Sistemas específicos podem ser regulados de forma diferente por sinais do Núcleo

Supraquiasmático (SCN) por meio de relógios locais, permitindo respostas mais específicas baseadas no período do dia (Kriegsfeld e Silver, 2006).

Em macacos-prego (*Cebus apella*), é esperado que encontremos maiores concentrações deste hormônio relacionadas ao despertar, nas primeiras horas do dia, e que estas concentrações decaiam ao longo do tempo (Torres-Farfan et al., 2008).

Este padrão foi encontrado de forma significativa, neste estudo, para todas as categorias etárias (machos adultos, fêmeas adultas, e jovens e infantes). Em todos os casos, o decaimento das concentrações de MC não ocorreu entre *todos* os períodos do dia. Ou seja, não observamos uma queda inicial quando comparamos o primeiro período (6 às 10h) com o segundo (10 às 14h), e depois outra queda entre este e o terceiro período do dia (14 às 18h). As quedas nas concentrações do mediador fisiológico ocorreram somente do primeiro período para aos dois seguintes.

Torres-Farfan e colaboradores (2008) mediram a variação circadiana de cortisol no plasma sanguíneo. Embora, no nosso estudo, o aumento das concentrações de MC nas fezes do primeiro período do dia possa estar relacionado ao aumento do cortisol sanguíneo ocorrido em período anterior, inclusive durante a noite, sugerimos que a semelhança entre os resultados dos dois estudos justifique a associação inicial do aumento dos MC no primeiro período do dia com as atividades relacionadas ao despertar. Esses resultados indicam que em *Cebus nigrinus* selvagens, da mesma forma que Torres-Farfan e colaboradores (2008) encontraram para *Cebus apella* cativos, as atividades relacionadas ao despertar do primeiro período do dia necessitam de uma maior carga alostática para a manutenção da homeostase do que os períodos subsequentes.

Quando analisamos os indivíduos separadamente, algumas diferenças circadianas encontradas para as categorias etárias são perdidas. Embora a diferença das

médias entre os períodos circadianos do macho adulto Ceni sejam claras, não existiu diferença significativa de MC entre os períodos do dia.

Benjamim também não apresentou variação circadiana dos MC. Uma análise *post hoc*, no entanto, indicou que tal variação existe de forma bastante significativa quando analisamos os níveis de MC do indivíduo excluindo a estação de procriação (abril e maio). Durante esta estação, o mediador fisiológico em questão não variou entre os períodos do dia, indicando que a carga alostática de Benjamim tornou-se mais homogênea ao longo do dia.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Sousa e Ziegler (1998). Neste estudo, fêmeas de sagüis (*Callithrix jacchus*) deixaram de apresentar variação circadiana durante a gravidez, outro período custoso do ciclo de vida relacionado à reprodução.

Em relação aos hormônios sexuais, variações circadianas são encontradas em andrógenos e progesterona, podendo estar relacionadas a mudanças comportamentais (Kalra e Kalra, 1977). No nosso estudo, no entanto, MA e MP não apresentaram variação circadiana para nenhum dos indivíduos ou categorias etárias. Este resultado indica que, embora tenhamos encontrado uma correlação positiva entre as médias mensais de MC e de hormônios sexuais (item 5.5), estes hormônios não apresentam uma correlação diária direta.

5.3. Concentrações mensais dos hormônios

De acordo com a metodologia aqui desenvolvida, as médias mensais das concentrações dos hormônios das classes etárias e dos indivíduos são indicativas da existência ou ausência de uma variação intra-anual de cortisol e de hormônios sexuais. De fato, as diferenças significativas encontradas entre os meses foram correlacionadas

com fatores ambientais e/ou sociais aos quais os macacos-prego do PECB estão submetidos.

A variação mensal de metabólitos de cortisol não ocorreu de forma igual para todas as classes de idade e sexo. Embora não tivéssemos previsto esses resultados, eles estão de acordo com a literatura, conforme será discutido a seguir.

Machos adultos

Assim como no estudo de Lynch e colaboradores (2002), machos adultos apresentaram um pico das concentrações de MC e MA durante o período de reprodução, o que não seria esperado para uma espécie como *Cebus nigrinus*, devido à baixa taxa de agressividade entre machos. De acordo com a *Hipótese do desafio*, tal elevação seria esperada somente em espécies com alta incidência de disputas por cópulas entre os machos (Wingfield et al., 1990).

Portanto, outros fatores devem estar relacionados a este aumento. Altos níveis de MA durante o período proceptivo das fêmeas beneficiam a produção e desenvolvimento dos espermatozoides. Andrógenos também são essenciais para a manutenção da libido e têm um papel importante na regulação da capacidade erétil em humanos (Kwan et al., 1983; Cunningham et al., 1990; Rakic et al., 1997).

Ao mesmo tempo, a elevação do cortisol permite respostas coporais rápidas para oportunidades de cópulas (Lynch et al., 2002).

Estes mecanismos de ação hormonal durante o período de procriação explicam melhor a variação mensal de MC do macho alfa Benjamim do que do macho subordinado Ceni. Além de Ceni não ter sido observado copulando, sua variação mensal de MC foi correlacionada à variação na disponibilidade de alimentos (item 5.6).

Fêmeas adultas

Fêmeas adultas apresentaram um pico significativo de MC e de MP em agosto. Entretanto, ao separarmos as concentrações destes metabólitos das duas fêmeas, percebemos que este pico não reflete a condição de ambas. Apenas a fêmea Ruiva apresentou variação mensal significativa de MC e MP. A variação de Ruiva foi tão marcante que determinou a variação observada para a classe.

As altas concentrações de MP de Ruiva em agosto permaneceram semelhantes em setembro, e só decaíram em outubro após o nascimento de seu filhote. Esse era um resultado esperado uma vez que Ruiva estava no último bimestre de gravidez e a progesterona ajuda a sustentar essa condição ao promover o relaxamento do miométrio. De fato, o parto requer uma queda acentuada deste hormônio para acontecer (Csapo, 1956). Além disso, a queda de progesterona pode induzir parto prematuro, enquanto progesterona exógena não impede o parto no período normal (Haluska et al., 1997).

Por outro lado, as concentrações de MC de Ruiva apresentaram uma queda significativa de agosto para setembro, mesmo sendo este o último mês da gravidez. Como justificar esse resultado se estudos com humanos, calitriquídeos e lagomorfos mostraram que os níveis circulantes de cortisol aumentam de duas a três vezes no último período da gestação, voltando a cair somente após o parto (Mulay et al. 1973; Carr et al. 1981; Kriesten & Murawski 1988; Allolio et al. 1990; Ziegler et al. 1995; Lockwood et al. 1996)?

Sugerimos que este resultado indica que algum outro fator – ou alguns outros fatores – além da gravidez, deve ter sido responsável pelos altos níveis de metabólitos de cortisol encontrados em agosto.

Estudos mostram que a resposta de fêmeas a estressores de curta duração é maior do que as respostas de machos em *Cebus apella* (Dettmer et al., 1992; Kling et

al., 1992), e que a necessidade energética da mãe pode aumentar de duas a cinco vezes durante o período de amamentação em relação a períodos não reprodutivos. No entanto, não foi encontrada correlação entre os altos níveis de MC e eventos estressantes únicos ou baixa disponibilidade de alimentos. Além disso, não há um método disponível para contabilizar diretamente como, ou se, estes fatores interagem ocasionando o aumento da carga alostática de Ruiva.

No item 5.8, sugerimos um modo de interpretar esses resultados a partir do fator TDO e da proposta de Romero e colaboradores (2009), de que “um animal pode ter que se esforçar ainda mais se existirem mudanças concomitantes, como uma tempestade ocorrendo durante a gravidez”.

Jovens e infantes apresentaram pico de cortisol no mês de maio. Tal variação será discutida no item 5.6.

5.4. Médias hormonais durante diferentes períodos da reprodução

Machos adultos

Como discutido no item 5.1, embora as concentrações de MC de machos adultos sejam maiores durante o período de procriação, o aumento observado é menor do que o encontrado no estudo de Lynch e colaboradores (2002). Já o pico observado nas concentrações de MA durante a reprodução foi compatível com este estudo.

Segundo a Hipótese de Balanço (Ketterson e Nolan, 1999), as concentrações de andrógenos de machos de espécies bi-parentais devem refletir o balanço entre o esforço reprodutivo do macho direcionado à cópula (aumento dos níveis de andrógenos) *versus* seu esforço parental (diminuição dos níveis deste hormônio). Embora a média da concentração de MA tenha aumentado durante o período de procriação, não houve diminuição da média destes metabólitos no período logo após o nascimento do filhote.

Este resultado, esperado para espécies poligínicas como as de macacos-prego, sugere que o grau de cuidado parental por parte de Benjamim (Izar, 1994; Peternelli, 2009) e outros macacos-prego machos (Ferreira et al., 2006) não parece estar associado a mudanças nos níveis de andrógenos.

Fêmeas adultas

Com relação às fêmeas adultas, não houve variação dos MC entre os períodos analisados. A fêmea Ruiva não foi vista copulando ou apresentando comportamento proceptivo durante o período de procriação e, portanto, se as variações de MC neste período estiverem relacionadas somente a estes comportamentos, esse resultado já deveria ser esperado. Além disso, Ruiva apresentou níveis de cortisol muito elevados em agosto (final do período de gravidez), o que pode ter mascarado possíveis elevações dentro do período de acasalamento.

Olívia também não foi vista copulando, entretanto teve filhote seis meses após a estação de procriação, o que indica que ele foi concebido neste período. Embora as médias de MC de Olívia não tenham variado entre os meses ou entre os períodos com e sem cópulas, seus MP aumentaram significativamente durante o período de procriação. Dessa forma, sugerimos que a reprodução não modificou a carga alostática de Olívia, mesmo modificando seu comportamento e fisiologia reprodutiva.

Nós sugerimos que a ausência de aumento das concentrações dos MC de Olívia durante o período de procriação – assim como a elevação destes metabólitos abaixo da esperada para machos adultos durante o mesmo período (item 5.1) – pode ser resultado do controle da carga alostática devido à baixa disponibilidade de alimentos ricos em energia no PECB. Olívia é o menor indivíduo adulto do grupo e pode apresentar menores reservas calóricas para períodos como este. Não é funcional liberar cortisol a

fim de aumentar a demanda energética (McEwen e Wingfield, 2003b), se Olívia pode não ter de onde mobilizar essa energia.

De fato, ela apresentou níveis de MC semelhantes aos de jovens e infantes. A baixa taxa reprodutiva das fêmeas (Izar et al., 2008), o regime de fissão-fusão do grupo (Nakai, 2007), o tamanho da área de uso acima dos padrões da espécie e a baixa densidade populacional (Izar et al., 2008) podem ser, dessa forma, resultados de longo prazo desses déficits energéticos no PECB.

5.5. Correlações entre as concentrações dos hormônios

É comum macacos do Novo Mundo apresentarem similaridades marcantes entre as respostas adrenal e gonadal em contraste à visão padrão de que existe uma relação inversa entre as atividades dos dois eixos. Estas respostas apresentam uma interação complexa na qual o cortisol regula a liberação de hormônios gonadais, e estes aumentam, concomitantemente, a liberação de cortisol (Saltzman et al., 1998; Ziegler et al., 1995). Além disso, parte dos hormônios sexuais é produzida pelas glândulas adrenais independentemente da função gonadal (Lahoz et al., 2007).

As concentrações mensais de MA de Benjamim apresentaram correlação positiva com as médias mensais de seus MC. Uma vez que o aumento concomitante de cortisol e andrógenos durante o período de procriação está relacionado a fatores que podem permitir o aumento da aptidão do indivíduo (cortisol: respostas corporais rápidas a oportunidades de cópulas, Lynch et al., 2002; andrógenos: aumento da libido e da capacidade erétil, Rakic et al., 1997), a correlação dos seus metabólitos nas fezes de Benjamim indica uma resposta adaptada ao contexto, independentemente de onde os andrógenos foram produzidos nas gônadas ou nas adrenais.

Os MC e MA de Ceni também apresentaram correlação entre suas médias mensais. Entretanto, se considerarmos que os MC de Ceni variaram de acordo com a disponibilidade de alimentos (como será proposto no item 5.6), esta correlação pode indicar uma resposta fisiológica prejudicial ao macho subordinado, uma vez que o aumento dos níveis de andrógenos não ajuda o animal a lidar com a baixa disponibilidade de alimentos ricos em energia do PECB.

Os metabólitos de cortisol e de andrógenos de jovens e infantes não apresentaram correlação, enquanto essa correlação foi encontrada entre seus MC e MP. Devido à supressão rápida de progesterona e do cortisol causada por injeções de dexametasona, Lahoz e colaboradores (2007) já haviam sugerido que a maior parte da progesterona circulante em fêmeas jovens era originária das glândulas adrenais, estando sob efeito direto de glucocorticóides. Segundos os autores, o aumento do cortisol em fêmeas jovens é insuficiente para prejudicar o desenvolvimento ovariano ou o desenvolvimento da fase luteal mais prematura (Lahoz et al., 2007).

As médias mensais dos MC e dos MP de Ruiva apresentaram correlação. Um resultado esperado visto que ajustes metabólicos relacionados à reprodução podem promover a elevação de esteróides adrenais e gonadais em espécies de macacos do Novo Mundo (Bercovitch e Ziegler, 2002). O final do período de gravidez dessa fêmea, por exemplo, foi associado a um aumento tanto dos níveis de cortisol como de progesterona.

As médias mensais dos MC e dos MP de Olívia, por outro lado, não apresentaram correlação. Uma vez que encontramos um aumento dos níveis de MP durante o período de procriação, no qual Olívia copulou e ficou grávida, e que o cortisol pode aumentar a fertilidade de fêmeas de algumas espécies de macacos do Novo Mundo

(Bercovitch e Ziegler, 2002), esperávamos encontrar uma correlação entre os dois metabólitos.

5.6. Correlações entre as médias mensais de metabólitos de cortisol, do orçamento de atividades e dos itens alimentares consumidos

Como vimos no item 5.3, a variação intra-anual de MC não ocorreu de forma igual para todas as classes etárias ou indivíduos. Sugerimos que a variação de MC de Benjamim ocorreu devido ao período de procriação, e a variação de MC da fêmea adulta Ruiva ocorreu devido à gravidez.

Jovens e infantes também apresentaram uma variação intra-anual de MC, com pico da concentração destes metabólitos em maio. É provável, no entanto, que o pico de cortisol da categoria, por ser a única que não apresenta interações sexuais, seja ocasionado por fatores diferentes da reprodução. O fato de que – ao contrário de Benjamim, Ceni e Ruiva – jovens e infantes não apresentaram pico significativo de hormônios sexuais durante o estudo apóia esta idéia.

Inicialmente, calculamos a correlação entre as médias mensais de MC das três categorias e as médias mensais do orçamento de atividades e da porcentagem do forrageamento destinada a três itens alimentares (folha, fruto e insetos) de todo o grupo. Não encontramos resultados significativos.

Em seguida, separamos o orçamento de atividades e o consumo de itens alimentares por categoria etária – uma vez que as médias de cortisol também estavam divididas entre as classes – e encontramos duas correlações. Ambas as variações mensais de MC: de jovens e infantes e de Ceni, se correlacionaram negativamente com o consumo de frutos das categorias etárias: jovens e infantes e machos adultos,

respectivamente. Sugerimos, a partir destes dados, que quanto menos frutos jovens e infantes e Ceni consumiram, maiores foram seus níveis de cortisol.

A diminuição da disponibilidade de alimentos já foi associada a altos níveis de cortisol em babuíños (Sapolsky, 1986) e lêmures de calda anelada (Cavigelli, 1999).

Mas por que a diminuição de frutos em maio não afetou as demais categorias?

Diversas pesquisas indicam que a disponibilidade de alimentos ricos em energia é um fator mais crítico para jovens e infantes do que para os adultos.

A ontogênese exerce uma forte influência na escolha da dieta e nas estratégias de forrageamento empregada pelos primatas. Durante o início do desenvolvimento, o animal precisa consumir uma quantidade suficiente de nutrientes para crescer de maneira saudável e chegar à idade adulta. Além disso, indivíduos menores possuem uma maior taxa metabólica. Segundo o princípio de Jarman-Bell (Bell, 1971; Oftedal, 1991; Agestuna, 2001; Clymer, 2006), a alta taxa metabólica desses indivíduos resulta em uma maior demanda energética.

Os primatas juvenis apresentam índices de sucesso no forrageamento menores do que os adultos e, conseqüentemente, uma dieta menos diversa e/ou uma maior proporção de tempo dedicada ao forrageamento (Fragaszy e Boinski, 1995; Johnson e Bock, 2004, Gunst, et al, 2008). A digestão e os custos energéticos de crescimento também limitam a dieta dos juvenis. Estudos mostram que os juvenis dão maior ênfase ao forrageamento por alimentos de fácil digestão e ricos em lipídios e proteínas, como os frutos (Janson e van Schaik, 1993).

Portanto, a queda no consumo de frutos pode representar uma alta carga alostática para esta faixa etária. O cortisol, dessa forma, seria utilizado para o aumento da demanda energética que permitiria que os indivíduos buscassem fontes alimentares alternativas.

Embora não possamos afirmar como o aumento da demanda energética auxiliaria os jovens e infantes dos macacos-prego do PECB a buscar fontes alimentares alternativas, nossos dados indicam que o aumento de cortisol não está relacionado ao deslocamento.

Glucocorticóides apresentam um papel importante na mobilização de energia durante atividades físicas como locomoção (Girard e Garland, 2001). Entretanto, a comparação das médias mensais das distâncias diárias percorridas pelo grupo mostrou que justamente em maio o grupo deslocou-se menos do que nos outros meses.

Talvez o aumento da demanda energética tenha relação com o a energia gasta para extrair e processar folhas, recurso que representou 70% dos itens alimentares consumidos pela categoria no mês de maio.

E por que a diminuição de frutos em maio afetaria Ceni?

Como discutido no item 5.1, de acordo Abbott e colaboradores (2003), o baixo acesso a recursos, a sujeição a agressões e a ausência de suporte social, deveriam fazer com que Ceni apresentasse altos valores de MC. Este não foi o resultado que encontramos para a média destes metabólitos quando consideramos todo o período de estudo. Entretanto, sugerimos que, durante a baixa disponibilidade de frutos, as restrições resultantes da subordinação de Ceni podem representar um fator tão crítico para este macho quanto representam as necessidades energéticas resultantes do desenvolvimento ontogenético para jovens e infantes.

No mês de maio, e ao contrário de todos os outros meses, o consumo de frutos representou somente cerca de 5% dos itens alimentares consumidos, enquanto este item representa mais de 60% durante o verão. Dessa forma, a disponibilidade de frutos modificaria a carga alostática, tanto de jovens e infantes quanto de Ceni, somente quando alcançasse níveis muito reduzidos.

Por outro lado, nossos resultados não possibilitaram a distinção entre qual dos eventos: a baixa disponibilidade de frutos ou a procriação (ou se ambos) resultaram no pico de MC de Ceni em maio. Dois fatos indicam que a procriação tem papel reduzido na elevação do cortisol encontrada: o pico de MC relacionado ao período de procriação em Benjamim ocorreu em abril, não em maio; e Ceni nunca foi observado copulando.

5.7. Clima e metabólitos de cortisol

Outros fatores ambientais que apresentam variação sazonal – como temperatura e fotoperíodo – também podem estar associados às variações mensais das concentrações de cortisol (e.g. Weingrill et al., 2004). No presente estudo, no entanto, não houve correlação das médias mensais de cortisol com as médias dos fatores climáticos: temperatura ou pluviosidade.

Embora alguns estudos tenham encontrado uma forte correlação entre as quedas de temperatura e o aumento dos níveis de cortisol (Weingrill et al., 2004; Huber et al., 2000), sugerimos que as quedas de temperatura no PECB – cuja média não passou de 16 graus Celsius e o valor mínimo absoluto não passou de 12 graus Celsius – não foram suficientes para aumentar a secreção de cortisol dos macacos-prego que lá vivem. Nos babuíños da Reserva Natural de De Hoop, por exemplo, a temperatura que ocasionou o aumento dos níveis deste hormônio chegava a 3 graus Celsius (Weingrill et al., 2004).

5.8. Todas as ocorrências e os metabólitos de cortisol

Ocorrências variadas podem ocasionar respostas diferentes na liberação de GCs pelo eixo HPA (Sapolsky, 1994). Não foi possível, no entanto, quantificar padrões na variação dos níveis de cortisol para cada evento registrado. Não conseguimos saber, por exemplo, quantas vezes um encontro entre grupos consegue aumentar a liberação de

cortisol em comparação ao aumento ocasionado por uma briga intra-grupo. Na realidade, não foi possível identificar ao menos se um único evento pode ocasionar tal elevação, ou, caso consiga, se esta elevação apresenta sempre a mesma amplitude.

Por outro lado, Romero (2009) propõe que a ocorrência de estressores concomitantes pode contribuir para o aumento da média das concentrações de MC de um dado indivíduo se somada a outros eventos no seu ciclo de vida. No presente estudo, sugerimos que estes eventos sejam: a gravidez para Ruiva, o período de procriação para Benjamim e a baixa disponibilidade de alimentos para Ceni, jovens e infantes. Formulamos o Fator TDO a fim de verificar se os efeitos negativos das ocorrências somadas para cada categoria de idade e sexo poderiam colaborar para a variação de MC dos indivíduos ou categorias etárias durante esses períodos.

Não é esperado, no entanto, haver correlação entre o Fator TDO e as médias mensais de MC, uma vez que o aumento da demanda energética causada por atividades físicas, como brincadeiras, também pode resultar em aumento dos níveis de MC (e.g. atividade locomotora ver Girard e Garland, 2001).

Sugerimos que a expressão de comportamentos relacionados a ocorrências positivas possa ser mediada pela disponibilidade de energia que o animal pode adquirir do meio, ou seja, o animal expressaria ou não estes comportamentos se isso não resultasse em desgaste energético. Dessa forma, justificariamos por que as frequências de catação e brincadeira são baixas durante os meses em que os indivíduos do grupo Pimenta I apresentam dificuldades relacionadas ao ciclo de vida, contribuindo para os valores negativos do Fator TDO.

O aumento da carga alostática está relacionado à diminuição da capacidade de um animal em lidar com um estressor e, segundo McEwen e Wingfield (2003b), deve ser medido pelo aumento das concentrações de MC. Os menores valores do Fator TDO

de Ceni e jovens coincidiram com os picos de MC durante a baixa disponibilidade de frutos. Dessa forma, sugerimos que, embora as ocorrências isoladas não tenham aumentado a carga alostática desses indivíduos, a somatória delas pode contribuir para a elevação das concentrações deste metabólito.

A somatória das ocorrências por si só, no entanto, não resulta em altos níveis de cortisol, uma vez que outros valores negativos do Fator TDO não foram relacionados a elevações dos níveis de MC de Ceni e jovens, assim como não afetaram o pico de MC de Benjamim.

Por outro lado, a gravidez de Ruiva, por si só, também não justifica os altos valores de MC desta fêmea encontrados em agosto. Estes valores foram relacionados ao período de gravidez que se estende até o final de setembro. Neste mês, entretanto, obtivemos concentrações deste metabólito semelhantes às concentrações de MC dos meses subsequentes. Dessa forma, a média elevada de MC de Ruiva em agosto não pode ser justificada somente pela gravidez. Dentre os dados obtidos no presente trabalho, o baixo valor do Fator TDO seria o único relacionado a este resultado.

Finalmente, as médias das concentrações de MP de Ruiva também tiveram seu pico em agosto. Uma vez que fêmeas adultas cativas de macacos-prego (*Cebus apella*) apresentaram um aumento nos níveis de progesterona e cortisol em resposta a estressores (Lahoz et al., 2007), a diferença entre as concentrações de MP de agosto e setembro também só encontra justificativa se considerarmos que o Fator TDO reflita a alta incidência de estressores no primeiro mês.

5.9. Modelagem das necessidades energéticas

Utilizamos a Figura 48 para comparar os resultados sobre a modelagem energética dos diferentes indivíduos. Como pode ser observado, a energia disponível no

ambiente é menor para Ceni do que para os outros indivíduos do grupo, inclusive para Olívia cujo gráfico não está representado. A baixa E_G deve-se ao fato de que indivíduos subordinados, como o Ceni, têm menor acesso a recursos restritos. No caso deste macho subordinado, quem restringe o acesso aos recursos mais energéticos (frutos) é Benjamim (como discutido nos itens 5.1 e 5.6). Dessa forma, quando existe uma queda substancial na disponibilidade de frutos, a energia necessária para encontrar, processar e/ou assimilar outras fontes alimentares aumenta. Este aumento causaria o aumento da carga alostática e, conseqüentemente, o aumento das concentrações de MC observada em maio. Sugerimos que a diminuição da energia disponível no meio não diminui a níveis abaixo da energia necessária para a homeostase básica, e, portanto, não leva o indivíduo a uma Sobrecarga Alostática do tipo I.

A tolerância de Benjamim ao forrageio de jovens e infantes em recursos alimentares restritos (Paternelli, 2009) permite que eles adquiram a mesma energia do meio que o macho alfa e as fêmeas adultas. Entretanto, a energia necessária para a homeostase básica dos imaturos é maior devido às características do funcionamento dos seus corpos em desenvolvimento detalhadas no item 5.6. Dessa forma, quando ocorreu a queda na disponibilidade de frutos em maio, a E_O desses indivíduos aumentou, resultando em altos níveis de MC.

Enquanto o modelo de trabalho proposto por McEwen e Wingfield (2003b) pode explicar as variações de MC de Ceni, jovens e infantes, ele não conseguiu explicar por que as concentrações de MC variaram nas fezes de Benjamim e Ruiva.

A energia básica necessária para a homeostase de Ruiva era alta no início do estudo (agosto e setembro) devido ao final da gravidez, e não diminuiu muito após o parto devido aos gastos energéticos relacionados aos cuidados do filhote, como transporte e amamentação. Entretanto, níveis elevados de MC foram encontrados apenas

em agosto. E não foi possível relacionar, a partir dos dados que coletamos, diferenças na disponibilidade de energia no meio ou na energia extra necessária para que Ruiva pudesse sair, procurar, processar e/ou assimilar o alimento somente para este mês.

Da mesma forma, não houve indícios de que o aumento da carga alostática de Benjamim ocorrida em abril, durante a estação de procriação, tenha associação com E_G , E_E ou E_I . Embora seja esperado um aumento de E_I neste período – devido, por exemplo, aos gastos energéticos com as cópulas – o pico de MC de Benjamim não ocorreu durante toda a estação de procriação. Mesmo que o macho alfa tenha sido visto copulando em maio, quando a disponibilidade de frutos diminuiu para todos os indivíduos do grupo, seus níveis de MC foram menores do que em abril.

Figura 48. Comparação entre os gráficos de modelagem das necessidades energéticas. E_E representa a energia necessária para a homeostase básica. E_I representa a energia extra necessária para um indivíduo sair, procurar, processar e assimilar o alimento em condições ideais. E_G representa a quantidade de energia (que os alimentos contêm) disponível no ambiente. A linha E_O representa a energia necessária para sair, encontrar comida, processá-la e assimilar seus nutrientes sob condições não ideais.

Portanto, o modelo de trabalho de McEwen e Wingfield (2003b), embora tenha sido útil para relacionar e diferenciar as causas do aumento das concentrações de MC de

Ceni, jovens e infantes com suas necessidades energéticas, não conseguiu explicar as variações de MC de todos os indivíduos.

5.10. Modelo Gráfico da Esfera de Ação de Reatividade

Segundo Romero e colaboradores (2009), o objetivo do Modelo Gráfico é criar uma estrutura abrangente para o stress focando apenas em como o corpo de um animal de uma determinada espécie responde a estressores, e como essas respostas adaptativas agudas podem se tornar patológicas se sustentadas.

Devido à diversidade das respostas endócrinas dos diferentes indivíduos das várias espécies animais, não existem critérios específicos sobre quais concentrações do mediador fisiológico escolhido devem pertencer às faixas: Falha Homeostática, Homeostase Preditiva, Homeostase Reativa e Sobrecarga Homeostática. Dessa forma, o que percebemos é que montar o Modelo Gráfico é sugerir como os resultados encontrados na pesquisa respondem as seguintes perguntas:

P1. O mediador fisiológico varia sazonalmente para as categorias ou indivíduos da espécie estudada? Por que?

P2. Como as concentrações deste mediador podem ser distribuídas entre as faixas do Modelo Gráfico?

P3. Como variações do mediador fisiológico menores do que a variação representada no *eixo x* (e.g. variações circadianas ou intramensais) podem ser representadas no gráfico?

Nossos Modelos Gráficos – juntamente com informações sobre o ambiente físico e social e sobre o ciclo de vida dos indivíduos – sugerem respostas para essas perguntas.

R1. O cortisol variou sazonalmente: para Benjamim devido ao período de procriação; para Ruiva devido a eventos estressantes durante o período de gravidez; e para Ceni, jovens e infantes segundo a disponibilidade de alimentos.

Podemos sugerir extensões dessas interpretações. Em relação aos *Cebus nigritus* do PECB, o cortisol varia sazonalmente: em machos adultos dominantes durante o período de procriação; em fêmeas grávidas submetidas a eventos estressantes; e em machos subordinados, jovens e infantes quando há baixa disponibilidade de alimentos.

R2. O cortisol de Benjamim, Olívia, Ceni, jovens e infantes, não ultrapassa os níveis de Homeostase Reativa, sendo que a faixa de Homeostase Reativa de Ceni, jovens e infantes é menor. Apenas os níveis de cortisol da fêmea adulta Ruiva apresentaram concentrações de Sobrecarga Homeostática, indicando que essa resposta poderia se tornar patológica se sustentada.

R3. Ao aplicarmos nossos dados aos Modelos Gráficos, os erros das médias mensais de MC representaram, em geral, a maior variação do mediador fisiológico, enquanto a variação circadiana amenizou as diferenças mensais encontradas. Por exemplo, no Modelo Gráfico de machos adultos, a diferença encontrada entre os meses de dezembro e abril é amenizada se considerarmos a variação circadiana esperada para a categoria. Por outro lado, para indivíduos ou categorias com poucas amostras, como Ceni, a variação circadiana representou a maior parte da variação encontrada.

Segundo Romero e colaboradores (2009), os Modelos Gráficos não requerem o detalhamento dos mecanismos fisiológicos. Dessa forma, quando partimos, por exemplo, da correlação negativa entre as médias mensais de MC de jovens e infantes com as médias mensais do consumo de frutos para o Modelo Gráfico, que propõe que o cortisol de jovens e infantes variou segundo a disponibilidade de alimentos e alcançou

valores próximos aos valores da faixa de Sobrecarga Homeostática, não esperamos que nossos dados consigam ter estabelecido por completo tal associação. De fato, nossos resultados são insuficientes para que isso ocorra.

O papel do Modelo Gráfico da Esfera de Reatividade, dessa forma, é tornar nossas sugestões mais fáceis de serem visualizadas por meio de recursos gráficos de acordo com a proposta teórica e estética de Romero e colaboradores (2009). Neste caso, mais estudos com outros grupos da mesma população, com outras populações, ou com espécies próximas, permitiriam a comparação entre os diversos Modelos Gráficos gerados. Esta comparação ajudaria a validar, ou a refutar, as idéias propostas em cada estudo, sem a necessidade do conhecimento específico dos mecanismos fisiológicos que determinaram as respostas a estressores dos indivíduos da espécie em questão.

Essa abordagem é mais comum em estudos ecológicos. Em contraste, se quiséssemos aplicar a abordagem biomédica típica (entender os mecanismos de resposta sem integrá-los para, então, construir uma hipótese de como e por que um organismo responde daquela forma, Romero et al., 2009), deveríamos aprofundar a pesquisa em relação às respostas aos eventos que consideramos estressores. Por exemplo, uma abordagem biomédica seria diminuir de forma experimental a disponibilidade de alimentos aos níveis encontrados em maio e observar se a resposta de MC de jovens e infantes apresenta a mesma variação. Concomitantemente, submeter os indivíduos a diversos estressores e verificar (por exemplo, por meio da medida da massa e da presença de parasitas no corpo) se a capacidade dos indivíduos em lidar com estressores diminuiu durante este período a ponto de levá-los a uma Sobrecarga Homeostática.

Uma vez que estudos utilizando esta abordagem são difíceis de serem realizados em ambientes selvagens, e que a maioria dos estudos em cativeiro não consegue

reproduzir todos os fatores aos quais indivíduos de vida livre estão submetidos, o Modelo Gráfico de Romero e colaboradores (2009) apresenta-se como uma alternativa.

Como resultado mais concreto da aplicação dos dados no Modelo Gráfico de Ação de Reatividade, temos a evidência de que não é possível representar a variação intra-anual de cortisol dos *Cebus nigritus* do PECB em um único Modelo Gráfico, ou seja, apenas gráficos separados conseguem refletir, com maior precisão, como o corpo dos diferentes indivíduos do grupo interagiu com o ambiente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coleta de amostras fecais, ao invés de amostras sanguíneas, foi uma decisão que visou causar a menor perturbação possível na vida do grupo selvagem que estudamos. Entretanto, a coleta de amostras fecais é bastante complicada em áreas de Mata Atlântica, preservadas como o PECB, devido à altura das árvores (que têm cerca de 30 metros) e à vegetação intermediária. Essas duas características dificultam o acesso às amostras e a identificação dos indivíduos.

Mesmo assim, nossos dados apresentaram valores de acordo com trabalhos sobre outras espécies de primatas, mamíferos e até mesmo sobre espécies de aves. Por exemplo, indivíduos de diferentes classes etárias e sexo, assim como amostras de diferentes períodos do dia, apresentaram variações nas concentrações dos metabólitos de acordo com padrões previstos em alguns destes estudos.

Os dados obtidos ajudam a compreender a fisiologia do stress e da reprodução de machos e fêmeas de *Cebus nigritus* do PECB. A Hipótese Preparatória, tema central do trabalho, pôde ser testada. Ao contrário do esperado, no entanto, a variação sazonal dos MC do grupo não apresentou uma sustentação de altos níveis durante todo o período de “seca”, refutando a hipótese inicial.

Os MC variaram sazonalmente devido a diferentes fatores para os indivíduos do grupo. O pico destes metabólitos para o macho alfa, Benjamim, ocorreu no período de procriação. Para Ruiva, o pico ocorreu durante o final do período de gravidez. Ambos os picos foram acompanhados por níveis elevados de metabólitos dos hormônios sexuais: andrógenos e progesterona, respectivamente, podendo estar relacionados aos períodos citados.

Jovens e infantes apresentaram o pico de MC durante o período de menor disponibilidade de frutos (maio), assim como o macho subordinado Ceni. A média

mensal desses metabólitos se correlacionou negativamente com o forrageamento por frutos das categorias. Estes dados indicam que - embora não tenhamos observado uma continuidade sustentada de altos níveis de metabólitos de cortisol durante todo o inverno – a disponibilidade de comida deve ser considerada como um fator importante para a variação sazonal de glucocorticóides de macacos-prego selvagens da Mata Atlântica.

Além disso, aplicamos nossos dados aos modelos mais atuais de estudo da variação sazonal de GCs em populações de vida livre (Modelo Gráfico da Esfera de Reatividade e Modelagem das necessidades energéticas), mostrando que estes modelos, apesar de não serem suficientes para explicar todos os resultados, podem ajudar na compreensão da fisiologia do stress das populações selvagens.

Finalmente, nosso trabalho apresentou resultados que combinam com as observações sobre a ecologia e o comportamento dos *Cebus nigritus* do PECB registradas pelos pesquisadores do Laboratório de Etologia Cognitiva do IP-USP sob a supervisão da professora Patrícia Izar, desde 2001. Embora o grupo Pimenta I apresente poucos indivíduos adultos – o que faz com que as análises sobre as repercussões da gravidez ou da posição hierárquica sejam realizadas com dados de apenas um indivíduo – os resultados, em geral, indicaram que os macacos-prego do PECB estão sujeitos a um déficit alimentar, pelo menos em parte do ano. Esta condição já havia sido sugerida devido à baixa taxa reprodutiva das fêmeas (Izar et al., 2008), ao regime de fissão-fusão do grupo (Nakai, 2007), ao tamanho da área de uso acima dos padrões da espécie e à baixa densidade populacional (Izar, 2004; Presotto, 2009). Portanto, este trabalho acrescenta um novo dado, sobre a fisiologia dos animais estudados, que corrobora as conclusões geradas por dados de observação do comportamento dos animais.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott, D. H., Keverne, E. B., Bercovitch, F. B., Shively, C. A., Mendoza, S. P., Saltzman, W., Snowdon, C. T., Ziegler, T. E., Banjevic, M., Garland, T. & Sapolsky, R. M. 2003. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior*, 43, 67-82.
- Allolio, B., Hoffman, J., Linton, E. A., Winkelmann, W., Kusche, M., Schulte, H. M. 1990. Diurnal salivary cortisol patterns during pregnancy and after delivery: relationship to plasma corticotropinreleasing hormone. *Clinical Endocrinology*, 33, 279-290.
- Altmann, J. 1974. Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour* 49, 227-265.
- Axelrod, J. & T.D. Reisine. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.
- Beattie, C.W. and Bullock, B.C. 1978. Diurnal variation of serum androgen and estradiol-17b in the adult male green monkey (*Cercopithecus* sp). *Biol. Reprod.* 19: 36-39.
- Bahr, N.I., Pryce, C.R., Döbeli, M., Martin, R.D. 1998. Evidence from urinary cortisol that maternal behavior is related to stress in gorillas. *Physiol. Behav.* 64, 429- 437.
- Bales, K.L., French, J.A., Hostetler, C.M., Dietz, J.M. 2005. Social and reproductive factors affecting cortisol levels in wild female golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *Am J Primatol* 67:25-35.
- Bardi, M., Shimizu, K., Barrett, G.M., Borgognini-Tarli, S.M., Huffman, M.A. 2003. Peripartum cortisol levels and mother-infant interactions in Japanese macaques. *Am. J. Phys. Anthropol.* 120, 298-304.
- Beletsky, L. D., Gori, D. F., Freeman, S., and Wingfield, J. C. 1995. Testosterone and polygyny in birds. In D. M. Power (Ed.), *Current Ornithology*, Vol. XII, pp.1-41. Plenum Press, New York.
- Bercovitch, F.B. 1993. Dominance rank and reproductive maturation in male rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *J. Reprod. Fertil.* 99, 113-120.
- Bercovitch, F.B., Ziegler, T.E. 2002. Current topics in primate socioendocrinology. *Annu. Rev. Anthropol.* 31, 45- 67.
- Bernstein, I. S., Rose, R. M., and Gordon, T. P. 1977. Behavioural and hormonal responses of male rhesus monkeys introduced to females in the breeding and non-breeding seasons. *Anim. Behav.* 25, 609-614
- Boinski, S. 1987. Birth synchrony in squirrel monkeys (*Saimiri oerstedii*): implications for seasonal sexual dimorphism. *Beh. Ecol. Sociobiol.*, 21: 13 - 21.
- Breuner, C.W., Greenberg, A.L. and Wingfield, J.C. 1998. Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Gen Comp Endocrinol.* 111:386-394.
- Brockman, D. K., Whitten, P. L., Richard, A. F., and Schneider, A. 1998. Reproduction in free-ranging male *Propithecus verreauxi*: The hormonal correlates of mating and aggression. *Am. J. Phys. Anthropol.* 105, 137-151.

- Byrne, G., Suomi, S.J. 1999. Social separation in infant *Cebus apella*: patterns of behavioral and cortisol response. *Int J Dev Neurosci* 17:265–274.
- Cannon, W.B. 1932. *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton & Company, inc., New York.
- Carosi, M., Heistermann, M., and Visalberghi, E. 1999. Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progesterin levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys. *Horm. Behav.* 36, 252–265.
- Carr, B. R., Parker, C. R., Jr, Madden, J. D., MacDonald, P. C. & Porter, J. C. 1981. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139, 416–422.
- Cavigelli, S.A., 1999. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Anim. Behav.* 57, 935– 944.
- Chatterton, R.T.J., Kazer, R.R., Rebar, R.W. 1991. depletion of luteal phase serum progesterone during constant infusion of cortisol phosphate in the cynomolgus monkey. *Fertil Steril* 56:547–554.
- Cilia, J. and Piper, D.C. 1997. Marmoset conspecific confrontation: an ethologically-based model of anxiety. *Pharm Biochem Behav.* 58:85–91.
- Clutton-Brock, T.H. 1989. Mammalian mating systems. *Proc R Soc B.* 235:339-372.
- Coe, C.L., Murai, J.T., Wiener, S.G., Siiteri, P.K. 1986. Rapid cortisol and corticosteroid-binding globulin responses during pregnancy and after estrogen administration in the squirrel monkey. *Endocrinology* 118, 435– 440.
- Coe, C.L., Mendoza, S.P., Davidson, J.M., Smith, E.R., Dallman, M.F., Levine, S. 1978. Hormonal response to stress in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroendocrinology* 26: 367–377.
- Creel, S., Creel, N.M., Mills, M.G.L., Monfort, S.L. 1997. Rank and reproduction in cooperatively breeding African wild dogs: behavioral and endocrine correlates. *Behav. Ecol.* 8, 298– 306.
- Creel, S., Wildt, D. E., and Monfort, S. L. 1993. Aggression, reproduction, and androgens in wild dwarf mongooses: A test of the challenge hypothesis. *Am. Nat.* 141, 816–825.
- Csapo, A.I. 1956. Progesterone “block”. *Am. J. Anat.* 98:273–291.
- Cunningham, G.R., Hirshkowitz, M., Korenman, S.G. & Karacan, I. (1990) Testosterone replacement therapy and sleep-related erections in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70, 792±797.
- Dawson, A., Howe, P.D. 1983. Plasma corticosterone in wild starlings (*Sturnus vulgaris*) immediately following capture and in relation to body weight during the annual cycle. *General and Comparative Endocrinology* 51, 303–308.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Cascio, C.S., Darlington, D.N., Jacobson, L., Levin, N. 1987. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog. Horm. Res.* 43, 113–173.

- Darlington, D.N., Chew, G., Ha, T., Keil, L.C., Dallman, M.F. 1990a. Corticosterone, but not glucose, treatment enables fasted adrenalectomized rats to survive moderate hemorrhage. *Endocrinology* 127, 766–772.
- Darlington, D.N., Neves, R.B., Ha, T., Chew, G., Dallman, M.F. 1990b. Fed, but not fasted, adrenalectomized rats survive the stress of hemorrhage and hypovolemia. *Endocrinology* 127, 759–765.
- Darwin, C. 1871. *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*, 1st ed. Murray, London.
- Denny, W.B., Valentine, D.L., Reynolds, P.D., Smith, D.F., Scammell, J.G. 2000. Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology*;141:4107–4113.
- Dettmer, E.L., Phillips, K.A., Rager, D.R., Bernstein, I.S., Fragaszy, D.M. 1996. Behavioral and cortisol responses to repeated capture and venipuncture in *Cebus apella*. *Am J Primatol* 38:357–362.
- Di Bitetti, M. S. and Janson, C. H. 2000. When will the stork arrive? Patterns of birth seasonality in Neotropical Primates. *Am. J. Primatol.*, 50: 109–130.
- Dias, A.C., Custodio Filho, A., Franco, G.A.D.C., Couto, H.T.Z. 1995. Estrutura do componente arbóreo em um trecho de floresta pluvial atlântica secundária – Parque Estadual Carlos Botelho. *Revista do Instituto Florestal*, 7 (2): 125 – 155.
- Dixson, A.F. 1979. Androgens and aggressive behavior in primates: a review. *Aggress Behav* 6:37–67.
- Dixson, A. F. 1998. *Primate Sexuality: Comparative Studies of the Monkeys, Apes and Human Beings*. Oxford University Press, Oxford.
- Dunlap, K.D., Schall, J.J. 1995. Hormonal alterations and reproductive inhibition in male fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) infected with the malarial parasite *Plasmodium mexicanum*. *Physiol. Zool.* 68, 608–621.
- Eberhart, J.A., Keverne, E.B., Meller, R.E. 1980. Social influences on plasma testosterone levels in male talapoin monkeys. *Horm Behav* 14:247–266.
- Ferreira, R.G., Izar, P., Lee, P.C. 2006. Exchange, affiliation and protective interventions in semifree-ranging brown capuchin monkeys (*Cebus apella*). *American Journal of Primatology* 68: 765–776.
- Fragaszy, D. A., Visalberghi, E., Fedigan, L. M. 2004. *The Complete Capuchin: The biology of the Genus Cebus*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fragaszy, D. M., & Boinsky, S. 1995. Patterns of individual diet choice and efficiency of foraging in wedge-capped capuchin monkeys (*Cebus olivaceus*). *Journal of Comparative Psychology*, 109 (4): 339–348.
- Frankel, A.I. and Ryan, E.L. 1981. Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. *Biol Reprod* 24:491–495.
- Free, M., Tillson, S. 1973. Secretion rate of testicular steroids in conscious and halothane-anesthetized rat. *Endocrinology* 93, 874– 879.

- Genazzani, A. R., Lemarchand-Béraud, T., Aubert, M. L., and Felber, J. P. 1975. Pattern of plasma ACTH, hGH, and cortisol during menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 431–437.
- Girard, I., and Garland, T., Jr. 2002. Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *Journal of Applied Physiology*, 92, 1553–1561.
- Goldin, B.R., Adlercreutz, H., Gorbach, S.L., Warram, J.H., Dwyer, J.T., Swenson, L., Woods, M.N. 1981. Effect of diet on excretion of estrogen and pre- and post-menopausal woman. *Cancer Research* 41, 3771–3773.
- Goldin, B.R., Adlercreutz, H., Gorbach, S.L., Warram, J.H., Dwyer, J.T., Swenson, L., Woods, M.N. 1982. Estrogen excretion patterns and plasma levels in vegetarian and omnivorous women. *New England Journal of Medicine* 307, 1542–1547.
- Gordon, T. P., Bernstein, I. S., and Rose, R. M. 1978. Social and seasonal influences on testosterone secretion in the male rhesus monkey. *Phys. Behav.* 21, 623–627.
- Gouzoules, S. and Gouzoules, H. 1987. Kinship, in: Smuts, B.B., Cheney, D.L., Seyfarth, R.M., Wrangham, R.W., Struhsaker, T.T. (Eds.), *Primate Societies*, University of Chicago Press, Chicago, pp. 299–305.
- Goymann, W., East, M.L., Wachter, B., Höner, O.P., Möstl, E., Vant Hof, T.J., Hofer, H. 2001. Social, state-dependent and environmental modulation of faecal corticosteroids levels in free-ranging female spotted hyenas. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 268, 2453–2459.
- Goymann, W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validations, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 35–53.
- Gregory, L.F., Schmid, J.R., 2001. Stress responses and sexing of wild Kemp's Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys kempii*) in the Northeastern Gulf of Mexico. *General and Comparative Endocrinology* 124, 66–74.
- Groves, C. P. 2001. *Primate taxonomy*. Washington, DC, Smithsonian Institution Press.
- Gunst, N., Boinsky, S. and Frigaszy, D.M. 2008. Acquisition of foraging competence in wild brown capuchins (*Cebus apella*), with special reference to conspecifics' foraging artefacts as an indirect social influence. —*Behaviour* 145: 195–229.
- Haluska, G.J., Cook, M.J. and Novy, M.J. 1997. Inhibition and augmentation of progesterone production during pregnancy: effects on parturition in rhesus monkeys. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176,682–691.
- Harlow, H.J., Beck, T.D.I., Walters, L.M., Greenhouse, S.S., 1990. Seasonal serum glucose, progesterone, and cortisol levels of black bears (*Ursus americanus*). *Canadian Journal of Zoology* 68, 183–187.
- Heath, J.A., Dufty Jr., A.M. 1998. Body condition and the adrenal stress response in captive American kestrel juveniles. *Physiological Zoology* 71, 67–73.
- Hennessy, M.B. and S. Levine. 1978. Sensitive pituitary-adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol. Behav.* 21: 295–297.

- Hess, D.L., Spies, H.G. and Hendrickx, A.G. 1981. Diurnal steroid patterns during gestation in the rhesus macaque: Onset, daily variation, and the effects of dexamethasone treatment. *Biol. Reprod.* 24:609–616.
- Herndon, J. G., Mindi, L. B., Nordmeyer, D. L., and Turner, J. J. 1996. Seasonal testicular function in male rhesus monkeys. *Horm. Behav.* 30, 266–27.
- Hermus, A.R. and Sweep, C.G. 1990. Cytokines and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 37:867–871.
- Holekamp, K. E., and Smale, L. 1998. Dispersal status influences hormones and behavior in the male spotted hyena. *Horm. Behav.* 33, 205–216.
- Hood, L.C., Boersma, P.D., Wingfield, J.C., 1998. The adrenocortical response to stress in incubating magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Auk* 115, 76–84.
- Houck, L. D., and Woodley, S. K. 1994. Field studies of steroid hormones and male reproductive behaviour in amphibians. In H. Heatwole and B. K. Sullivan (Eds.), *Amphibian Biology*, Vol. II, pp. 677–703. Surrey Beatty & Sons, Australia.
- Huber, S., Palme, R., Arnold, W. 2000. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 48– 54.
- Izar, P., Verderane, M.P., Visalberghi, E., Ottoni, E.B., Gomes De Oliveira, M., Shirley, J., Fragaszy, D. 2006. Cross-genus adoption of a marmoset (*Callithrix jacchus*) by wild capuchin monkeys (*Cebus libidinosus*): case report. *Am J Primatol.* 68(7):692-700.
- Izar, P. 1994. Análise da estrutura social de um grupo de macacos-prego (*Cebus apella*) em condições de semi-cativeiro. Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, SP.
- Izar, P. 2004. Female social relationship of *Cebus apella nigrinus* in a Southeastern Atlantic forest: an analysis through ecological models of primate social evolution. *Behaviour*, 141: 71 - 99.
- Izar, P., Stone, A., Carnegie S. e Nakai, E. 2008. Sexual Selection, Female Choice and Mating Systems, in: South American Primates: Testing new theories in the study of primate behavior, ecology, and conservation. Springer Press.
- Izar, P. and Ferreira, R. G. 2005. Socioecologia de macacos-prego (*Cebus apella*) selvagens e aprovisionados: Uma análise comparativa. In: XI Congresso Brasileiro De Primatologia, 2005, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: PUCRS, p. 38, B-029.
- Izawa, K. 1980. Social behaviour of wild black-capped capuchin (*Cebus apella*). *Primates*, 21: 443 - 467.
- Janson, C. H. 1984. Female choice and mating system of brown capuchin monkey *Cebus apella* (Primates: Cebidae). *Zeitschrift fuer Tierpsychologie*, 65(3), 177–200.
- Janson, C. H. 1986. The mating system as a determinant of social evolution in capuchin monkeys (*Cebus*). In J. G. Else and P. C. Lee (Eds.), *Primate Ecology and Conservation*, pp. 169–179. Cambridge University Press, New York.

- Janson, C.H. and Robinson, J.G. 1987. Capuchins, Squirrel Monkeys, and Atelines: Socioecological Convergence with Old World Primates. Em *Primate Societies*. B.B. Smuts, D.L.
- Janson, C. H. and van Schaik, C. P. 1993: Ecological risk aversion in juvenile primates: slow and steady wins the race. In: *Juvenile Primates* (Pereira, M. E. & Fairbanks, L. A., eds). Oxford Univ. Press, New York, pp. 57—74. Cheney, R.M. Seyfarth, R.W. Wrangham & T.T. Struhsaker, eds. University of Chicago Press, Chicago.
- Johnson, E.O., Kamilaris, T.C., Carter, C.S., Calogero, A.E., Gold, P.W., Chrousos, G.P. 1996. The biobehavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). *Biol Psychiatry*. 40:317–337.
- Johnson, S. E. and Bock, J. 2004: Trade-offs in skill acquisition and time allocation among juvenile chacma baboons. *Human. Nature*. 15, 45-62.
- Jolly, A. 1985. *The Evolution of Primate Behavior*, 2nd ed. Macmillan, New York.
- Jones, M.T., Gillham, B. 1988. Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/B-lipotrophic hormone. *Physiol. Rev.* 68, 743–818.
- Kalra, P.S. and Kalra, S.P. 1977. Circadian periodicities of serum androgens, progesterone, gonadotropins and luteinizing hormone-releasing hormone in male rats: the effects of hypothalamic differentiation, castration and adrenalectomy. *Endocrinology* 101, 1821–1827.
- Karen, L., Bales Jeffrey, A. French, Jennifer McWilliams, Reagan A. Lake and James M. Dietz. 2006. Effects of social status, age, and season on androgen and cortisol levels in wild male golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *Hormones and Behavior*, Volume 49: 88-95.
- Keller-Wood, M.E. and Dallman, M.F. 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5:1–24
- Ketterson, E.D., Nolan Jr., V. 1999. Adaptation, exaptation, and constraint: a hormonal perspective. *Am. Nat.* 154, S4–S25.
- Ketterson, E.D., Nolan Jr., V., Wolf, L., Ziegenfus, C., Dufty Jr., A.M., Ball, G.F., Johnsen, T. 1991. Testosterone and avian life histories: the effect of experimentally elevated testosterone on corticosterone and body mass in dark-eyed juncos. *Horm. Behav.* 25, 489–503.
- Keverne, E.B., Meller, R.E., Eberhart, A. 1982. Dominance and subordination: concepts or physiological states? In: Chiarelli AB, Corruccini RS (eds) *Advanced views in primate biology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 81–94.
- Khan, M.Z., Altmann, J., Isani, S.S., Yu, J., 2002. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *General and Comparative Endocrinology* 128, 57–64.
- Kime, D.E., Vinson, G.P., Major, P.W., Kirkpatrick, R., 1980. Adrenal-gonad relationships, in: Jones, C., Henderson, I.W. (Eds.), *General Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*, Vol. I. Academic Press, New York, pp. 183–264.
- Kling A, Lloyd R, Tachiki K, Prince H, Klimenko V, Korneva E. 1992. Effects of social separation on immune function and brain neurotransmitters in Cebus monkeys (*Cebus apella*). *Ann N Y Acad Sci* 650:257–261.
- Klosterman, L.L., Murai, J.T., Siiteri, P.K. 1986. Cortisol levels, binding, and properties of corticosteroid-binding globulin in the serum of primates. *Endocrinology*. 118:424–434.

Klukowski, M., and Nelson, C. E. 1998. The challenge hypothesis and seasonal changes in aggression and steroids in male northern fence lizards (*Sceloporus undulatus hyacinthinus*). *Horm. Behav.* 33,197–204.

Kraus, C., Heistermann, M., Kappeler, P.M. 1999. Physiological suppression of sexual function of subordinate males: a subtle form of intrasexual competition among male sifakas (*Propithecus verreauxi*). *Physiol. Behav.* 66, 855– 861.

Kriegsfeld, L. J. e Silver, R. 2006. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything, *Hormones and Behavior*, 557-574.

Kriesten, K. & Murawski, U. 1988. Concentrations of serum cortisol, progesterone, estradiol-17b, cholesterol and cholesterol ester in the doe during the reproductive stadium, in the fetal serum, in the amniotic fluid and in the milk of rabbits, as well as correlations between these parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90A, 413–420.

Kwan, M., Greenleaf, W.J., Mann, J., Crapo, L. & Davidson, J.M. (1983) The nature of androgen action on male sexuality: a combined laboratory-self-report study on hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 57, 557±562

Lahoz, M.M., Nagle, C.A., Porta, M. 2007. Cortisol response and ovarian hormones in juvenile and cycling female Cebus monkeys: effect of stress and dexamethasone. *Am J Primatol.*69:551–561.

Levine, S. 1987. Psychobiologic consequences of disruption in mother-infant relationships. In Krasnegor N, Blass E, Hofer M, Smotherman W (eds), *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. New York: Academic Press, pp 359-376.

Levine, S. 2005. Stress: an historical perspective. In: Steckler, T., et al. (Ed.), *Handbook of Stress and the Brain*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 3–23.

Levine, S., Coe, C., Wiener, S.G. 1989. Psychoneuroendocrinology of stress—a psychobiological perspective. In: Brush, F.R., Levine, S. (Eds.), *Psychoendocrinology*. Academic Press, New York, pp. 341– 377.

Le Moal, M. 2007. Historical approach and evolution of the stress concept: a personal account. *Psychoneuroendocrinology* 32, S3–S9.

Lee, P. C. 1996. The meanings of weaning: growth, lactation, and life history. *Evolutionary Anthropology*, 5, 87–89.

Lindner, H.R. 1972. Enterohepatic circulation and patterns of urinary excretion of cortisol metabolites in the ewe. *J. Endocrinol.* 52: xix–xx.

Linn, G., Mase, D., LaFrancois, D., O’Keeffe, R., and Lifshitz, K. 1995. Social and menstrual cycle phase influences on the behavior of group-housed Cebus apella. *Am. J. Primatol.* 35, 41–57.

Lynch, J. W. 1998. Mating behavior in wild tufted capuchins (*Cebus apella nigritus*) in Brazil’s Atlantic forest. *Am. J. Phys. Anthropol.* supplement 26, 153.

Lynch, J. W. 2001. Male behavior and endocrinology in wild tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigritus*. Ph.D. thesis, University of Wisconsin—Madison, Madison.

- Lynch, J.W., Ziegler, T.E., Strier, K.B. 2002. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigratus*. *Hormones and Behavior* 41, 275–287.
- Lynch, J.W., Khan, M.Z., Altmann, J., Njahira, M.N., Rubenstein, N. 2003. Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *General and Comparative Endocrinology* 132, 264–271.
- Lockwood, C. J., Radunovic, N., Nastic, D., Petkovic, S., Aigner, S. and Berkowitz, G. S. 1996. Corticotropin-releasing hormone and related pituitary-adrenal axis hormones in fetal and maternal blood during the second half of pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*, 24, 243–251.
- McLachlan, R. I., Wreford, N. G., O'Donnell, O., de Krester, D. M., and Robertson, D. M. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosterone and FSH. *J. Endocrinol.* 148, 1–9.
- Manogue, K.R. 1975. Dominance status and adrenocortical reactivity to stress in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Primates* 14, 457–463.
- Marler, C. A., and Moore, M. C. 1988. Evolutionary costs of aggression revealed by testosterone manipulations in free-living male lizards. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 23, 21–26.
- Marra, P.P., Lampe, K.T., Tedford, B.L., 1995. Plasma corticosterone levels in two species of *Zonotrichia* sparrows under captive and free-living conditions. *Wilson Bulletin* 107, 296–305.
- Mathies, T., Felix, T.A., Lance, V.A., 2001. Effects of trapping and subsequent short-term confinement stress on plasma corticosterone in the brown treesnake (*Boiga irregularis*) on Guam. *General and Comparative Endocrinology* 124, 106–114.
- Mason, G. 1998. The physiology of the hunted deer. *Nature* 3- 91, 22.
- McEwen, B.S. and Wingfield, J.C. 2003a. Response to commentaries on the concept of allostasis. *Horm. Behav.* 43, 28–30.
- McEwen, B.S. and Wingfield, J.C. 2003b. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2–15.
- Meisel, R. L., and Sachs, B. D. 1994. The physiology of male sexual behavior. In E. Knobil and J. D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed., pp. 3–105. Raven Press, New York.
- Millspaugh, J.J. and Washburn, B.E. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138: 189–199.
- Millspaugh, J.J., Washburn, B.E., Milanick, M.A., Beringer, J., Hansen, L.P., Meyer, T.M., 2002. Noninvasive techniques for stress assessment in white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin* 30, 899–907.
- Millspaugh, J.J., Washburn, B.E., Milanick, M.A., Slotow, R., van Dyk, G., 2003. Effects of heat and chemical treatments on fecal glucocorticoid measurements: implications for sample transport. *Wildlife Society Bulletin* 31, 399–406.

- Mittermeier, R.A., Coimbra-Filho, A.C. 1982. Distribution and Conservation of New World Primate Species used in Biomedical Research. In: *Reproduction in New World Primates*. J. Hearn, ed. MTP Press, Hingham.
- Moberg, G.P. 1985. Influence of stress on reproduction. In: Moberg, G.P. (Ed.), *Animal Stress*. American Physiological Society, Bethesda, MD, p. 245.
- Möstl, E. and R. Palme. 2002. Hormones as indicators of stress. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 67–74.
- Moore, F. and Orchinik, M. 1994. Membrane receptors for corticosterone: a mechanism for rapid behavioral responses in an amphibian. *Horm Behav* 28:512–519
- Mulay, S., Giannopoulos, G. and Solomon, S. 1973. Corticosteroid levels in the mother and fetus of the rabbit during gestation. *Endocrinology*, 93, 1342–1348.
- Muller, M.N., Wrangham, W.W. 2004. Dominance, cortisol and stress in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 55, 332– 340.
- Munro, C.J. and Stabenfeldt, G.H. 1984. Development of a microtiter plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol.* 101:41-9.
- Munro C. J. Lasley B. 1988. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. In: Albertson BD, Haseltine FP, eds. *Non-radiometric assays: Technology and application in polypeptide and steroid hormone detection*. New York: Alan R Liss: 289-329.
- Nakai, E. S. 2007. Fissão-fusão em *Cebus nigratus*: flexibilidade social com estratégia de ocupação de ambientes limitantes. Dissertação (Mestrado em Psicologia -Psicologia Experimental) - Universidade de São Paulo.
- Negreiros, O.C., Custodio Filho, A.; Dias, A.C., Franco, G.A.D.C.; Couto, H.T.Z.; Vieira, M.G.; Moura Netto, B.V. 1995. Análise estrutural de um trecho de floresta pluvial tropical, Parque Estadual de Carlos Botelho, Núcleo Sete Barras (SP - Brasil). *Revista do Instituto Florestal, São Paulo*, 7, 1 – 33.
- Nichols, D. J., and Chevins P. F. D. (1981). Plasma corticosterone fluctuations during the oestrous cycle of the house mouse. *Experientia* 37, 319–320.
- Norjavaara, E., Anharberg, C. and Albertson-Wikland, K. 1996. Diurnal rhythm of 17 β -estradiol secretion throughout pubertal development in healthy girls: Evaluation by a sensitive radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:4095–4102.
- Nunes, S., Fite, J.E., French, J.A. 2000. Variation in steroid hormones associated with infant care behaviour and experience in male marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Anim. Behav.* 60, 857–865.
- O'Reilly, M. 1995. Ecological basis of endocrine phenomena: field studies of Scolopacidae as model systems. University of Washington Thesis, Department of Zoology, Seattle.
- Omura, T. and Morohashi, K. 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53 19–25.
- Orchinik, M., Murray, T., Moore, F. 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252:1848–1851

- Orth, D.N., Kovacs, W.J. 1998. The adrenal cortex, in: Wilson, I.L., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen, P.R. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th edition. Saunders, Philadelphia, pp. 517–664.
- Palme, R. *et al.* 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040.
- Pepe, G.J., Johnson, D.K., Albrecht, E.D., 1982. The effects of estrogen on cortisol metabolism in female baboons. *Steroids* 39, 471– 477.
- Perachio, A.A., Alexander, M., Marr, L.D. and Collins, D.C. 1977. Diurnal variations of serum testosterone levels in intact and gonadectomized male and female rhesus monkeys. *Steroids* 29:21–33.
- Peternelli, L. C. S. 2009. Diferenças sexo/etárias do Forrageamento de *Cebus nigrinus* em área de Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado em Psicologia -Psicologia Experimental) - Universidade de São Paulo.
- Phillips, J. G., and Poolsanguan, W. 1978. A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *J. Endocrinol.* 77, 283–291.
- Phillips, K., Bernstein, I., Dettmer, E., Devermann, H., and Powers, M. 1994. Sexual behavior in brown capuchins (*Cebus apella*). *Int. J. Primatol.* 15(6), 907–917.
- Plant, T.M. 1981. Time courses of concentration of circulating gonadotropin, prolactin, testosterone, and cortisol in adult male rhesus monkeys throughout the 24 h lightdark cycle. *Biol. Reprod.* 25:244–252.
- Presotto, A. 2009. Mapas cognitivos de primatas: análise de movimentos e rotas de *Cebus nigrinus* apoiada por sistemas de informação geográfica. Tese (Doutorado em Geografia – Geografia Física) - Universidade de São Paulo.
- Pryce, C.R., Palme, R., Feldon, J. 2002. Development of pituitary-adrenal endocrine function in the marmoset monkey: infant hypercortisolism is the norm. *J Clin Endocrinol Metab* 87:691–699.
- Pugeat, M.M., Chrousos, G.P., Nisula, B.C., Loriaux, D.L., Brandon, D., Lipsett, M.B. 1984. Plasma cortisol transport and primate evolution. *Endocrinology.* 115:357–361.
- Rakic, Z., Starcevic, V., Starcevic, V.P. and Marinkovic, J. 1997. Testosterone treatment in men with erectile disorder and low levels of total testosterone in serum. *Archives of Sexual Behavior*, 26, 495±504.
- Raminelli, J.L.F., de Sousa, M.B.C., Cunha, M.S., Barbosa, M.F.V., 2001. Morning and afternoon patters of fecal cortisol excretion among reproductive and non-reproductive male and female common marmosets, *Callithrix jacchus*. *Biological Rhythm Research* 32, 159–167.
- Raps, D., Barthe, P. L., and Desaulles, P. A. 1971. Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in normal female rats. *Experientia* 27, 339–340.
- Reburn, C. J., and Wynne-Edwards, K. E. 1999. Hormonal changes in males of a naturally biparental and a uniparental mammal. *Horm Behav* 35, 163–176.

- Robinson, P.A., Hawkey, C., Hammond, G.L. 1985. A phylogenetic study of the structural and functional characteristics of corticosteroid binding globulin in primates. *J Endocrinol.* 104:251–257.
- Robinson, J. G. and Janson, C. H. 1987. Capuchins, squirrel monkeys, and atelines: Socioecological convergence with Old World primates. In B. Smuts, D. Cheney, R. Seyfarth, R. Wrangham, and T. Struhsaker (Eds.), *Primate Societies*, pp. 69–82. University of Chicago Press, Chicago.
- Romero, L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticóide 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.
- Romero, L.M., Dickens, M.J., Cyr, N.E. 2009. The reactive scope model – a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm Behav* 55:375–89.
- Rose, R. M. 1985. Psychoendocrinology. In: Williams Textbook of Endocrinology (Wilson, J. D. & Foster, D. W., eds.), pp. 653–681. W. B. Saunders, Philadelphia, PA.
- Rowell, T.E. 1972. *Social Behaviour of Monkeys*. Harmondsworth: Penguin.
- Rylands, A. B., Kierulff, M. C., Mittermeier, R. A. 2005. Notes on the Taxonomy and Distributions of the Tufred Capuchin Monkeys (*Cebus*, Cebidae) of South America. *Ludiana*, 6, 97-110.
- Saltzman, W., Schultz-Darken, N.J., Wegner, F.H., Wittwer, D.J., Abbot, D.H. 1998. Suppression of cortisol levels in subordinate female marmosets: reproductive and social contributions. *Horm Behav* 33:58–74.
- Saltzman, W., Schultz-Darken, N.J., Scheffler, G., Wegner, F.H. 1994. Social and reproductive influences on plasma cortisol in female marmoset monkeys. *Physiol. Behav.* 56, 801– 810.
- Sapolsky, R.M. 1983a. Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative-feedback sensitivity. *Endocrinology*, 113, 2263–2268.
- Sapolsky, R.M. 1983b. Endocrine aspects of social instability in the olive baboon. *American Journal of Primatology*, 5, 365–372.
- Sapolsky, R.M. 1996. Stress glucocorticoids and damage to the nervous system. The current state of confusion. *Stress* 1:12
- Sapolsky, R.M. 1996. Why stress is bad for your brain. *Science* 273:749–750.
- Sapolsky, R.M. and Krey, L. 1988. Stress-induced suppression of LH concentrations in wild baboons: role of opiates. *Endocrinology* 66:722–727
- Sapolsky, R.M. and Ray J. 1989. Styles of dominance and their physiological correlates among wild baboons. *Am J Primatol.* 18:1–13.
- Sapolsky, R.M. 1990. Adrenocortical function, social rank and personality among wild baboons. *Biol Psychiatry*;28:862–878.

- Sapolsky, R.M. 1985. Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids. *Endocrinology*; 116:2273-2278.
- Sapolsky, R.M. 1982. The endocrine stress-response and social status in the wild baboon. *Horm Behav*;15:279-292.
- Sapolsky, R.M. 1994. *Why Zebras Don't Get Ulcers: A Guide to Stress, Stress-Related Diseases and Coping*. W.H., Freeman. New York.
- Sapolsky, R.M. 1987. Stress, social status, and reproductive physiology in free-living baboons. In: Crews, D. (Ed.), *Psychobiology of Reproductive Behavior: An Evolutionary Perspective*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 291-322.
- Sapolsky, R.M. 1992a. Cortisol concentrations and the social significance of rank instability among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology* 17, 701-709.
- Sapolsky, R.M. 1992b. *Stress, the Aging Brain, and the Mechanisms of Neuron Death*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Sapolsky, R.M., 1993. The physiology of dominance in stable versus unstable social hierarchies, in: Mason, W.A., Mendoza, S.P. (Eds.), *Primate Social Conflict*. State University of New York Press, New York, pp. 171-204.
- Sapolsky, R.M. 2002. Endocrinology of the stress-response. In: Becker, J., Breedlove, S., Crews, S., McCarthy, M. (Eds.), *Behavioral Endocrinology*, second ed. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 409- 450.
- Sapolsky, R.M., L.M. Romero & A.U. Munck. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Rev.* 21: 55-89.
- Sapolsky, R.M. and Meaney, M. 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res. Rev.* 11 (65-76).
- Scammell, J.G., Denny, W.B., Valentine, D.L., Smith, D.F. 2001. Over-expression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen Comp Endocrinol.* 124:152-165.
- Schimpl, P. A., Mendoza, S. P., Saltzman, W., Lyons, D. M., and Mason, W. A. 1996. Seasonality in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Physiol. Behav.* 60, 1105-1113.
- Schoech, S.J., Ketterson, E.D., Nolan, V. 1999. Exogenous testosterone and the adrenocortical response in dark-eyed juncos. *Auk* 116, 64-72.
- Schulkin, J. 2003. *Rethinking Homeostasis: Allostatic Regulation in Physiology and Pathophysiology*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Selye, H. 1936a. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 1-38:32.
- Selye, H. 1936b. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* 17:234-248.
- Selye, H. 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clin. Endocrinol.* 6, 117-230.

- Shively, C. and Kaplan, J. 1984. Effects of social factors on adrenal weight and related physiology of *Macaca fascicularis*. *Physiol Behav* 33:777-782.
- Smith, C.J., Norman, R.L., 1987. Influence of the gonads on cortisol secretion in female rhesus macaques. *Endocrinology* 121, 2192– 2198.
- Smith, G.T., Wingfield, J.C., Veit, R.R. 1994. Adrenocortical response to stress in the common diving petrel, *Pelecanoides urinatrix*. *Physiol. Zool.* 67, 526–537.
- Smith, R., Thomson, M. 1991. Neuroendocrinology of the hypothalamo- pituitary-adrenal axis in pregnancy and the puerperium. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 5, 167–186.
- Smith, T.E., French, J.A. 1997a. Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhli*). *Physiol. Behav.* 62:225-232.
- Smith, T.E., French, J.A. 1997b. Social and reproductive conditions modulate urinary cortisol excretion in black tufted-ear marmosets (*Callithrix kuhli*). *Am. J. Primatol.* 42:253-267.
- Smith, T.E., Schaffner, C.M., French, J.A. 1997. Social and developmental influences on reproductive function in female Wied's black tufted-ear marmosets (*Callithrix kuhli*). *Horm. Behav.* 31:159-168.
- Sousa, M.B.C., Ziegler, T.E. 1998. Diurnal variation on the excreted patterns of fecal steroids in common marmosets (*Callithrix jacchus*) females. *Am. J. Primatol.* 46, 105– 117.
- Stavisky, R.C., Watson, S.L., Anthony, M.S., Manuck, S.B., Adams, M.R., Kaplan, J.R. 2003. Influence of estradiol on cortisol secretion in ovariectomized cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Primatol.* 60, 17–22.
- Sterling, P., Eyer, J. 1988. Allostasis a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher, S., Reason, J. (Eds.), *Handbook of Life Stress Cognition and Health*. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 629–650.
- Stern, J. 1970. Responses of male rats to sex odors. *Physiol. Behav.* 5, 519–524.
- Strier, K. B., Ziegler, T. E., and Wittwer, D. J. 1999. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (*Brachyteles arachnoides*). *Horm. Behav.* 35, 125–134.
- Strier, K.B. 1989. Effects of patch size on feeding associations in muriquis (*Brachyteles arachnoides*). *Folia Primatol.* 52, p. 70-77.
- Strier, K. B. 1991. Diet in one group of woolly spider monkeys, or muriquis (*Brachyteles arachnoides*). *Am. J. Primatol.* 23, 113–126.
- Strier, K.B. 1996. Reproductive ecology of female muriquis (*Brachyteles arachnoides*). In *Adaptive radiations of neotropical primates*. Norconk *et al.*, eds. Plenum Press, New York.
- Strier, K. B. 1997. Mate preferences of wild muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*): Reproductive and social correlates. *Folia Primatol.* 68, 120–133.
- Strier, K.B. 2003. *Primate Behavior Ecology*. Boston, Allyn and Bacon, 422p.

- Suomi, S. 1987. Genetic and maternal contributions to individual differences in rhesus monkey biobehavioral development. In Krasnegor N, Blass E, Hofer M, Smotherman W (eds), *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. New York: Academic Press, pp 87-98.
- Taira, J. 2007. Consumo de palmito juçara (*Euterpe edulis* Mart.) por macacos-prego (*Cebus nigritus*): estratégia de forrageamento ótimo ou requinte de um gourmet? Dissertação (Mestrado em Psicologia (Psicologia Experimental)) - Universidade de São Paulo.
- Taylor, W. 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitam. Horm.* 29: 201–285.
- Terborgh, J. 1983. Five New World monkeys. Princeton University Press, Princeton.
- Terio, K.A., Brown, J.L., Moreland, R., Munson, L., 2002. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the Cheetah. *Zoo Biology* 21, 215–222.
- Torres-Farfan, C., Valenzuela, F.J., Ebensperger, R., Mendez, N., Campino, C., Richter, H.G., Valenzuela, G.J., Seron-Ferre, M. 2008. Circadian cortisol secretion and circadian adrenal responses to ACTH are maintained in dexamethasone suppressed capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Am J Primatol* 70:93–100.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., Palme, R., 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology* 130, 267–278.
- Touma, C. and Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of a validation. *Annals of the New York Academy of Science* 1046: 54–74.
- Torres-Farfan, C., Valenzuela, F.J., Ebensperger, R., Mendez, N., Campino, C., Richter, H.G., Valenzuela, G.J., Seron-Ferre, M. 2008. Circadian cortisol secretion and circadian adrenal responses to ACTH are maintained in dexamethasone suppressed capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Am J Primatol* 70:93–100.
- Trivers, R.L. 1972. Parental investment and sexual selection. In B. Campbell (Ed.), *Sexual selection and the descent of man, 1871-1971* (pp. 136-179). Chicago, IL: Aldine.
- van Schaik, C.P., van Noordwijk, M.A., van Bragt, T., Blakenstein, M.A., 1991. A pilot study of the social correlates of levels of urinary cortisol, prolactin, and testosterone in wild long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Primates* 32, 345– 356.
- Vleck, C. M., and Brown, J. L. 1999. Testosterone and social and reproductive behavior in *Aphelocoma* jays. *Anim. Behav.* 58, 943–951.
- Von Holst, D. 1998. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Adv. Study Behav.* 27: 1–131.
- Wasser, S.K., Papageorge, S., Foley, C., Brown, J.L., 1996. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. *General and Comparative Endocrinology* 102, 255–62.

Weingrill, T., Gray, D. A., Barrett, L. and 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.

Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M., 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14 (4), 697–706.

Whitten, P.L., D.K. Brockman and R. Stavisky. 1998. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. *Yrbk. Phys. Anthropol.* 41: 1–23.

Whittier, J.M., Corrie, F., Limpus, C., 1997. Plasma steroid profiles in nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Queensland, Australia: relationship to nesting episode and season. *General and Comparative Endocrinology* 106, 39–47.

Widmaier, E.P., Harmer, T.L., Sulak, A.M., Kunz, T.H., 1994. Further characterization of the pituitary–adrenocortical responses to stress in chiroptera. *The Journal of Experimental Zoology* 269, 442–449.

Wiebe, R. H., Williams, L. E., Abee, C. R., Yeoman, R. R., and Diamond, E. J. 1988. Seasonal changes in serum dehydroepiandrosterone, androstenedione, and testosterone levels in the squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*). *Am. J. Primatol.* 14, 285–291.

Williams-Ashman, H. G. 1988. Perspectives on the male sexual physiology of eutherian mammals. In E. Knobil and J. D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, pp. 727–751. Raven Press, NY.

Wingfield, J. C., and Farner, D. S. 1993. The endocrinology of wild species. In D. S. Farner, J. R. King, and K. S. Parkes (Eds.), *Avian Biology*, Vol. IX, pp. 163–237. Academic Press, New York.

Wingfield, J. C., Hegner, R. E., Dufty, A. M., Jr., and Ball, G. F. 1990. The “challenge hypothesis”: Theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *Am. Nat.* 136(6), 829–846.

Wingfield, J.C., Breuner, C., Jacobs, J.D., Lynn, S., Maney, D., Ramenofsky, M., Richardson, R., 1998. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “emergency life history stage.” *Am. Zool.* 38, 191–206.

Wingfield, J.C., 1994. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds, in: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*, National Research Council, Canada, Ottawa, pp. 520–528.

Wingfield, J.C., Suydam, R., Hunt, K., 1994. The adrenocortical responses in snow buntings (*Plectrophenax nivalis*) and Lapland longspurs (*Calcarius lapponicus*) at Barrow, Alaska. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 108, 299–306.

Wingfield, J. C., Jacobs, J. D., Soma, K., Maney, D. L., Hunt, K., Wisti-Peterson, D., Meddle, S., Ramenofsky, M., and Sullivan, K. 1999. Testosterone, aggression, and communication: Ecological bases of endocrine phenomena. In M. D. Hauser and M. Konishi (Eds.) *The Design of Animal Communication*, pp. 255–283. MIT Press, Cambridge, MA.

Wingfield, J.C., Romero, L.M., 2000. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates, in: McEwen, B.S. (Ed.), *Handbook of Physiology*, Section 7: The

Endocrine System, Volume 4: Coping With The Environment: Neural and Endocrine Mechanisms, Oxford University Press, Oxford, pp. 211–236.

Wingfield, J.C., Ramenofsky, M., 1999. Hormones and the behavioral ecology of stress. In: Baum, P.H.M. (Ed.), *Stress Physiology in Animals*. CRC Press, Sheffield, pp. 1– 51.

Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G.T., Okamura, H., 2001. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 292 (5515), 278–281.

Yamamoto, S., Utsu, S., Tanioka, Y., Ohsawa, N. 1977. Extremely high levels of corticosteroids and low levels of corticosteroid binding macromolecule in plasma of marmoset monkeys. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 85:398–405.

Ziegler, T.E., Scheffler, G., Snowdon, C.T. 1995. The relationship of cortisol levels to social environment and reproductive functioning in female cotton-top tamarins, *Saguinus oedipus*. *Horm Behav* 29: 407–424.

Ziegler, T. E., Scheffler, G., Wittwer, D. J., Schultz-Darken, N., Snowdon, C. T., and Abbott, D. H. 1996. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. *Biol. Reprod.* 54, 91–99.

Ziegler, T.E., Santos, C.V., Pissinatti, A. and Strier, K.B. 1997. Steroid excretion during the ovarian cycle in captive and wild muriquis, *Brachyteles arachnoides*. *Am. J. Prim.*, 42: 311 – 321

Presotto, A. 2009. Mapas cognitivos de primatas: análise de movimentos e rotas de *Cebus nigritus* apoiada por sistemas de informação geográfica. Tese (Doutorado em Geografia – Geografia Física) - Universidade de São Paulo.