

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MIKAELLY FRASSON TESTA

**Níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em indivíduos de miqui-
do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820) translocados**

Belo Horizonte

2022

MIKAELLY FRASSON TESTA

**Níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em indivíduos de miqui-
do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820) translocados**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Departamento

Clínica e Cirurgia Veterinárias

Área de Concentração

Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador

Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

Coorientador

Fabiano Rodrigues de Melo

Coorientadora

Karen Barbara Strier

Belo Horizonte

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

T342n Testa, Mikaelly Frasson, 1995 -
Níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em indivíduos de miquiqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820) translocados / Mikaelly Frasson Testa. – 2022.
100 f. il

Orientador: Marcelo Pires Nogueira de Carvalho
Coorientadores: Fabiano Rodrigues de Melo
Karen Barbara Strier

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.
Bibliografias: f. 73 a 100.

1. Animais silvestres - Teses - 2. Endocrinologia veterinária - Teses - 3. Veterinária - Teses
I. Carvalho, Marcelo Pires Nogueira de - II. Melo, Fabiano Rodrigues de - III. Strier, Karen
Barbara - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MIKAELLY FRASSON TESTA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovado(a) em 30 de novembro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Karen Barbara Strier

Dr.(a). Fabiano Rodrigues de Melo

Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme

Dr.(a). Alcides Pissinatti



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2022, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 30/11/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Barbara Strier, Usuária Externa**, em 01/12/2022, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alcides Pissinatti, Usuário Externo**, em 02/12/2022, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Rodrigues de Melo, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1930286** e o código CRC **28BC505B**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - MIKAELLY FRASSON TESTA

Às 10:00 horas do dia 30 de novembro de 2022, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

“NÍVEIS DE METABÓLITOS FECAIS DE GLICOCORTICÓIDES EM INDIVÍDUOS DE MURIQUI-DO-NORTE (BRACHYTELES HYPOXANTHUS KUHL, 1820) TRANSLOCADOS”

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinárias**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Marcelo Pires Nogueira de Carvalho**, após informar o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Marcelo Pires Nogueira de Carvalho	X	
Karen Barbara Strier	X	
Fabiano Rodrigues de Melo	X	
Fabiola de Oliveira Paes Leme	X	
Alcides Pissinatti	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2022, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 30/11/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Barbara Strier, Usuária Externa**, em 01/12/2022, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alcides Pissinatti, Usuário Externo**, em 02/12/2022, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Rodrigues de Melo, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1930249** e o código CRC **D176270B**.

*Aos meus maiores amores,
meus avós,
José Luiz e Maria da Penha*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter sido meu Porto Seguro e Rocha Firme quando minhas pernas fraquejaram e achei que não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus orientadores Marcelo Carvalho, Fabiano Melo e Karen Strier por cada correção, ensinamento, reunião e orientação. Durante todo esse tempo pude contar com os melhores profissionais para fazer este mestrado acontecer e sou privilegiada só de ter tido a oportunidade de aprender com cada um de vocês. Agradeço também a Dra. Toni Ziegler que com imensa gentileza e generosidade, se disponibilizou a me ajudar durante a etapa de extração hormonal, crucial para a execução do meu trabalho. Me sinto extremamente honrada por isto!

Muito obrigada ao Laboratório de Pesquisas Hormonais responsáveis pelas dosagens hormonais do meu mestrado, especialmente a Dra. Gabriela Martins que desde o início foi gentil e amorosa em me ajudar. Foi com quem eu tive meu primeiro contato na área de dosagens hormonais e serei eternamente grata a ela por ter sido luz em minha vida e no meu mestrado.

Gostaria de agradecer, também, à Fernanda Tabacow por toda a orientação, ajuda, ombro amigo e conselho nesta etapa. Vínculos institucionais tornam pessoas orientadores umas das outras dentro de programas de pós-graduação. Maestria, torna pessoas em nosso dia a dia, mestres em nossa vida e, a Fefê, é uma delas. Obrigada por tudo a todos vocês!

Agradeço imensamente ao Ibiti Projeto pela colaboração financeira em meu mestrado e, sobretudo, ao Muriqui Instituto de Biodiversidade, meu trabalho. Graças à competência de cada pesquisadora da MIB, graças ao apoio financeiro do projeto, às amostras de fezes coletadas, ao apoio, incentivo e orientação, eu pude desenvolver meu mestrado. Nem todos possuem a sorte de ter pessoas tão queridas trabalhando com a gente e, eu, tenho! Obrigada por tudo pessoal.

À minha família: Pais, irmãos, avós, tios e primos que são minha base e meu suporte. A conquista é tanto minha quanto de vocês que durante todo esse período, torceram pelo meu mestrado e pela minha vida. Sem vocês, eu não teria conseguido.

Aos meus amigos que são minha família também, Érika Procópio, Cecília Barreto e toda a equipe do CETAS IEF/IBAMA em Belo Horizonte que deram “nó em pingo D’água” para me ajudar em todas as etapas do meu mestrado. Me deram estrutura física, insumos, apoio logístico, realizaram muitas etapas do meu mestrado junto comigo e souberam tirar

sorrisos meus em momentos difíceis. Amo vocês eternamente. Não existiria meu mestrado sem vocês.

Aos residentes e estagiários da Escola de Veterinária da UFMG que me ajudaram em algumas etapas do mestrado e souberam me fazer rir em muitos momentos no MULTILAB. Obrigada também a professora Dra. Fabíola, responsável pelo MULTILAB, que me proporcionou uma estrutura física e equipamentos incríveis para que eu desenvolvesse parte do meu mestrado. O que ela faz e representa para Escola de Veterinária da UFMG poucos professores são capazes de fazer e ser.

Meu muito obrigada à coordenação do Mulheres Pela Primatologia que na reta final do meu mestrado, souberam ser pacientes com minha ausência. Priscila, Raiane, Marianne, Fernanda e Victória, nós nos unimos em prol de uma causa e viramos irmãs de alma. Obrigada pelo apoio, torcida e incentivo. Amo todas vocês profundamente!

Cristiane Pizzutto, Deus constantemente me ronda de pessoas boas e amorosas. Você foi uma delas. Chegou no meio de uma imensa confusão e soube me ajudar a caminhar. Me orientou informalmente em todas as etapas, corrigiu e torceu pelo meu trabalho como se fosse seu. Você é a materialização de ética, competência, veterinária e MESTRE. Meu carinho e amor por você são gigantes. Queria que todo mundo tivesse a oportunidade de tê-la como amiga e orientadora, sou muito sortuda.

Ao meu amor, Mateus Biccas. Me deu suporte, amor e compreensão em momentos de imensa dificuldade. Quando me vi perdida, ele soube ser luz, quando estive confusa, ele me deu soluções, quando estive cansada, encontrei nele alento e conforto. Ele é um parceiro incrível só de ter me conhecido e escolhido ficar em um momento tão conturbado em que me encontrava. Essa conquista não é só minha, mas, principalmente, nossa. Ao meu amor, melhor amigo e parceiro de vida, muito obrigada por tudo. Te amo cada dia mais.

A todos que conheci durante essa caminhada no mestrado, que me ajudaram direta ou indiretamente a tornar este sonho possível. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Muriquis do Ibitipoca, executado pela Muriqui Instituto de Biodiversidade (MIB) e coordenado por Msc. Fernanda Pedreira Tabacow, Dr. Fabiano Rodrigues de Melo e Msc. Marcello Nery. Possui financiamento concedido pelo Ibiti Projeto e pelo MIB. O projeto também contou com o apoio do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte (CETAS BH).

RESUMO

TESTA, M. F. **Níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em indivíduos de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820) translocados.** [Fecal glucocorticoid metabolite levels in individuals of northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820) translocated]. 2022. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

O muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) é um primata criticamente ameaçado de extinção, com menos de mil indivíduos em vida livre e apenas oito em condições *ex situ*. O fomento de pesquisas acerca de sua fisiologia, associada à sua avaliação endocrinológica em resposta a eventos sociais e comportamentais, é uma estratégia de grande valia para a conservação da espécie *in situ* e *ex situ*. A análise hormonal de esteroides em animais silvestres permite, a longo prazo, o monitoramento da função esteroidal. Os níveis de glicocorticoides, especialmente se obtido a partir de amostragem não invasiva, pode ser usado como um dos parâmetros de análise do bem-estar animal, permitindo a avaliação da resposta fisiológica às modificações ambientais. Apesar de evidências de que esses hormônios desempenham um papel relevante na regulação do metabolismo em eventos de estresse percebidos ou reais, nada se sabe sobre a influência dos fatores estressantes envolvidos em eventos de translocação e na liberação de metabólitos fecais glicocorticoides (MFG) em animais translocados. Neste contexto, o presente trabalho possuiu como objetivos avaliar as concentrações de MFG ao longo de nove meses, por meio da técnica de enzimaímoensaio em amostras fecais de indivíduos de *Brachyteles hypoxanthus ex situ* translocados de vida livre para um recinto semi-natural, e assim verificar se os eventos sócio-sexuais e de introdução de um novo indivíduo influenciaram nas concentrações fecais destes metabólitos nesses animais. Para isso, coletou-se fezes e dados comportamentais de dois machos e três fêmeas que vivem em um recinto semi-natural e foram comparados os comportamentos reprodutivos e sociais com os dados obtidos acerca dos níveis de MFG. Para a maioria dos indivíduos estudados (com exceção de uma fêmea prenhe), verificamos ausência de sazonalidade na excreção de MFG (Mann-Whitney, $p > 0,05$), altos níveis de MFG durante a gestação em uma fêmea (média de 145,4 ng/g de fezes secas) e níveis altos de MFG em uma fêmea translocada durante sua etapa de ambientação (63 dias com média de 231,7 ng/g de fezes secas). A constatação da influência negativa do recinto de aclimação e do evento de translocação nos níveis de MFG no animal transferido durante o estudo, e a

mensuração dos níveis dos MFG em muriquis-do-norte em cativeiro durante este processo, lança luz acerca de novas estratégias para translocação, indicam a necessidade de alterações no recinto de aclimatação, como o distanciamento dele de outros animais, maior dimensionamento e pontos de abrigo, para diminuição do nível de estresse nesta fase, e possibilita avaliar de que forma o cativeiro está influenciando nos MFG dos animais que já foram translocados. O nível de bem-estar dos animais translocados deve ser melhorado, incluindo estes resultados nas diretrizes de práticas de manejo e fornecendo melhorias no sistema de translocação de muriquis-do-norte. Ao mesmo tempo, com estes dados pode-se aprimorar as estratégias de conservação *ex situ* e *in situ*, tão importantes para a conservação desta espécie criticamente ameaçada.

Palavras-chave: Conservação. Endocrinologia. Primatas. Enzimaimunoensaio.

ABSTRACT

TESTA, M. F. **Fecal glucocorticoid metabolite levels in individuals of northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820) translocated.** [Níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em indivíduos de muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820)]. 2022. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

The northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*) is a critically endangered primate, with less than a thousand individuals in the wild and only eight in *ex situ* conditions. Fostering research on its physiology, associated with its endocrinological evaluation in response to social and behavioral events, is a valuable strategy for the conservation of the species *in situ* and *ex situ*. Hormonal analysis of steroids in wild animals allows long-term monitoring of steroid function. Glucocorticoid levels, especially if obtained from non-invasive sampling, can be used as one of the parameters for analyzing animal welfare, allowing the assessment of the physiological response to environmental changes. Despite evidence that these hormones play a relevant role in regulating metabolism in perceived or real stress events, nothing is known about the influence of stressors involved in translocation events and in the release of fecal glucocorticoid metabolites (MFG) in translocated animals. In this context, the present work aimed to evaluate the concentrations of MFG over nine months, using the enzyme-immunoassay technique in fecal samples of individuals of *Brachyteles hypoxanthus ex situ* translocated from free life to a semi-natural enclosure, and thus verify whether socio-sexual events and the introduction of a new individual influenced the fecal concentrations of these metabolites in these animals. For this, feces and behavioral data were collected from two males and three females living in a semi-natural enclosure and the reproductive and social behaviors were compared with the data obtained about MFG levels. For most of the individuals studied (with the exception of one pregnant female), we found absence of seasonality in MFG excretion (Mann-Whitney, $p > 0.05$), high levels of MFG during pregnancy in one female (mean of 145, 4 ng/g of dry feces) and high levels of MFG in a translocated female during her acclimatization stage (63 days with an average of 231.7 ng/g of dry feces). The finding of the negative influence of the acclimatization enclosure and the translocation event on the MFG levels in the animal transferred during the study, and the measurement of MFG levels in captive northern muriquis during this process, sheds light on new strategies for translocation, indicate the need for changes in the acclimatization

enclosure, such as distancing it from other animals, greater dimensioning and shelter points, to reduce the stress level in this phase, and makes it possible to assess how the captivity is influencing the MFG of the animals. animals that have already been translocated. The welfare level of translocated animals should be improved by including these results in management practice guidelines and providing improvements in the northern muriquis translocation system. At the same time, with these data it is possible to improve *ex situ* and *in situ* conservation strategies, so important for the conservation of this critically endangered species.

Keywords: Conservation. Endocrinology. Primates. enzyme immunoassay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da regulação dos níveis de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).	28
Figura 2 - Representação esquemática da secreção e excreção de glicocorticoides.	30
Figura 3 - Esquema ilustrando as principais etapas experimentais desde a defecação até a análise de metabólitos de hormônios esteroides fecais.	34
Figura 4 - Área completa do cativeiro Muriqui's House.	40
Figura 5 - Recinto de aclimatação em que os animais ficam após serem translocados	40
Figura 6 - Fêmea Nena	43
Figura 7 - Fêmea Ecológica.....	42
Figura 8 - Fêmea Socorro.	43
Figura 9 - Macho Bertolino	42
Figura 10 - Macho Luna.....	42
Figura 11 - Observação de um <i>Brachyteles hypoxanthus</i> durante o momento de defecação.	43
Figura 12 - Ficha utilizada durante a coleta de fezes.	44
Figura 13 - Materiais utilizados para o procedimento de preparação da matriz	45
Figura 14 - Preparação das amostras de fezes após secagem.	46
Figura 15 - Peneiragem das amostras fecais.....	46
Figura 16 - Passo a passo do procedimento de extração hormonal.....	47
Figura 17 - Etapa de lavagem e incubação das placas.....	49
Figura 18 - Finalização do procedimento de ensaimunoensaio e leitura da placa de ELISA.....	49
Figura 19 - Concentrações de MFG de todos os indivíduos do grupo estudado.....	54
Figura 20 - Concentrações de MFG da fêmea Ecológica de acordo com os períodos de gestação e pós-parto.....	55
Figura 21 - Concentrações de MFG da fêmea Socorro durante o período amostral	56
Figura 22 - Concentrações de MFG do macho Luna durante o período amostral	57
Figura 23 - Concentrações de MFG do macho Bertolino durante o período amostral.....	58
Figura 24 - Concentrações de MFG da fêmea Nena durante as fases de adaptação no recinto de aclimatação e pós-soltura na área de mata nativa dentro do recinto.....	59

Figura 25 - Níveis de MFG apresentados por cada um dos indivíduos estudados e comparação estatística entre eles.....	60
Figura 26 - Diferença nas concentrações de MFG durante a gestação e pós-parto da fêmea Ecológica e comparação estatística entre eles.	61
Figura 27 - Diferença nas concentrações de MFG durante o período da fêmea Nena no recinto de aclimatação e, posteriormente, na área de floresta nativa dentro do recinto e comparação estatística entre eles.).....	62
Figura 28 - Curva de validação do teste de paralelismo.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animais do presente estudo e seus respectivos status reprodutivos.....	41
Tabela 2 - Quantidade de amostras de fezes coletadas e período amostral de coleta de cada indivíduo.....	52
Tabela 3 - Mediana das concentrações dos MFG (ng/g de fezes secas) de todos os animais amostrados.....	60
Tabela 4 - Coeficiente de variação (CV) inter e intra ensaio das amostras.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	<i>Brachyteles hypoxanthus</i> : comportamento sociosexual	20
2.2	Aplicação da dosagem do cortisol na conservação de espécies e na avaliação de bem-estar animal.....	24
2.3	Glicocorticoides	26
2.4	Fezes como matriz biológica para dosagens hormonais.....	29
2.5	Coleta, armazenamento e extração de amostras fecais.....	32
2.6	Dosagem Hormonal.....	35
2.7	Validações hormonais	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Licenças.....	39
4.2	Local de estudo	39
4.3	Animais	40
4.4	Coleta de fezes	43
4.5	Extração Hormonal	44
4.6	Ensaio Hormonal.....	48
4.6.1	<i>Preparação das amostras para o ensaio hormonal</i>	48
4.6.2	<i>Dosagens Hormonais</i>	48
4.7	Validação.....	50
4.7.1	<i>Validação laboratorial por paralelismo</i>	50
4.7.2	<i>Validação biológica e registros comportamentais</i>	50
4.8	Análise estatística.....	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Coleta de fezes	52
5.2	Comportamentos sociosexuais reprodutivos	52
5.3	Dosagem dos metabólitos fecais	53
5.4	Validação laboratorial	63
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	70
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
9	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, o perfil endócrino de uma espécie é caracterizado por meio da mensuração dos hormônios esteroides de amostras de sangue que, por sua vez, fornecem uma medida da concentração plasmática dos esteroides circulantes (GOYMANN, 2005). Tal técnica, no entanto, é tida como um obstáculo no estudo endocrinológico de muitos animais selvagens, ameaçados ou sensíveis ao estresse de contenção, devido ao seu caráter invasivo e à dificuldade logística para a obtenção de amostras sequenciais (JENSEN & DURRANT, 2006).

Neste contexto, as técnicas de monitoramento hormonal não-invasivo surgem como um método alternativo de estudo das funções endócrinas, visto que os hormônios são rapidamente metabolizados e excretados pelo organismo, o que torna possível a mensuração de seus metabólitos nas excretas (HIRSCHENHAUSER et al., 2005). Ademais, a mensuração de esteroides e de metabólitos fecais de glicocorticoides (MFG) representa os níveis cumulativos desses hormônios durante o seu tempo de passagem pelo intestino refletindo, portanto, os padrões de secreção do hormônio ao longo de um determinado período de tempo (HIRSCHENHAUSER et al., 2005).

Devido ao desenvolvimento de técnicas de monitoramento não invasivas, glicocorticoides ou seus metabólitos podem ser identificados na urina, saliva, penas, pelos, unhas, garras, secreções da pele e, principalmente, nas fezes (WIELEBNOWSKI et al., 2002; TOUMA & PALME, 2005). Por meio destas amostras, pode-se obter informações úteis sobre a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em animais selvagens, incluindo os da Ordem Primata (WIELEBNOWSKI et al., 2002; MILLER et al. 2007; DICKENS et al., 2013).

As coletas de amostras fecais de primatas podem ser realizadas com grande facilidade e em grande número, mesmo em situações de campo (GOYMANN, 2005). Assim, a quantificação dos metabólitos das excretas permite um monitoramento contínuo de um indivíduo por longos períodos, com a mínima alteração de suas atividades e ambiente social, visto que a manipulação do animal não se faz necessária, tornando a técnica especialmente valiosa em estudos focados nos hormônios adrenais relacionados com estresse (HIRSCHENHAUSER et al., 2005).

O estresse decorrente de alterações ambientais pode ser fisiologicamente oneroso para um indivíduo, causando alterações sistêmicas no crescimento e na reprodução, bem

como interferir na função imunológica, o que pode aumentar a suscetibilidade de indivíduos estressados a doenças (SAPOLSKY et al., 2000; ROMERO, 2004; LIGHTMAN, 2008). A avaliação e o monitoramento dos níveis circulatórios de glicocorticoides têm sido usados como um índice da resposta ao estresse ambiental em animais selvagens (BROOM, 1991; MÖSTL & PALME, 2002; KORTE et al., 2005; MORMÈDE et al., 2007).

Entre as espécies de primatas, existe uma variabilidade considerável nos níveis de corticoides descritos, bem como das enzimas associadas e receptores relacionados à história evolutiva das espécies, divergindo principalmente entre primatas do Novo Mundo (infraordem Platyrrhini) e do Velho Mundo (infraordem Catarrhini) (OSTERHOLZ et al., 2009). Embora a função da adrenal de primatas do Velho Mundo tenha sido amplamente estudada, poucas pesquisas avaliaram a atividade basal da adrenal e a relação com estímulos estressores em espécies do Novo Mundo (PRYCE et al., 2002; SULEMAN et al., 2004; TORRES-FARFAN et al., 2008; MARTÍNEZ-MOTA et al., 2008; FENG et al., 2011; CERDA-MOLINA et al. 2012). Estudos sugerem que as concentrações de cortisol plasmático em primatas do Novo Mundo, como por exemplo macacos-de-cheiro (*Saimiris ciureus*), saguis (*Callithrix jacchus*), micos (*Saguinus oedipus*, *S. labiatus* e *S. fuscicollis*, *Leontopithecus rosalia*) e macacos-da-noite (*Aotus trivirgatus*) podem ser consistentemente mais elevados do que os dos primatas de Velho Mundo (CHROUSOS et al., 1982; COE & LEVINE et al., 1995; SCAMMELL et al., 2001; FULLER et al., 2004).

O miquiqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) é uma espécie de primata brasileiro criticamente em perigo de extinção, com população estimada em um pouco mais de 1.000 indivíduos (MELO & DIAS, 2005; STRIER et al., 2017). Atualmente em cativeiro encontram-se somente oito indivíduos. Seu declínio populacional se deve, principalmente à destruição da Mata Atlântica, fragmentação de seu *habitat* e às caças realizadas no passado (AGUIRRE, 1971, MITTERMEIER et al., 1987).

Devido ao crescimento demográfico lento da espécie, perda de habitat e isolamento das populações que dificultam o fluxo gênico, dez indivíduos de miquiqui-do-norte foram translocados em projetos de manejo para a conservação da espécie (TABACOW et al., 2021). Análises acerca dos protocolos anestésicos utilizados, tempo de captura, exames que são realizados durante a translocação e outras atividades foram avaliados em um estudo de Oliveira (2021), em que foi compilado informações fisiológicas acerca de animais capturados para translocação. Porém, após a captura, estes animais não foram submetidos a novas avaliações de saúde, e uma questão que permanece sem respostas é o grau de estresse a que estes indivíduos podem estar submetidos após processos de translocação, adaptação a

um novo local e grupo ou em decorrência dos status reprodutivos apresentados pelos animais translocados.

Neste contexto, o fomento de pesquisas acerca da fisiologia do miquiqui-do-norte, associada à sua avaliação endócrina em resposta a eventos sociais e comportamentais, apresenta-se como estratégia de grande valia para a conservação da espécie *in situ* e *ex situ*. Devido à grande ameaça da espécie em questão, o presente estudo em parceria com o Miquiqui Instituto de Biodiversidade (MIB), objetiva avaliar a influência de fatores sexuais e sociais sobre os padrões de MFG em miquiquis-do-norte translocados.

Para tanto, foram avaliadas as concentrações de MFG de cinco indivíduos que foram translocados de vida livre para um recinto seminatural na Comuna do Ibitipoca, no município de Lima Duarte, Minas Gerais, Brasil (TABACOW et al., 2021). Dados comportamentais e fezes destes indivíduos foram coletadas ao longo de nove meses. As concentrações hormonais foram comparadas com os dados de comportamento obtidos. Os resultados alcançados no presente trabalho servirão como fonte de informações relevantes acerca do perfil de glicocorticoides da espécie *Brachyteles hypoxanthus* durante os eventos sociosexuais em cativeiro e verificar de que forma a translocação e o cativeiro afetaram os MFG de um dos indivíduos capturado e translocado durante o estudo. Estes resultados poderão fornecer informações acerca do impacto de translocações em indivíduos da espécie miquiqui-do-norte e subsidiarão ações de conservação direcionadas à espécie, com aprimoramento do manejo *ex situ*, nos procedimentos de translocação e nas tomadas de decisões frente a futuras estratégias de conservação para as populações de miquiqui-do-norte.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Brachyteles hypoxanthus*: comportamento sociosexual

O miquiqui (*Brachyteles* spp.), é um primata de Novo Mundo endêmico da Mata Atlântica brasileira (AGUIRRE, 1971; CHAVES et al., 2011), pertence à subfamília Atelinae e é considerado o maior primata neotropical (LEMOS DE SÁ et al., 1993; FEAGLE, 1999). Alterações taxonômicas baseadas em distinções morfológicas e genéticas levaram o gênero *Brachyteles* a ser dividido, atualmente, em duas espécies reciprocamente monofiléticas correspondentes a miquiquis-do-norte (*B. hypoxanthus*) e do-sul (*B. arachnoides*), separados por uma distância genética de 12,7% (GROVES, 2005; CHAVES et al., 2019). O miquiqui-do-norte é um dos primatas mais ameaçados de extinção no mundo (MITTERMEIER et al. 2006).

As principais diferenças anatômicas entre as espécies são a presença de polegar vestigial e padrões de despigmentação na face e escroto, presentes no miquiqui-do-norte (STRIER et al., 2006; CHAVES et al., 2019). O miquiqui é um primata diurno, arborícola e social com dietas folívora-frugívora, incluindo flores, brotos de bambus e de samambaias. (AGUIRRE, 1971; STRIER, 1991).

Como característica relevante dessa espécie está sua cauda preênsil, garantindo a ele uma rápida locomoção suspensa (AGUIRRE, 1971; STRIER, 1992; JERUSALINSKY et al., 2011). Esta cauda pode ser usada como suporte postural e/ou apêndice suspensor de preensão capaz de suportar toda a massa corporal de um indivíduo durante sua alimentação e locomoção (EMMONS E GENTRY, 1983). Do ponto de vista social, estes animais vivem em grupos multi-masculinos e multi-femininos que variam em tamanho de acordo com a população em questão (STRIER, 1996; PRINTES & STRIER, 1999; STRIER et al., 2001).

Grande parte das informações disponíveis sobre a sociedade dos miquiquis são oriundas de pesquisas de longo prazo da população residente na Estação Biológica de Caratinga (Reserva Particular do Patrimônio Natural Feliciano Miguel Abdala), Minas Gerais, em que a pesquisadora Karen Strier e seus colaboradores realizam a maior pesquisa de longo prazo acerca dos miquiquis (STRIER, 1987a, 1999; STRIER & BOUBLI, 2006).

A área de distribuição do miquiqui-do-norte (*B. hypoxanthus*) compreende os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (AGUIRRE, 1971; MELO et al., 2004; MELO &

DIAS, 2005; MENDES et al. 2005, TALEBI et al., 2011; FERRAZ et al., 2019). Estima-se que a população total da espécie seja inferior a 1000, distribuídas em 15 subpopulações (STRIER et al., 2017).

O comportamento dos miquis é extremamente pacífico, passam em média 30% do seu tempo a um raio de um metro dos demais indivíduos, e mais de 50% do seu tempo dentro em um raio de cinco metros de outro indivíduo (STRIER, 1986, 1987b, 1990). Machos e fêmeas passam muito tempo na proximidade de indivíduos de seu próprio sexo, em íntima associação (STRIER, 1990). Não há registro de interações agonísticas no acesso aos recursos hídricos, nem de interações agonísticas entre os machos em situações de acesso a fêmeas sexualmente receptivas (STRIER, 1986, 1987a, 1990).

A sociedade do miqui-do-norte é caracterizada pela dispersão das fêmeas antes de atingirem a maturidade sexual e a filopatria dos machos (STRIER, 1990; PRITES & STRIER, 1999; POSSAMAI et al., 2005; TALEBI et al., 2009). As fêmeas geralmente se dispersam de seus grupos natais quando atingem em média seis a sete anos, antes do início da puberdade, enquanto os machos permanecem em seus grupos natais por toda a vida (PRITES & STRIER, 1999; STRIER & ZIEGLER, 2000).

Após a migração e, apesar de serem animais que não exibem comportamentos agressivos, ocorrem perseguições de fêmeas residentes a fêmeas subadultas imigrantes até que sejam aceitas no novo grupo (STRIER, 1992; STRIER, 1999). As fêmeas residentes se unem e perseguem as imigrantes emitindo vocalizações como “relinchos” e “latidos” (STRIER, 1992; STRIER 1999).

As fêmeas de miquis não exibem qualquer insinuação visual de ovulação, sendo os sinais químicos mediados por feromônios a única maneira pela qual as fêmeas anunciam seu status reprodutivo (SOUTHWICK & SMITH, 1986; STRIER, 1987c; STRIER, 1999). Uma vez sexualmente receptivas, as fêmeas praticam a “lavagem de urina”, utilizando as mãos para espalhar sua urina nos galhos e folhas, sinalizando para os machos sua condição reprodutiva (SOUTHWICK & SMITH, 1986; STRIER, 1987c; STRIER, 1999).

Os encontros sexuais entre machos e fêmeas se iniciam por meio de inspeções, em que os machos examinam a região genital da fêmea cheirando-a ou puxando sua genitália para estimular a secreção de um líquido que pode ser acessado diretamente com a boca do macho ou inalada, após o contato com sua própria mão (STRIER, 1986, 1999). As fêmeas de miquis participam ativamente em interações sexuais, tendo controle acerca de quais machos irão interagir, exibindo expressões faciais (*Grimace*) e vocalizações/chilreios (*Mating Twitter*) (STRIER, 1997, 1999).

Muriquis copulam à vista de outros membros do grupo sem que outros indivíduos ameassem ou interfiram na cópula (STRIER, 1986). Apresentam também um monomorfismo em tamanho corporal e tamanho de canino, tais características, associadas aos baixos níveis de testosterona nos machos, são responsáveis pela baixa agressividade entre os machos e pela ausência de dominância masculina sobre as fêmeas (HILL, 1962; ZINGESER, 1973; STRIER, 1990; STRIER et al., 1999).

Após a migração de seus grupos natais, as fêmeas desta espécie só têm seus filhotes pelo menos dois anos após se juntarem a um novo grupo social (STRIER & ZIEGLER, 2000; STRIER et al., 2002). Portanto, a idade das fêmeas ao terem seu primeiro filhote ocorre, em média, aos nove anos de idade e, normalmente, um único filhote é gerado por gestação, com intervalo de três anos entre os partos devido ao estreito cuidado parental que dura por dois anos (STRIER & ZIEGLER, 1997; GUEDES et al., 2008). Estes fatores reprodutivos associados com a filopatria dos machos, fazem com que essa espécie se reproduza e forme grupos sociais com muitos indivíduos muito lentamente, tornando estes animais mais vulneráveis à extinção (STRIER, 2000; MARTINS & STRIER, 2004).

Atualmente, existem programas de pesquisa e ações de conservação voltadas para os muriquis, sendo quatro em Minas Gerais e duas no Espírito Santo, cobrindo cerca de 90% da população de *B. hypoxanthus* (MENDES et al., 2005; FERRAZ et al., 2019). Existem diferentes trabalhos com foco em monitoramento populacional, estudos ecológicos e genéticos (FAGUNDES, 2005; CHAVES et al., 2006; FERRAZ et al., 2019), investigações de saúde (STUART & STRIER 1995; PISSINATTI, 2005; FERRAZ et al., 2019), e manutenção da espécie em cativeiro, objetivando o manejo e sanidade da espécie (MENDES et al., 2005; PISSINATTI, 2005; FERRAZ et al., 2019).

O muriqui-do-norte já foi submetido a diferentes estudos acerca da sua endocrinologia hormonal, como por exemplo, a avaliação do cortisol realizada por Strier et al. (1999). Neste estudo, foi verificado que os níveis de testosterona fecal e cortisol, analisados em muriquis machos de vida livre possuem uma sazonalidade na secreção de cortisol, se alterando de acordo com os períodos de cópula e influenciados pela presença das estações chuvosas (STRIER et al., 1999). O estudo também verificou que durante a estação reprodutiva, não ocorre aumento nos níveis de cortisol, o que justifica os baixos índices de agressão exibidos pelos machos de muriquis no momento de acesso às parceiras (STRIER et al., 1999).

Outro estudo avaliando o cortisol nesta espécie foi conduzido por Strier et al. (2000), em que se buscou compreender, por meio de métodos não invasivos de ensaios de esteroides

fecais, determinar o momento da dispersão das fêmeas em relação à puberdade e ao ciclo ovariano. Neste estudo, verificou-se que os níveis médios de cortisol das fêmeas não diferiram entre emigrantes natais ou imigrantes recentes, comprovando que a dispersão das fêmeas não é influenciada por elevações hormonais.

Strier et al. (2003) realizaram outro estudo acerca do cortisol em muriquis-do-norte por meio de dosagem hormonal não-invasiva, avaliando as mudanças hormonais e comportamentais em machos e fêmeas de vida livre na Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais, Brasil, durante um período de seis meses que compreendeu o início das temporadas de acasalamento e concepção. Verificou-se neste estudo que não houve diferenças nos níveis de cortisol feminino em suas condições de pré-acasalamento, acasalamento e concepção. Os níveis de cortisol foram significativamente maiores nas fêmeas do que nos machos antes da época da concepção e a elevação sustentada do cortisol masculino ocorreu após o pico da atividade sexual.

Constatou-se também que os níveis de cortisol masculino foram positivamente correlacionados entre os anos que tiveram precipitações chuvosas semelhantes, mas diferiram no momento dos eventos sexuais e reprodutivos. O momento das elevações de cortisol em machos parece ser geralmente regulado por sinais ambientais, mas, também, um pouco por sinais sociais e comportamentais relacionados às suas oportunidades reprodutivas dentro de sua estação de acasalamento (STRIER et al., 2003).

O conhecimento atual sobre a endocrinologia do muriqui é baseado na espécie *B. hypoxanthus*, em que através de inúmeros estudos, verificou-se que a gestação dura cerca de sete meses (STRIER & ZIEGLER, 2005), a duração do ciclo estral é de 21 dias (STRIER & ZIEGLER 1997, 2005), e que fatores intrínsecos aos indivíduos são determinantes na retomada deste ciclo ou não (ZIEGLER et al., 1997; STRIER & ZIEGLER 2000).

Lima et al. (2021) avaliaram esteroides fecais ao longo de 12 meses em *Brachyteles arachnoides ex situ*, em machos e fêmeas, através de dados comportamentais e hormonais não-invasivos em que, observou-se que nos machos não houve variação anual de glicocorticoide e testosterona. Contudo, os machos alojados juntos apresentaram maiores níveis de metabólitos de glicocorticoides fecais e níveis menores de metabólitos de testosterona. Estes indivíduos também copularam menos e foram mais agressivos do que um macho isolado ou um macho em um grupo unimacho-multifeminino, sugerindo que *B. arachnoides* apresenta características compatíveis com competição reprodutiva.

2.2 Aplicação da dosagem do cortisol na conservação de espécies e na avaliação de bem-estar animal

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal resulta em uma secreção de glicocorticoides com duração de vários minutos a horas (SAPOLSKY, 1992; ROMERO & WINGFIELD, 2001). A presença de concentrações elevadas de glicocorticoides a curto prazo auxilia na fuga em situações em que os animais se apresentam em risco de vida (WINGFIELD et al., 1997). No entanto, a ativação crônica desse eixo associada a altas concentrações de glicocorticoides podem ter grandes efeitos deletérios à saúde dos indivíduos (BLAS et al., 2007; SHERIFF et al., 2009).

As respostas fisiológicas ao estresse incluem a ativação do sistema nervoso simpático (SNS), bem como do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GOYMANN, 2005). A medição das catecolaminas liberadas como resultado da ativação do SNS é difícil porque essas substâncias estão disponíveis no organismo apenas por períodos transitórios de tempo (REEDER & KRAMER, 2005). Assim, a avaliação do estresse por meio do eixo HPA, mais comumente realizada pela medição de seus glicocorticoides de produto final, tem sido tradicionalmente o principal meio de fazer inferências sobre a resposta fisiológica ao estresse em animais (OTOVIC & HUTCHINSON, 2015).

Uma vez que a amplitude e a duração desta resposta ao estresse em muitos casos se correlacionam com a saúde geral de um animal, concentrações de glicocorticoides estão sendo cada vez mais usados em estudos de ecologia e conservação como indicadores de bem-estar animal (BUSCH & HAYWARD, 2009; SHERIFF et al., 2011).

Através das avaliações de glicocorticoides, é possível compreender como os estressores afetam a vida e reprodução dos animais e, conseqüentemente, como alterações no seu *habitat*, mudanças climáticas, realocação ou reintrodução afeta as populações de animais (BOONSTRA & SINGLETON, 1993; WASSER et al., 1997; CREEL et al., 2002; CYR & ROMERO, 2007; THIEL et al., 2008; MONCLUS et al., 2009; SHERIFF et al., 2009).

É substancial o aumento no número de estudos em vertebrados que investigam as interações entre o comportamento animal e os níveis de hormônios esteroides, sejam eles corticosteroides ou esteroides sexuais (CAVIGELLI, 1999; KENAGY & PLACE, 2000; GANSWINDT et al., 2003; GOYMANN et al., 2003; REEDER et al., 2004; ENGH et al., 2006; BONIER et al., 2009). Por meio dessas pesquisas, é possível obter dados sobre os

moduladores da variação comportamental nos animais, história de vida, bem como, a avaliação e monitoramento da fisiologia, saúde e bem-estar de espécies ameaçadas em vida livre (HODGES E HEISTERMANN, 2003; CHAPMAN et al., 2006; WIKELSKI & COOKE, 2006; TARLOW E BLUMSTEIN, 2007; CYR & ROMERO, 2008; VAN METER et al., 2009).

Por meio dessas inferências é possível também realizar melhorias no bem-estar dos animais em cativeiro buscando minimizar o estresse crônico (GRAHAM et al., 2002; HEISTERMANN et al., 2004; DEHNHARD et al., 2008; PIROVINO et al., 2011). Nas verificações de bem-estar animal, a avaliação de glicocorticoides (cortisol e corticosterona) merece particular atenção, uma vez que são os hormônios primários da resposta ao estresse de vertebrados, sendo ambos importantes biomarcadores quando se avalia as consequências fisiológicas de distúrbios antropogênicos e fragmentação de *habitat* para a saúde individual e populacional dos animais (CHAPMAN et al., 2006; WIKELSKI & COOKE, 2006; MARTÍNEZ-MOTA et al., 2007; RANGEL-NEGRÍN et al., 2009; THIEL et al., 2011).

Métodos não invasivos podem contribuir para os planos de manejo com o objetivo de conservar espécies altamente ameaçadas, pois permitem mensurações mais frequentes e que produzem o mínimo ou praticamente nada de perturbação aos animais (PALME et al., 2013). Thiel et al. (2008) investigaram o impacto de atividades recreativas humanas ao ar livre em aves da espécie *Tetrao urogallus*, por meio de dosagens hormonais não invasivas e verificaram que o turismo de esqui afetou tanto o uso do *habitat* quanto o status endócrino desta espécie. Os níveis de MFG dos indivíduos que habitavam áreas com baixa intensidade de recreação foram significativamente menores do que daqueles que habitavam áreas com moderada ou alta intensidade de recreação, durante todo o período do estudo.

Constatou-se ainda nesta pesquisa que para proteger as populações de *Tetrao urogallus*, os gestores deveriam manter as florestas habitadas por estas aves livres de infraestrutura turística, ou pelo menos manter trechos florestais intactos dentro das áreas de esqui (THIEL et al., 2008). Diferentemente desse estudo, Rodrigues (2017) identificou que os macacos-aranha (*Ateles geoffroyi*) poderiam lidar com os *habitats* perturbados, e que os alimentos fornecidos por humanos se tornaram um recurso valioso para a espécie.

O manejo de populações de animais mantidos em cativeiro (*ex situ*) ou em seu habitat natural (*in situ*) é importante para a conservação de espécies (PALME et al., 2019). Identificar os processos ecológicos e antropogênicos que atuam como fontes de estresse fisiológico na vida selvagem é de primordial importância para a implementação de estratégias adequadas de manejo e conservação (DANTZER et al., 2014).

As respostas comportamentais funcionam como indicadores importantes do estado e bem-estar dos animais, porém, elas podem não refletir totalmente a perturbação causada a um animal e podem ser mal interpretadas (GILL et al., 2001; LE CORRE et al., 2009). Além disso, as respostas fisiológicas ao estresse também podem ocorrer antes que os sinais comportamentais de estresse sejam exibidos e são mais propensos a refletir objetivamente os efeitos do distúrbio na homeostase (LARM et al., 2021).

Portanto, estudos que abordam as respostas fisiológicas ao estresse podem ser um complemento valioso para estudos comportamentais (DE VILLIERS et al., 2005; YOUNG, et al., 2017). Para animais em cativeiro, minimizar o estresse também é importante em uma situação de reprodução, não apenas para maximizar a saúde e o bem-estar animal, mas também para garantir o sucesso da reprodução e sobrevivência da prole (MASON, 2010).

Particularmente para o manejo dos muriquis e programas de manejo em cativeiro para o muriqui-do-norte, a capacidade de mensurar respostas fisiológicas ao estresse pode ser usada, por exemplo, para avaliar a relação entre indivíduos recém-translocados, examinar reações a distúrbios ao seu redor e a eventos sociais, e avaliar a resposta ao manejo e transporte. O desenvolvimento de métodos para avaliar as respostas fisiológicas ao estresse decorrente destas etapas do manejo *ex situ* pode, portanto, ser uma ferramenta valiosa no estudo dos efeitos de diferentes estressores nos muriquis, tanto na natureza, quanto em cativeiro.

2.3 Glicocorticoides

O cortisol é um hormônio esteroide sintetizado a partir do colesterol na camada da zona fasciculada do córtex adrenal (THAU et al., 2021). O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), liberado pela hipófise anterior, atua aumentando os receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumentando a atividade do colesterol desmolase, que converte o colesterol em pregnenolona, a qual compreende a etapa limitante da síntese de cortisol (ANGELOUSI et al., 2020; THAU et al., 2021).

A maioria dos glicocorticoides circulam na forma inativa, ligada à globulina ligadora de corticosteroides (CBG) ou à albumina (RAMAMOORTHY & CIDLOWSKI, 2016). A forma inativa é convertida em sua forma ativa pela 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase 1 (11-beta-HSD1) na maioria dos tecidos, enquanto a 11-beta-hidroxiesteróide

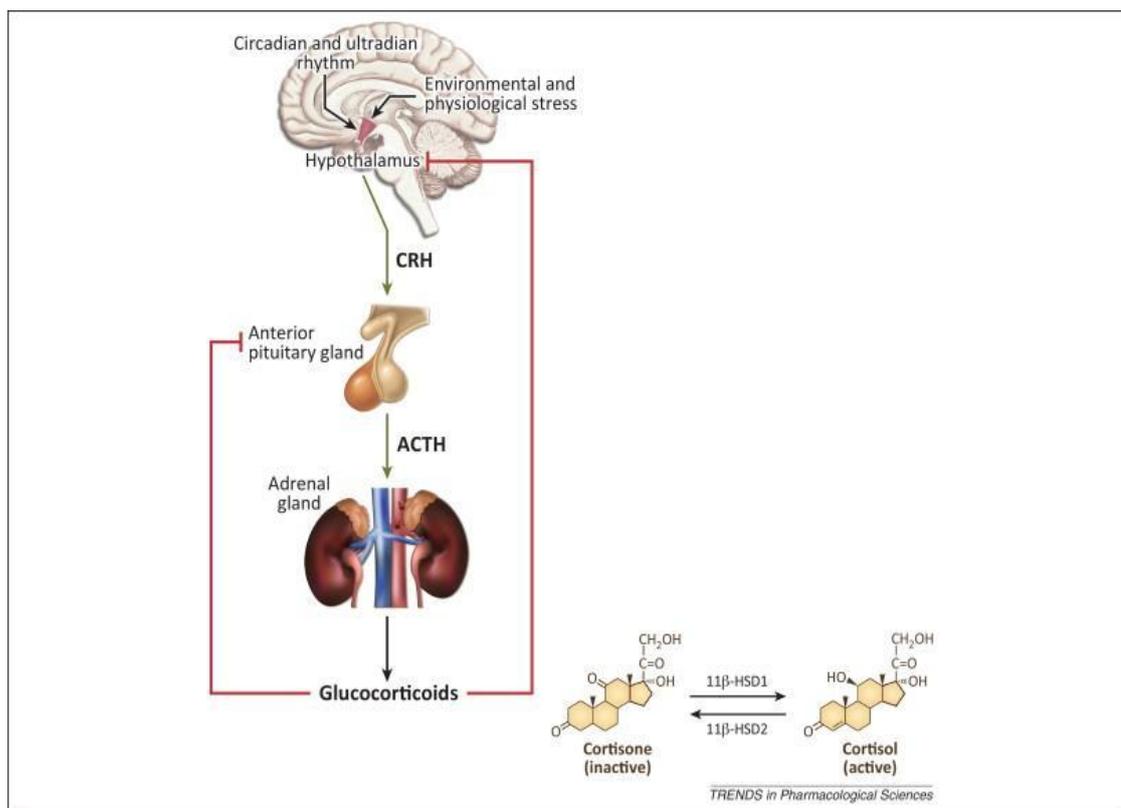
desidrogenase 2 (11-beta-HSD2) inativa o cortisol de volta à cortisona no rim e no pâncreas (RAMAMOORTHY & CIDLOWSKI, 2016).

Os receptores de glicocorticoides estão presentes em quase todos os tecidos do corpo, por esse motivo o cortisol é capaz de interagir com quase todos os sistemas orgânicos, como o sistema nervoso, imunológico, cardiovascular, respiratório, reprodutor, musculoesquelético e tegumentar (KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013). O cortisol tem muitas funções orgânicas, como mediar a resposta ao estresse, regular o metabolismo, a resposta inflamatória e a função imunológica (OAKLEY & CIDLOWSKI, 2013).

Sua liberação é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), em que hormônio liberador de corticotropina é liberado pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (RAMAMOORTHY & CIDLOWSKI, 2016), e em seguida, atua na hipófise anterior para liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que posteriormente atua no córtex adrenal e em um ciclo de *feedback* negativo que têm como alvo o hipotálamo e a hipófise anterior para inibir a produção e liberação de CRH e ACTH e, assim, limitar tanto a magnitude quanto a duração do aumento de glicocorticoides (OAKLEY & CIDLOWSKI 2013; THAU et al., 2021). O eixo HPA segue um ritmo circadiano, portanto os níveis de cortisol serão altos pela manhã e baixos à noite na maioria dos primatas (RAMAMOORTHY & CIDLOWSKI, 2016).

Kadmiel e Cidlowski (2013) ilustraram em seu artigo, a representação esquemática da regulação dos níveis de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Figura 1), em que a síntese e liberação de glicocorticoides está sob regulação circadiana e ultradiana dinâmica pelo núcleo periventricular do hipotálamo. O hormônio liberador de corticotropina (CRH) secretado pelo hipotálamo estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da glândula pituitária anterior, que por sua vez, induz a síntese e secreção de cortisol do córtex das glândulas adrenais para a corrente sanguínea (KADMIEL & CIDLOWSKI 2013).

Figura 1 - Representação esquemática da regulação dos níveis de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).



Fonte: KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013.

Os hormônios esteroides, como o cortisol, são mensageiros primários que podem atravessar a membrana citoplasmática por causa de suas propriedades lipossolúveis onde irão se ligar a receptores específicos no citoplasma (THAU et al., 2021). Geralmente, após a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, é possível verificar aumentos séricos nas concentrações de glicocorticoides de três a cinco minutos em vertebrados (DE KLOET et al., 2005).

Os níveis de pico são atingidos entre 15 e 30 minutos após um agente estressor e retornam aos níveis basais dentro de 60 a 90 minutos (DE KLOET et al., 2005). Sob condições em que o estresse é agudo, o mecanismo de *feedback* opera de forma eficiente e o sistema volta rapidamente ao normal, porém, quando é crônico, os sinais de *feedback* são fracos e o sistema permanece ativado por períodos mais longos (SAPOLSKY, 1992).

Dallman e Bhatnagar (2010) verificaram que os efeitos biológicos da resposta ao estresse é um resultado das interações hormônio-receptor ao longo de todo o tempo da resposta, não apenas durante o pico de liberação do glicocorticoide. A capacidade de medir essa resposta integrada é extremamente importante ao estudar animais de vida livre, que

podem experimentar uma variedade de agentes estressores em qualquer momento do tempo amostrado (SETCHELL & CURTIS, 2011).

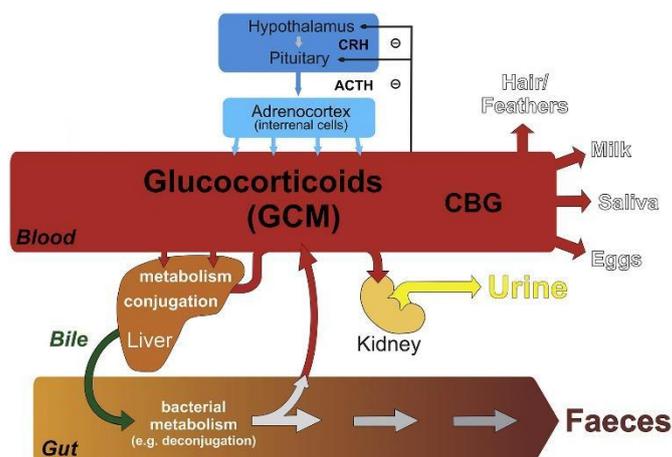
2.4 Fezes como matriz biológica para dosagens hormonais

Nos últimos anos, a medição dos níveis de metabólitos de glicocorticoides nas excretas (urina e fezes) tem sido cada vez mais usada para medir os níveis de estresse em animais de laboratório, domésticos, de zoológicos e de vida livre (TAYLOR, 1971; WASSER et al., 2000; BUCHANAN & GOLDSMITH, 2004; MILLSAUGH E WASHBURN, 2004; MOESTL et al., 2005; PALME et al., 2005; TOUMA & PALME, 2005). Nas fezes, a atividade adrenocortical é medida pela quantificação dos MFG que estão sendo excretados. Os MFG podem ser mensurados como uma medida integrada da atividade adrenocortical e representam a secreção cumulativa de hormônios (geralmente ao longo de várias horas, dependendo da frequência de defecação) (PALME et al., 2005; SHERIFF et al., 2011).

Os níveis de MFG são particularmente interessantes como uma medida da atividade adrenocortical de animais selvagens, porque as amostras fecais podem ser coletadas de forma fácil e não invasiva no campo, sem necessidade de captura ou manuseio dos animais estudados (SHERIFF et al., 2011; PALME, 2019). Também é possível amostrar o mesmo indivíduo repetidamente com risco mínimo de afetar os níveis de glicocorticoides (TOUMA & PALME, 2005; PALME, 2019).

Em artigo publicado por Palme (2019) foi realizado um esquema de secreção e excreção de glicocorticoides (adaptado de MÖSTL & PALME, 2002). Como demonstra a figura 2, neste estudo são indicadas as diferentes matrizes biológicas utilizadas para a dosagem de glicocorticoides ou seus metabólitos.

Figura 2 - Representação esquemática da secreção e excreção de glicocorticoides.



Fonte: Palme, 2019.

Embora a coleta de sangue tenha sido o método mais comum para medir as concentrações de glicocorticoides, não é necessariamente o método mais informativo e, por necessitar de manipulação do animal a ser amostrado, sua aplicação pode se tornar impossível em algumas espécies de animais selvagens (MOËSTL & PALME, 2002; MORMEDE et al., 2007).

O metabolismo e a via de excreção dos glicocorticoides diferem entre as espécies, até mesmo naquelas taxonomicamente próximas (BAHR et al., 2000; PALME et al., 2005). Devido a este fator, antes de se aplicar a metodologia de análise não invasiva, é crucial validar biologicamente os métodos para cada nova espécie analisada, assim garante-se que os dados gerados sejam biologicamente significativos (PALME et al., 2005; TOUMA E PALME et al., 2005; HEISTERMANN et al. 2006; SCHWARZENBERGER, 2007; GOYMANN, 2012).

As amostras fecais são, geralmente, fáceis de se identificar e de se localizar para serem coletadas diretamente do solo. Os níveis de glicocorticoides nessas amostras fornecem uma medida mais integrada da atividade adrenocortical do que as amostras pontuais provenientes de soro ou plasma e, assim, diminuem a influência dos padrões pulsáteis dos episódios de secreção de glicocorticoides (WHITETEN et al., 1998).

Os glicocorticoides secretados pelo eixo HPA e circulantes no plasma, são metabolizados principalmente pelo fígado, embora muitos outros órgãos contribuam para o processo (TAYLOR, 1971; PALME, 2019). Os metabolitos resultantes são excretados via bile ou urina, predominantemente conjugados (PALME, 2019).

No intestino pode ocorrer metabolismo adicional de esteroides excretados através da bile por enzimas bacterianas, e metabólitos também podem ser parcialmente reabsorvidos através da circulação entero-hepática (PALME et al., 2005; PALME, 2019). Os MFG serão identificados com um certo atraso de tempo em relação ao momento de sua secreção sendo esse tempo específico para cada espécie e corresponde, aproximadamente, ao tempo de trânsito intestinal daquele animal (PALME, 2019). Para muriquis foi descrito que o tempo de trânsito intestinal nessa espécie é de 36 horas (TALEBI, 2003), porém, foi verificado em Lima et al. (2021) a detecção de metabólitos hormonais com picos de excreção mesmo após 48 horas de eventos estressantes em muriquis-do-sul *ex situ*.

Na maioria das espécies de primatas de grande porte, para as quais há dados disponíveis, os esteroides são excretados nas fezes entre 36 e 48 horas após a identificação na circulação (SHIDELER et al., 1993). Embora haja exceções, como exemplo, 22 horas para testosterona e para o cortisol em chimpanzés (MCHLE et al., 2002; BAHR et al., 2000). Em contraste, o tempo de passagem intestinal é mais rápido em animais menores, como de quatro a oito horas para testosterona e cortisol em *Callithrix jacchus* (BAHR et al., 2000).

Dosagens hormonais através das fezes possuem algumas vantagens, como a facilidade na obtenção das amostras, amostragem repetida, possibilidade de trabalhar com pequenas quantidades de amostra e a sensibilidade dos imunoenaios enzimáticos (EIAs) capazes de detectar uma quantidade muito pequena de hormônios excretados (PALME et al., 1996). Esta técnica completamente não invasiva já foi realizada e validada com sucesso para monitorar a atividade gonadal e adrenocortical em inúmeras espécies de animais de laboratório, domésticos, de zoológicos e selvagens (HUBER et al., 2003; SCHWARZENBERGER, 2007; TOUMA & PALME, 2005).

Uma vez que os MFG refletem a taxa de produção de um hormônio específico durante um certo período de tempo, eles são menos afetados por flutuações de curto prazo na secreção hormonal e podem refletir o estado hormonal geral de um indivíduo melhor do que amostras de plasma ou soro (TOUMA & PALME, 2005).

Em muitas espécies, os níveis de MFG podem ser afetados por muitos fatores intrínsecos como a idade, sexo, condição reprodutiva, corporal e variações diurnas (SAPOLSKY, 1992; ZIEGLER et al., 1995; RAMINELLI et al., 2001; TOUMA et al., 2003; WEINGRILL et al., 2004; CHAPMAN et al., 2006; SETCHELL et al., 2008; CHARBONNEL et al., 2008; BOSSON et al., 2009; CARNEGIE et al., 2011). A forma e magnitude com que esses fatores influenciam a atividade adrenocortical é espécie-específica

(RAMINELLI et al., 2001; BEEHNER E WHITTEN, 2004; CHAPMAN et al., 2006; BOSSON et al., 2009; SHUTT et al., 2012).

Quando consideramos o sexo, machos adultos da espécie *Pan troglodytes* e *Macaca assamensis*, sendo este último apenas durante a época de reprodução, têm níveis mais elevados de glicocorticoides do que machos subadultos (SERAPHIN et al. 2008; OSTNER et al., 2008). Além dessas fontes biológicas de variação, os níveis de glicocorticoides das fezes também podem ser afetados por questões metodológicas, em particular a forma como as amostras são coletadas e armazenadas (KHAN et al., 2002; LYNCH et al., 2003; SHUTT et al., 2012).

Tais fatores representam um sério desafio, especialmente para pesquisadores que trabalham em áreas remotas onde não há acesso à freezers, sendo que a solução para este problema é a extração imediata dos esteroides das fezes usando metodologias de extração no local em combinação com métodos validados para armazenar extratos sob condições tropicais de clima (BEEHNER E WHITTEN, 2004; SANTYMIRE E ARMSTRONG, 2010; MURRAY et al., 2013; SHUTT et al., 2012).

2.5 Coleta, armazenamento e extração de amostras fecais

É obrigatório o uso de itens para proteção individual (luvas e máscaras) e outras precauções de biossegurança ao manipular as amostras fecais, devido ao potencial risco biológico à saúde (MÖSTL et al., 2005; PALME et al., 2013).

Para adotar a metodologia de dosagem hormonal através das fezes é preciso extremo planejamento, sobretudo, quanto ao cronograma de coleta de amostras, bem como o armazenamento (PALME, 2019). A coleta de amostras fecais de animais de vida livre é não invasiva e devem ser realizadas apenas quando a origem das fezes for conhecida, ou seja, apenas em situações em que o momento de defecação foi registrado pelo pesquisador (GANSWINDT et al., 2010).

O horário de coleta também precisa ser padronizado, uma vez que os padrões de secreção diurnos são particularmente pronunciados para alguns hormônios, como, por exemplo, testosterona e cortisol (SETCHELL et al., 2011).

A degradação de esteroides devido ao metabolismo bacteriano pode ser um problema potencial para dosagem hormonal em amostras fecais, onde as bactérias gastrointestinais são abundantes (SETCHELL et al., 2011). Para contornar este problema, as amostras precisam

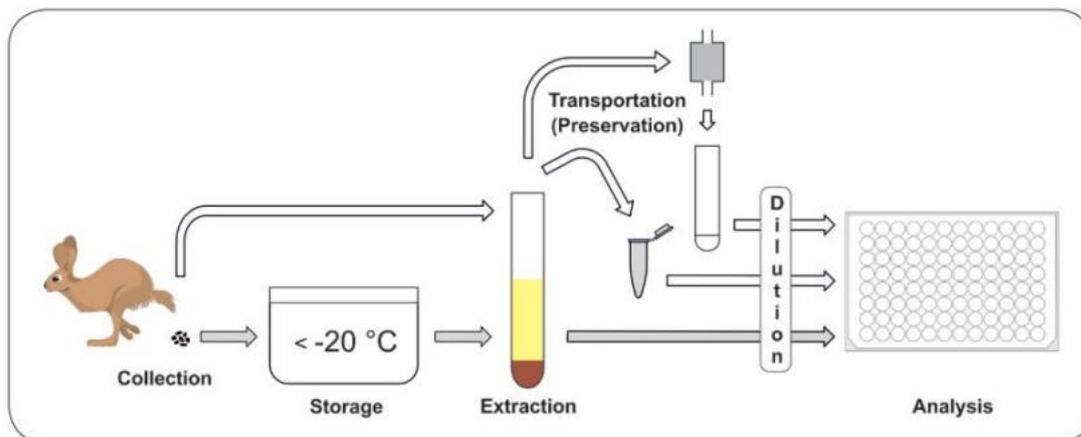
ser congeladas logo após a coleta, caso não seja possível, é preciso manter a amostra refrigerada até conservá-la adequadamente (TOUMA & PALME, 2005).

A maneira mais eficaz de preservar as fezes por períodos prolongados é o congelamento a -20°C (SETCHELL et al., 2011). Após as coletas, é extremamente importante rotular os recipientes da amostra adequadamente, fornecendo o nome do animal/número de identificação, data e hora da coleta diretamente no tubo ou tampa (de preferência ambos), usando um marcador permanente e à prova d'água (SETCHELL et al., 2011).

A frequência de amostragem é determinada pelo tipo de informação que se objetiva obter (SETCHELL et al., 2011). Como regra geral, para compensar a variação intra-individual (amostra para amostra) e também para considerações estatísticas, é recomendado uma coleta de, no mínimo, seis e preferencialmente dez amostras por condição, sempre coletando um pouco mais do que a quantidade minimamente necessária (SETCHELL et al., 2011).

Quanto à extração hormonal, a maioria dos artigos publicados utilizam metanol ou etanol em alta porcentagem (80% ou 90%), para extração (PALME, 2019). Segundo Palme et al., (2013) a recomendação para a extração de metabólitos fecais de cortisol é suspender as fezes de mamíferos em uma alta porcentagem de álcool primário e transferir uma alíquota do sobrenadante após sua centrifugação para o imunoensaio. A extração dos esteroides da matriz fecal é o primeiro passo a ser realizado antes das dosagens hormonais (Figura 3), independentemente da técnica que o pesquisador optar para a realização desta dosagem (MOSTL et al., 2005; MURTAGH et al., 2013).

Figura 3 - Esquema ilustrando as principais etapas experimentais desde a defecação até a análise de metabólitos de hormônios esteroides fecais.



Fonte: PALME et al., 2013.

Atualmente, o procedimento mais utilizado para a extração é agitar em *vortex* uma porção de fezes suspensas em uma mistura primária de álcool/água na proporção 50:50 (PALME et al., 2013). Os esteroides fecais estão normalmente presentes em concentrações relativamente altas nas fezes, portanto, os extratos passam por um teste de diluição em diferentes proporções para o EIE a ser utilizado para informar qual a melhor diluição a ser empregada nas dosagens hormonais (PALME et al., 2013).

É extremamente importante que os esteroides permaneçam estáveis durante todas as etapas da análise, como demonstrado na figura 1 anteriormente (MOSTL E PALME, 2002). A estabilidade dos metabólitos hormonais varia conforme os tipos e espécies de animais estudados (TERIO et al., 2002; LYNCH et al., 2003; MILLSAUGH et al., 2003).

Mostl et al. (2005) cita que pode ocorrer degradação adicional de esteroides quando as amostras são descongeladas antes da extração, uma vez que foi demonstrado que descongelar amostras rapidamente, por exemplo, por aquecimento (95 °C) é melhor do que descongelá-las lentamente à temperatura ambiente. Deve-se evitar retirar as amostras fecais do freezer à noite e começar a processá-las no dia seguinte, para a análise de MFG (MOSTL et al., 2005; PALME et al., 2013).

2.6 Dosagem Hormonal

Existem principalmente dois métodos para dosar metabólitos de esteroides: métodos cromatográficos (por exemplo, cromatografia líquida – CL) em combinação com espectrometria de massa (MS) e imunoenaios (WUDY et al., 2018). Os CL-MS são normalmente utilizados para quantificar esteroides em que a identidade química dos metabólitos medidos deve ser conhecida, possui um valor agregado maior e não é adequado para análises em grande escala (PALME, 2019). Portanto, atualmente, os imunoenaios são quase que exclusivamente utilizados (PALME, 2019).

Os enzimaímunoenaios substituíram principalmente os radioímunoenaios nos últimos anos, uma vez que ele é mais barato e não são necessárias licenças especiais para manuseá-lo já que não há o envolvimento de materiais radioativos neste método (MÖSTL et al., 2005, KERSEY & DEHNHARD, 2014; PALME, 2019).

Os imunoenaios são competitivos, isso significa que esteroides da amostra/padrão competem com esteroides marcados por locais de ligação limitados dos anticorpos (MÖSTL et al., 2005; PALME, 2019). Dependendo do sistema de detecção utilizado, eles podem ser classificados como radioímunoenamo (RIA), imunoenamo enzimático (EIA) ou quimioluminescentes (KERSEY & DEHNHARD, 2014; PALME, 2019).

Cada imunoenamo para cortisol depende de anticorpos projetados especificamente para o referido hormônio e eles estão disponíveis em kits comerciais de imunoenamo para sangue (KINN RØD et al., 2017; BEKHBAT et al., 2018; PALME, 2019). Para amostras fecais é utilizado anticorpos específicos de grupo, que são específicos para medir grupos de metabólitos (MÖSTL & PALME, 2002; MÖSTL et al., 2005). A vantagem dos kits comerciais é que eles estão prontamente disponíveis e são fáceis de serem utilizados (PALME, 2019).

Como podemos encontrar muitos metabólitos diferentes presentes nas fezes (PALME, et al., 2005) e os imunoenaios dependem de reações cruzadas de seus anticorpos (especialmente no caso de ensaios de cortisol e corticosterona), para medir metabólitos fecais de glicocorticoides as concentrações medidas são amplamente dependentes do método (MÖSTL et al., 2005).

Assim, nos casos em que concentrações mais altas de metabólitos de glicocorticoides são encontradas em diferentes estudos, elas não necessariamente indicam uma maior

atividade adrenocortical, mas podem ter sua base influenciada por questões metodológicas (THIEL et al., 2005; 2008).

2.7 Validações hormonais

Nos últimos anos, as validações de ensaios hormonais têm sido cada vez mais usadas em artigos que tratam sobre a análise de metabólitos de glicocorticoides (PALME, 2019). Para que um ensaio seja determinado como validado para determinada espécie, é necessário incluir validação analítica e, sobretudo, validação fisiológica e/ou biológica (PALME, 2019). Medidas de precisão, sensibilidade, especificidade e exatidão compreendem as validações analíticas (MÖSTL et al., 2005; KERSEY & DEHNHARD, 2014). Coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio de um *pool* de amostras com concentrações padrões do estudo precisam ser fornecidos para que a precisão seja verificada (PALME, 2019).

A realização de diluições seriadas dos extratos fecais é recomendada uma vez que através desta análise é possível verificar se os valores resultantes estão em paralelo com a curva padrão, excluindo a presença de substâncias que podem causar interferências (MÖSTL & PALME, 2002; MÖSTL et al., 2005; WATSON et al., 2013; PALME, 2019)

Experimentos de validação fisiológica induzem alterações nos glicocorticoides circulantes de forma padronizada, principalmente por estimulação farmacológica (ou supressão) da atividade do eixo HPA (PALME, 2019). Assim, experimentos de última geração incluem um teste de desafio com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (WASSER et al., 2000; MÖSTL & PALME, 2002; GOYMANN, 2005; TOUMA & PALME, 2005; PALME et al., 2005; SHERIFF et al., 2011; PALME, 2012).

Experimentos de validação fisiológica requerem permissão especial para serem realizados em animais (PALME, 2019). Com modelos experimentais em espécies ameaçadas de extinção, tal metodologia não pode ser realizada facilmente e nestes casos deve ser utilizada uma validação biológica (PALME, 2019). Tal validação consiste em medir os metabólitos de glicocorticoides antes e depois de um evento estressante que é forte o suficiente para elevar a atividade do HPA por um período prolongado (TOUMA et al. 2015), o que deve resultar em um pico nos níveis de metabólitos de glicocorticoides (PALME, 2019).

Esse tipo de validação comprova que a técnica pode detectar alterações biologicamente significativas na atividade adrenocortical (FANSON et al., 2017). Muitos artigos descrevem tal validação biológica e, na maioria dos casos, captura, contenção, transporte, isolamento, reagrupamento, exame físico, procedimentos veterinários ou outros distúrbios antropogênicos foram usados como agentes estressores (SCHELL et. al., 2013; WARK et al., 2016; PUEHRINGER-STURMAYR et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides por meio da técnica de enzimaímmunoensaio em indivíduos de *Brachyteles hypoxanthus* translocados de vida livre para um recinto semi-natural e verificar se os eventos sociosexuais reprodutivos e de introdução de um novo indivíduo influenciam as concentrações destes metabólitos nos animais do presente estudo.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a validação laboratorial e biológica para as dosagens dos metabólitos hormonais, por meio de enzimaímmunoensaio em *Brachyteles hypoxanthus*, em condições *ex situ*;
- Dosar os metabólitos fecais de glicocorticoides por meio da técnica de enzimaímmunoensaio, para a espécie *Brachyteles hypoxanthus* em condições *ex situ*;
- Verificar se há a ocorrência do padrão temporal (sazonalidade) na produção do glicocorticoide em *Brachyteles hypoxanthus ex situ*;
- Avaliar os níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides de acordo com os comportamentos sociosexuais reprodutivos dos animais;

- Avaliar se os níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides diferem entre os indivíduos de acordo com seus respectivos *status* reprodutivos;
- Determinar os níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em uma fêmea durante seu período gestacional e puerpério;
- Verificar os níveis de metabólitos fecais de glicocorticoides em fêmeas recém translocada de vida livre para um recinto semi-natural.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Licenças

Todos os procedimentos descritos nesta dissertação foram aprovados pela licença SISbio número 64438-4. As amostras foram obtidas sob protocolo CEUA UFMG aprovado sob o nº 163/2020. O projeto de pesquisa encontra-se regularmente cadastrado na plataforma SISGen pelo código A6EEE7D.

4.2 Local de estudo

Para o presente projeto foram utilizados cinco animais (três fêmeas e dois machos), alojados em um recinto seminatural na Comuna do Ibitipoca, Minas Gerais, localizada no entorno do Parque Estadual do Ibitipoca. O Parque é localizado na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, sua administração é realizada pelo Instituto Estadual de Florestas – (IEF-MG) e possui uma área total da reserva de 1488 hectares.

O *Muriqui's House* (MH) é uma área preparada para o cativeiro, construído especialmente, para a realização do manejo estratégico para a conservação do muriqui-do-norte (TABACOW et al., 2019). É constituído por uma área de 5,67 ha totalmente cercada, sendo dividida entre floresta secundária em estágio inicial/médio de regeneração (1,84 ha), pastagem (3,83 ha) (figura 4) e recinto de aclimação (7,0 m de altura; 20,0 m de comprimento; 8,0 m de largura) como mostra a figura 5.

No momento abriga oito indivíduos (dados atualizados em agosto de 2022), sendo um macho jovem de três anos e um infante macho de dez meses, um macho de um ano e quatro meses, um macho adulto (Luna) de 26 anos, outro macho adulto (Bertolino) de 29 anos, uma fêmea adulta (Ecológica) de 13 anos, uma fêmea adulta (Socorro) de 26 anos, e uma fêmea sub-adulta (Nena) de sete anos. Os dados referentes às idades dos indivíduos são informações de comunicação pessoal uma vez que não se sabe ao certo a idade de cada animal translocado, somente números aproximados.

Figura 4 - Área completa do cativeiro *Muriqui's House* destacando em vermelho o limite do cativeiro, incluindo os 1,84ha de floresta nativa e, em amarelo, o recinto de aclimação.



Foto: MELO, F. R., 2021; Delimitação na imagem por CUNHA, U. M., 2022.

Figura 5 - Recinto de aclimação em que os animais ficam após serem translocados



Foto: Muriqui Instituto de Biodiversidade, 2021.

4.3 Animais

Para o presente estudo, foram coletadas amostras de três fêmeas (duas adultas e uma sub-adulta) e dois machos (adultos) de nomes, respectivamente: Ecológica, Socorro, Nena, Bertolino e Luna. A primeira fêmea a chegar na Comuna do Ibitipoca foi a Ecológica em 2019, uma fêmea adulta isolada no Município de Santa Bárbara do Leste, Minas Gerais

(MG). O animal foi avistado por moradores locais e posteriormente identificada pela equipe como sendo filha de uma fêmea com origem de Santa Margarida – MG, translocada em 2006 para vida livre. Também em 2019 ocorreram duas translocações, sendo estas de dois machos provenientes do município de Lima Duarte – MG; eram de um grupo misto identificado em 2004, com registro de apenas dois machos irmãos desde 2015.

A segunda fêmea do grupo, Socorro, é uma fêmea adulta que estava isolada em Simonésia, Minas Gerais, Brasil. Foi reconhecida desde 2011 e relatada por moradores locais. Em 2019 foi translocada para a Comuna do Ibitipoca.

Em novembro de 2020, foi realizada a última translocação para o MH até a presente data, uma fêmea sub-adulta, de nome Nena, localizada no entorno do Parque Nacional do Caparaó, município de Espera Feliz, Minas Gerais (MG). Na balela 1 constam os animais envolvidos no presente projeto e seus respectivos status reprodutivos e nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10, fotos dos indivíduos Nena, Ecológica, Socorro, Bertolino e Luna respectivamente.

Tabela 1 - Animais do presente estudo e seus respectivos status reprodutivos

NOME DO ANIMAL	STATUS REPRODUTIVO
Nena	Sub-adulta não sexualmente ativa
Ecológica	Fêmea gestante
Socorro	Fêmea sexualmente ativa
Bertolino	Macho sexualmente ativo
Luna	Macho sexualmente ativo

Figura 6 - Fêmea Nena**Foto:** MARIGO, V., 2021.**Figura 7 - Fêmea Ecológica****Fonte:** BARROS, T. P., 2019.**Figura 8 - Fêmea Socorro.****Foto:** PEREIRA, P. M., 2020.**Figura 9 - Macho Bertolino****Foto:** MARIGO, V., 2021.**Figura 10 - Macho Luna.****Foto:** RIBEIRO, P. D., 2021.

4.4 Coleta de fezes

As coletas de fezes foram realizadas por biólogos da equipe do Muriqui Instituto de Biodiversidade, previamente treinados e orientados constantemente pela médica veterinária Mikaelly Frasson Testa. Durante o período de coleta de fezes houve um observador, que acompanhou os animais diariamente, no período entre 06:00 e 11:00 horas. O observador esperava o animal defecar (figura 11) para que fosse possível coletar as amostras e identificá-las individualmente. Após a defecação e com o auxílio de uma pá específica para coleta de amostras biológicas, as fezes eram coletadas e armazenadas em saco Zip Lock® número 7 (14 x 20 cm de área total). Após o armazenamento das fezes, o saco era levemente amassado para homogeneização do bolo fecal e identificado com o nome do indivíduo, nome de quem realizou a coleta, número da amostra, data e horário da coleta.

A amostra era imediatamente acondicionada em um isopor com gelo para posteriormente ser armazenada em freezer a -20°C até o descongelamento e assim, a realização do processo de extração hormonal no laboratório de patologia clínica do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e no laboratório MULTILAB, da Universidade Federal de Minas Gerais. Concomitantemente com as coletas, foi realizado o preenchimento de uma ficha de coleta de fezes (Figura 12). As coletas foram realizadas entre os dias 12/07/2020 a 01/04/2021, uma vez ao dia, no período da manhã, três vezes na semana, por animal.

Figura 11 - Observação de um *Brachyteles hypoxanthus* durante o momento de defecação.



Foto: PEREIRA, P. M., 2022.

Figura 12 - Ficha utilizada durante a coleta de fezes.

FICHA DE COLETA DE FEZES - MIB					
DATA DE CAPTURA:		LOCAL DE CAPTURA:		N° DO MICROCHIP:	
ESPÉCIE: <i>Brachyteles hypoxanthus</i>		IDADE:	SEXO:	PESO:	GRAVIDEZ: LACTANTE:
LOCAL DO RECINTO: Comuna do Ibitipoca - Muriqui's House					
ORIENTAÇÕES PARA COLETA DE FEZES					
As fezes serão coletadas no período da manhã entre 06:00 e 11:00h. Para coleta é necessário: 1) Luva de látex para procedimentos; 2) Saco tipo Zip Lock; 3) Caixa de isopor com gelo; 4) Caneta marcador da marca Sharpie. Após coletar, colocar dentro do saco, fecha-lo e homogeneizar bem o bolo fecal amassando o saco antes de congelar. Identificar as amostras com o nome do animal, data, nº da coleta em questão daquele dia (1, 2 etc), horário da coleta e congelar posteriormente todas elas a -20°C. Separar as coletas por data no congelador,					
ANOTAÇÕES GERAIS SOBRE O DIA DA COLETA					
DATA:		N° DE AMOSTRAS COLETADAS NO DIA:			
TEMP. NO MOMENTO DA COLETA (°C):		TEMP. MÍNIMA NO DIA:		TEMP. MÁXIMA NO DIA:	
ANOTAÇÕES GERAIS SOBRE O ANIMAL					
HOUE ALGUMA MUDANÇA NO RECINTO? SE SIM, QUAL?					
FOI REALIZADA ALGUMA MUDANÇA NA ROTINA DO ANIMAL (MUDANÇA DE RECINTO, DIETA, TRANSLOCAÇÕES, MANEIO, CONTENÇÃO ETC)? SE SIM, QUAL, COMO FOI REALIZADA, EM QUAL HORÁRIO?					
FOI ACRESCENTADO UM NOVO ANIMAL NO RECINTO? SE SIM, QUAL O SEXO, COMO FOI A INTERAÇÃO?					
COLOCAR AQUI OBSERVAÇÕES SOBRE O COMPORTAMENTO DO ANIMAL NO MOMENTO DA COLETA. EX: COMPORTAMENTO DE CÔPULA, PROSTRAÇÃO, ATIVO EXCESSIVAMENTE, FALTA DE APETITE, AGRESSIVIDADE, INTERAÇÃO COM OUTROS ANIMAIS (FAZER UM ETOGRAMA CONCOMITANTE COM AS COLETAS):					
COLOCAR AQUI QUALQUER EVENTO EXTERNO AO RECINTO QUE POSSA CAUSAR DISTRÚBIO NOS ANIMAL (EXEMPLO: TEVE UMA TEMPESTADE NA NOITE ANTERIOR, FOGOS DE ARTIFÍCIO, VISITANTES BARULHENTOS, CAMINHÃO PERTO DO RECINTO, CORTADOR DE GRAMA...) TUDO QUE VOCÊ ACHAR VÁLIDO:					

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

4.5 Extração Hormonal

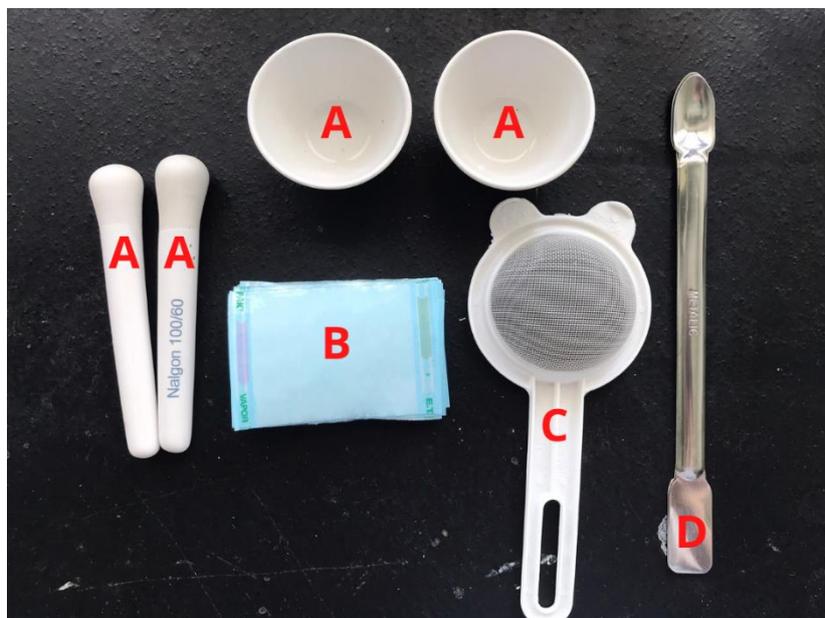
A extração hormonal foi realizada no laboratório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis em Belo Horizonte, Minas Gerais e no laboratório MULTILAB, da Universidade Federal de Minas Gerais pela pesquisadora Mikaelly Frasson Testa com auxílio de colaboradores das referidas instituições.

Para a extração dos MFG utilizou-se a técnica de Strier e Ziegler (1997). Inicialmente, as amostras de fezes foram retiradas do freezer e descongeladas em temperatura ambiente. Antes de separar a quantidade necessária para as análises, o pacote contendo o bolo fecal era amassado para homogeneização das fezes. Após homogeneização, com auxílio de uma espátula inox, o bolo fecal era separado e armazenado em tubo de fundo cônico de 15 mL identificado com o nome do animal, número correspondente da amostra e número do controle interno do laboratório.

Após a transferência das amostras para os tubos, estes eram acondicionados verticalmente dentro de uma estufa regulada a 95°C. O processo de secagem levou em média

8 horas. Após secagem, as amostras eram amassadas, com auxílio dos materiais ilustrados na figura 13. Mediante esmagamento com o auxílio de um cadinho de porcelana limpo e seco, as fezes secas eram maceradas até que restasse somente o pó (figura 14). Quando era verificado a presença de sementes e/ou fibras em excesso que poderiam prejudicar as etapas posteriores da extração, as amostras também eram peneiradas de forma que restasse somente o pó fecal (figura 15).

Figura 13 - Materiais utilizados para o procedimento de preparação da matriz seca.



NOTA: (A) Cadinho de porcelana para macerar as fezes; (B) plástico transparente para ser utilizado durante as pesagens das fezes secas; (C) peneira para retirar sujidades, fibras e sementes e; (D) uma colher inox.

Foto: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 14 - Preparação das amostras de fezes após secagem.



NOTA: (A) Fezes secas logo após saírem da estufa. (B) fezes maceradas até se tornarem pó.

Foto: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 15 - Peneiragem das amostras fecais.



NOTA: (A) Resíduo de fezes restantes na peneira; (B) Sementes e fibras encontradas nas amostras peneiradas.

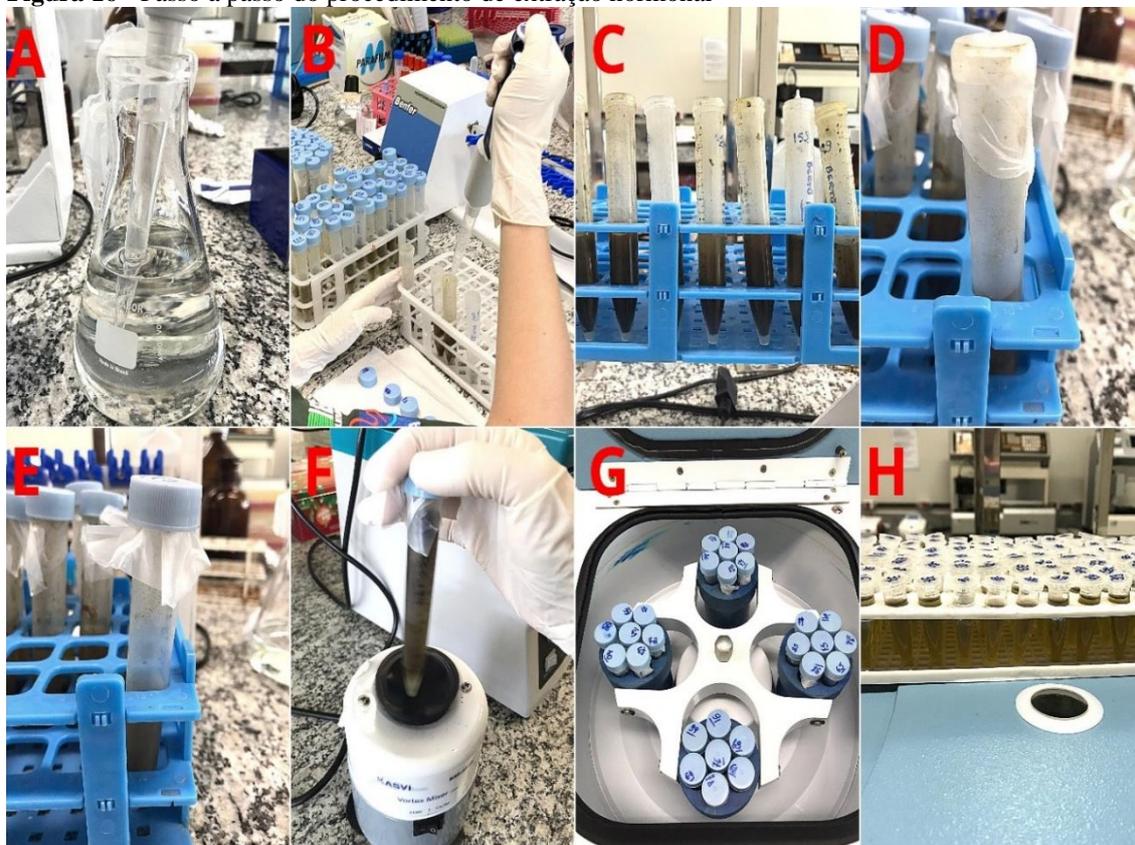
Foto: Arquivo pessoal, 2022.

As amostras em pó eram pesadas em uma balança de precisão para obter 0,1 grama de fezes. O pó que restava era acondicionado em microtubo de 2 mL e armazenado em local longe de luz e umidade para serem utilizadas em caso de retestagem. Após essa etapa a amostra separada de 0,1 g de fezes era transferida novamente para o tubo de fundo cônico original. Uma solução de 250 mL composta por 50% de água destilada recém-saída do

destilador e 50% de etanol puro 99,8% era então preparada em frasco de vidro Elenmeyer para posteriormente ser adicionada ao tubo de fundo cônico.

No tubo de fundo cônico com 0,1g de amostra seca foi acrescentado 5 mL da solução de água destilada e etanol puro. O frasco era então tampado com Parafilm® e a tampa rosqueada. Após os tubos de fundo cônico estarem prontos, o material era homogeneizado em aparelho vórtex (Phoenix, MOD AT 56) durante 5 minutos e, a seguir, centrifugados a 2.000×g por 10 minutos. Após a centrifugação, 1,5 mL do sobrenadante era retirado com o auxílio de uma pipeta e armazenado em microtubo de 2 mL. O passo a passo da preparação da fase de extração está ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Passo a passo do procedimento de extração hormonal



NOTA: (A) 5 ml de solução de água destilada + etanol sendo pipetadas; (B) Adição de 5 mL da solução em 0,1g de fezes secas dentro do tubo de fundo cônico; (C) Tubos cônicos contendo o extrato; (D) Tubos cônicos sendo tapados com parafilm® para evitar a evaporação da solução; (E) Tubos cônicos rosqueados; (F) *Vortexização* dos tubos cônicos durante cinco minutos; (G) Amostras na centrífuga para serem centrifugadas a 2.000×g por 10 minutos; (H) Após a centrifugação, foram pipetados 1,5 mL do extrato e armazenados em microtubos para posterior envio ao laboratório.

Foto: Arquivo pessoal, 2022.

4.6 Ensaio Hormonal

4.6.1 Preparação das amostras para o ensaio hormonal

Após extração, as amostras foram armazenadas em uma caixa criogênica e congeladas a -20°C . As amostras foram então transportadas em gelo seco para o laboratório Pesquisas Hormonais, onde foram preparadas para as dosagens por EIA.

A dosagem dos metabólitos hormonais foi realizada via enzimaímuensaio, utilizando um kit comercial da empresa Arbor Assay (conforme indicação do fabricante). As amostras (extrato fecal) passaram previamente por um teste de diluição. Para isso, algumas amostras foram selecionadas aleatoriamente e diluídas em três proporções diferentes, 1/10, 1/40 e 1/100, para o ensaio de enzimaímuensaio (EIE) em tampão (assay buffer) fornecido pelo fabricante. A melhor diluição verificada para as amostras foi a de 1/10, em que as concentrações obtidas nas amostras mensuradas foram interpoladas com a curva de calibração fornecida pelo kit de dosagem.

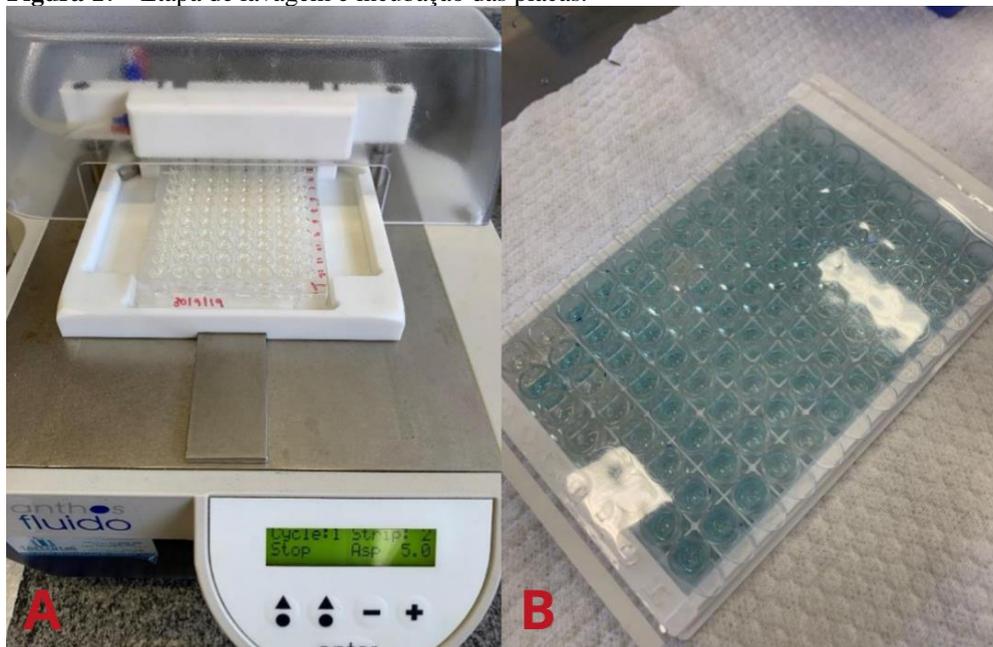
4.6.2 Dosagens Hormonais

No laboratório, as microplacas com 96 poços de alta absorção foram preenchidas com os padrões das amostras, e controles positivo, negativo e branco. Cada amostra de fezes (extrato fecal diluído) foi pipetada no volume de $50\mu\text{L}$ em duplicata em cada poço correspondente, bem como os padrões e controles, seguido das demais etapas iniciais de pré incubação. Após o tempo de incubação, as placas foram submetidas a um ciclo de 4 lavagens com $300\mu\text{L}$ de wash buffer em cada ciclo, na lavadora automática de microplacas (Modelo: Fluido 96-2 Asys Hitech Anthos) com uma solução de lavagem (NaCl 1,5M 0,05% Tween 20), objetivando eliminar o excesso de anticorpos que não se ligaram. Em seguida, as placas foram invertidas e secas por completo em papel toalha.

Após a realização dessas etapas, adicionou-se em todos os poços $100\mu\text{L}$ do substrato cromógeno (TMB *substrate*), a placa foi coberta novamente com o selador plástico e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos deixando reagir até que a densidade ótica dos poços B0 ficasse entre 0,8 a 1,0 (figura 17). Para frear a reação adicionou-se $50\mu\text{L}$ da solução *stop* (H_2SO_4) em todos os poços e uma vez passado o tempo de reação do substrato,

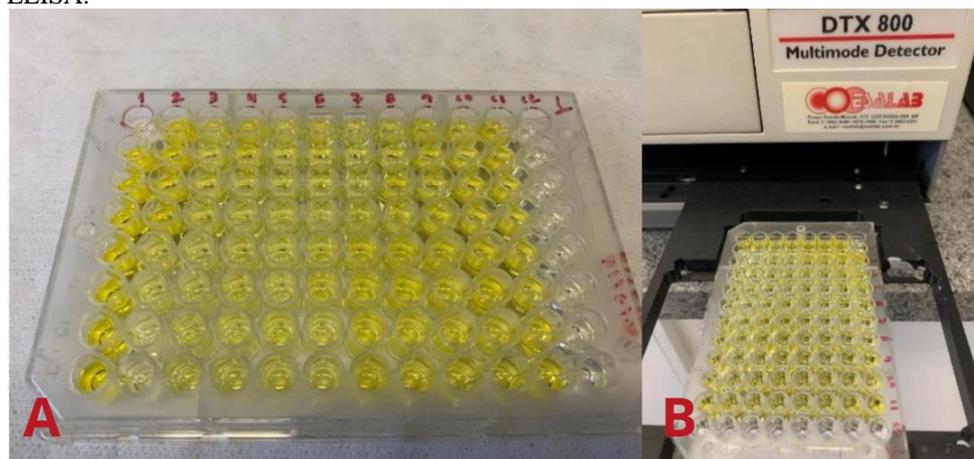
procedeu-se à leitura de absorbância com o auxílio de uma leitora automática (Modelo Multi Detector DTX 880, Beckman Coulter) utilizando o filtro 450nm (figura 18).

Figura 17 - Etapa de lavagem e incubação das placas.



NOTA: (A) Etapa de lavagem e incubação após colocação do substrato cromógeno TMB e (B) placa coberta como selador plástico e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos.
Foto: Laboratório Pesquisas Hormonais, 2022.

Figura 18 - Finalização do procedimento de ensaio e leitura da placa de ELISA.



NOTA: (A) Etapa de colocação da solução *STOP* e (B) leitura da placa de ELISA.
Foto: Laboratório Pesquisas Hormonais, 2022.

4.7 Validação

4.7.1 Validação laboratorial por paralelismo

Para validação laboratorial do ensaio de dosagem de metabólitos fecais de glicocorticoides foi realizado o teste de paralelismo utilizando matriz íntegra e depletada. Para o paralelismo de matriz íntegra, utilizou-se um *pool* do material restante das amostras de concentração mais baixa. A este *pool* de amostra foi adicionado uma concentração conhecida do padrão de cortisol, a fim de aproximá-lo do ponto máximo da curva padrão fornecida pelo conjunto comercial, no valor de 3.200pg/mL.

Após esta etapa foram realizadas diluições seriadas para construção de uma curva com valores aproximados com a fornecida pelo kit (3.200; 1.600; 800; 400; 200 e 50 pg/mL). O segundo ensaio foi o de matriz depletada, em que um volume do *pool* de amostra (5mL) foi submetido a um processo de depleção hormonal com uma solução de carvão-dextran.

Essa matriz depletada foi utilizada como um *buffer* no processo de diluição seriada da matriz íntegra. Espera-se que, com o teste de paralelismo, o ensaio realizado estará medindo o antígeno (hormônio) de interesse e identificando o fator de diluição mais adequado a ser utilizado para as amostras. Em um teste de paralelismo correto, seria obtido um deslocamento paralelo do teste com a curva padrão. Uma vez que fosse obtido bons resultados de paralelismo, identificado o fator de diluição correto e a concentração aproximada das amostras, as amostras estariam prontas para serem analisadas.

4.7.2 Validação biológica e registros comportamentais

A coleta de dados comportamentais é realizada de forma ininterrupta ao longo de todo o ano pela equipe do Muriqui Instituto de Biodiversidade. Durante cada dia de coleta de amostras fecais, os registros de comportamentos sexuais foram realizados usando o método animal focal contínuo (ALTMANN, 1974), observando os indivíduos e suas interações diariamente entre junho de 2020 e abril de 2021, dentro do período de 06:00 às 18:00 horas. O objetivo foi registrar os comportamentos sociosexuais reprodutivos na fêmea adulta Socorro e em ambos os machos adultos e sociais da fêmea Nena que estava no

recinto de aclimatação após sua translocação, para verificar como o período de adaptação dela em relação ao novo ambiente e aos outros indivíduos do recinto iria ocorrer.

Os indivíduos foram observados durante 10 minutos, com intervalos de uma hora entre os registros. Era coletado, também, informações sobre a atividade, substrato, altura que o animal encontrava-se na árvore (inferior, intermediário ou dossel), seu vizinho (qual animal estava mais próximo dele) e a que distância/raio que ele estava (R0 em contato, R1 até um metro de distância, R2 até cinco metros de distância e R3 mais que cinco metros de distância) a cada 1 minuto durante os 10 minutos observacionais totais.

As informações comportamentais coletadas foram baseadas nos códigos e no protocolo desenvolvidos por Strier (2018) para o Projeto Muriqui de Caratinga. O objetivo deste método é coletar os comportamentos sociossexuais reprodutivos para a espécie, bem como, os eventos sociais atuando como estressores a fim de avaliar se estes afetariam as concentrações de MFG. Assim, os dados comportamentais foram confrontados com as dosagens hormonais, a fim de se promover a validação biológica das dosagens hormonais.

4.8 Análise estatística

O software Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi usado para todas as análises estatísticas e para confecção dos gráficos. Os dados contínuos foram inicialmente comparados usando testes de Kolmogorov-Smirnov para normalidade. Os valores dos dados foram expressos como mediana. Ao comparar mais de dois grupos de amostras, o pós-teste de Kruskal-Wallis com Dunn foi usado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta de fezes

O método de amostragem empregado no presente trabalho resultou em 175 amostras no total, e a quantidade de amostras por animal, bem como o período de coleta de cada indivíduo, constam na tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade de amostras de fezes coletadas e período amostral de coleta de cada indivíduo.

INDIVÍDUO	QUANTIDADE DE AMOSTRAS COLETADAS	PERÍODO DE COLETA
Bertolino	39	Jul/2020 – Mar/2021
Ecológica	38	Jul/2020 – Mar/2021
Luna	36	Jul/2020 – Mar/2021
Socorro	40	Jul/2020 – Abr/2021
Nena	20	Nov/2020 – Abr/2021
Total	175	9 meses

5.2 Comportamentos sociosexuais reprodutivos

Durante a coleta de dados comportamentais (animal focal contínuo) foram identificados, basicamente, duas categorias de comportamento sociosexual na fêmea Socorro e em ambos os machos do grupo, Luna e Bertolino: 1) tentativa de cópula; e 2) comportamento proceptivo (aproximação da fêmea em relação ao macho e envio de sinais sexuais) através de expressões faciais (exibição de dentes) e inspeção de genitálias (quando um animal se aproxima do outro inspecionando sua genitália lambendo, cheirando ou puxando).

Os comportamentos específicos identificados foram: comportamento sexual de inspeção através do olfato (SEXINSC), comportamento sexual de inspeção provando (SEXINSP), comportamento sexual de lambedura (SEXINSL), comportamento sexual de puxar genitália e lambedura de mão (SEXINSPL), comportamento sexual de tentativa de

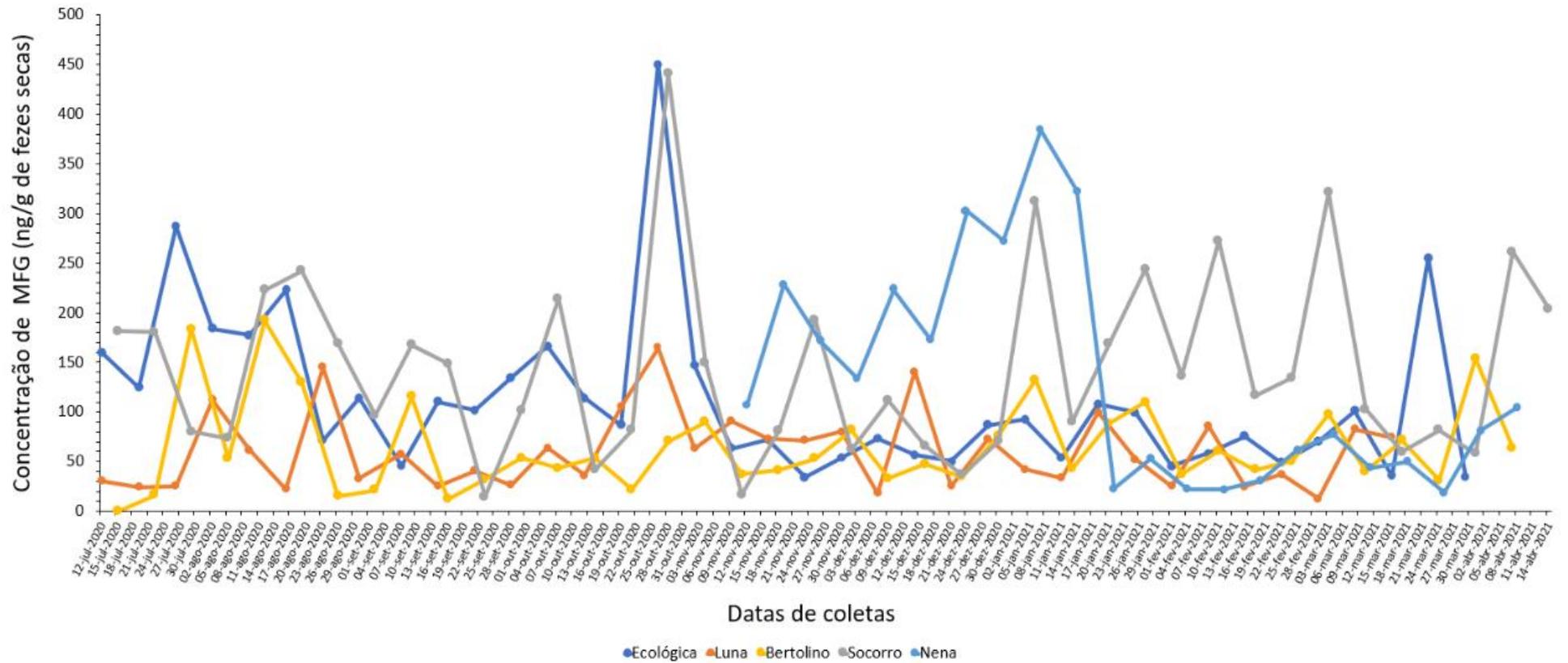
cópula (SEXT), comportamento sexual de inspeção e puxar genitália (SEXINSPPG), comportamento sexual de cheirar e lambe genitália (SEXINSCL), *Mating Twitter* (vocalizações/chilreios) (SEXMT), *Grimace* (expressão facial de sorrisos sugestivos) sem vocalizações/chilreios (SEXGR).

5.3 Dosagem dos metabólitos fecais

A dosagem dos MFG por meio da técnica de enzimaensaio, para a espécie *Brachyteles hypoxanthus* pôde ser realizado sem nenhuma intercorrência.

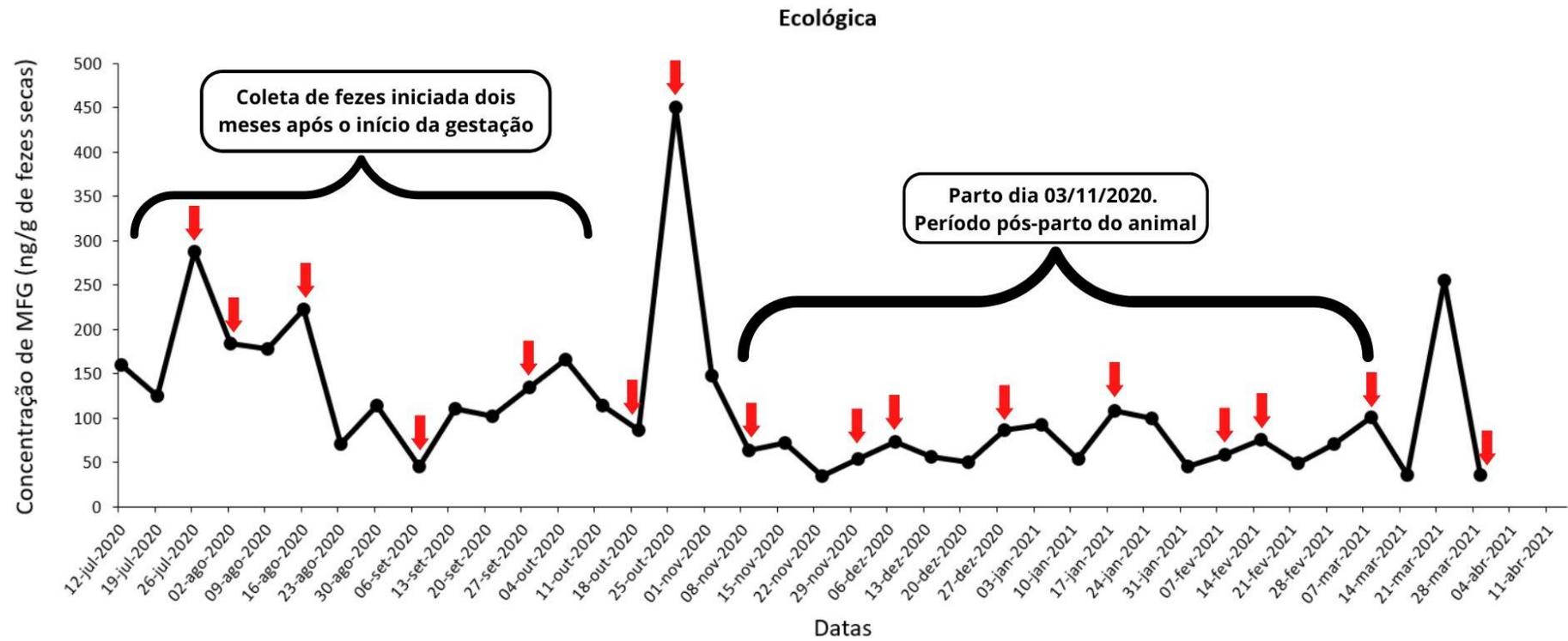
Cada concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides por animal foi disposto em tabelas para que fosse possível criar curvas de flutuações ao longo do tempo dos MFG. As concentrações de metabólitos fecais de glicocorticoides de todos os indivíduos estão dispostos na figura 19 e as concentrações individuais de cada animal nas figuras 20, 21, 22, 23 e 24.

Figura 19 - Concentrações de MFG de todos os indivíduos do grupo estudado: Ecológica, Luna, Bertolino, Socorro e Nena, no período de julho de 2020 a abril de 2021.



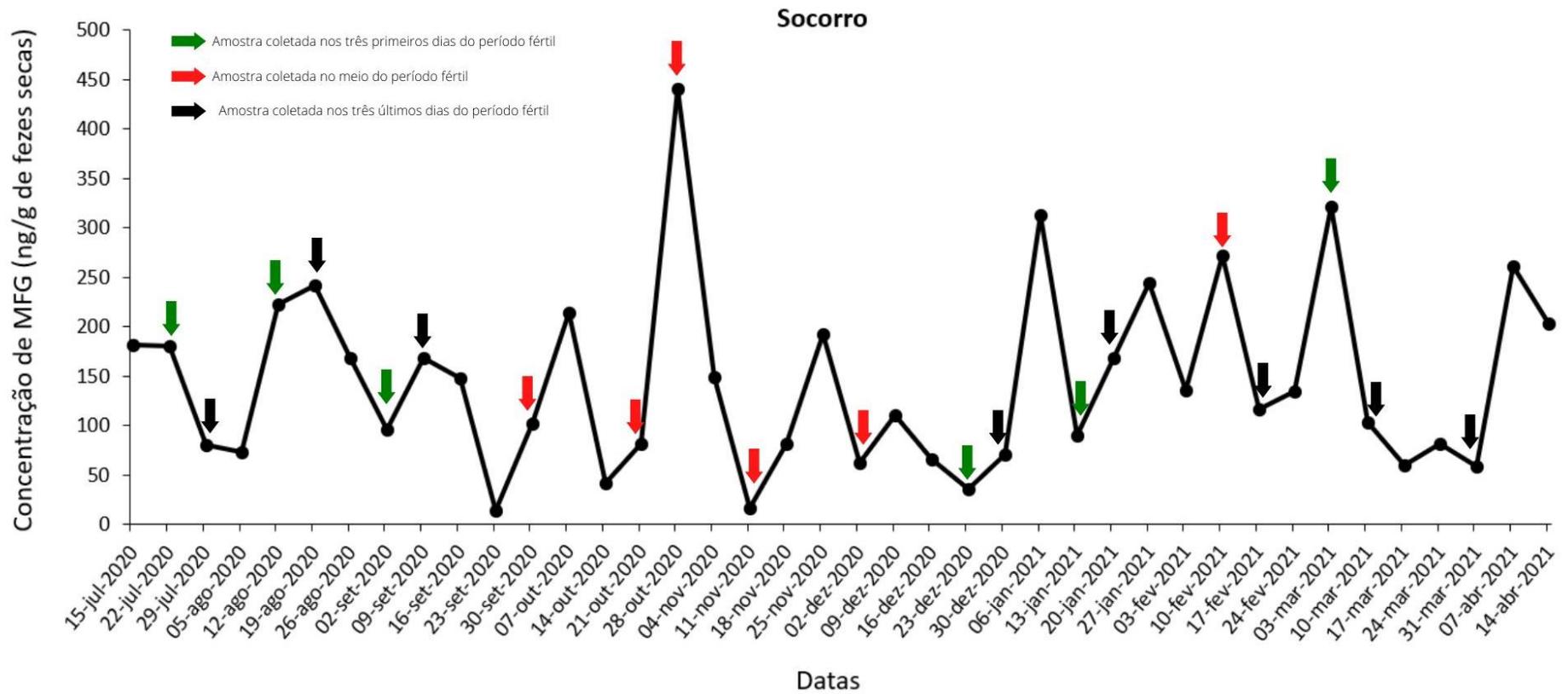
Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 20 - Concentrações de MFG da fêmea Ecológica de acordo com os períodos de gestação e pós-parto. As setas vermelhas indicam as amostras que, de acordo com os comportamentos sociosexuais coletados da fêmea Socorro, correspondiam aos períodos férteis desta.



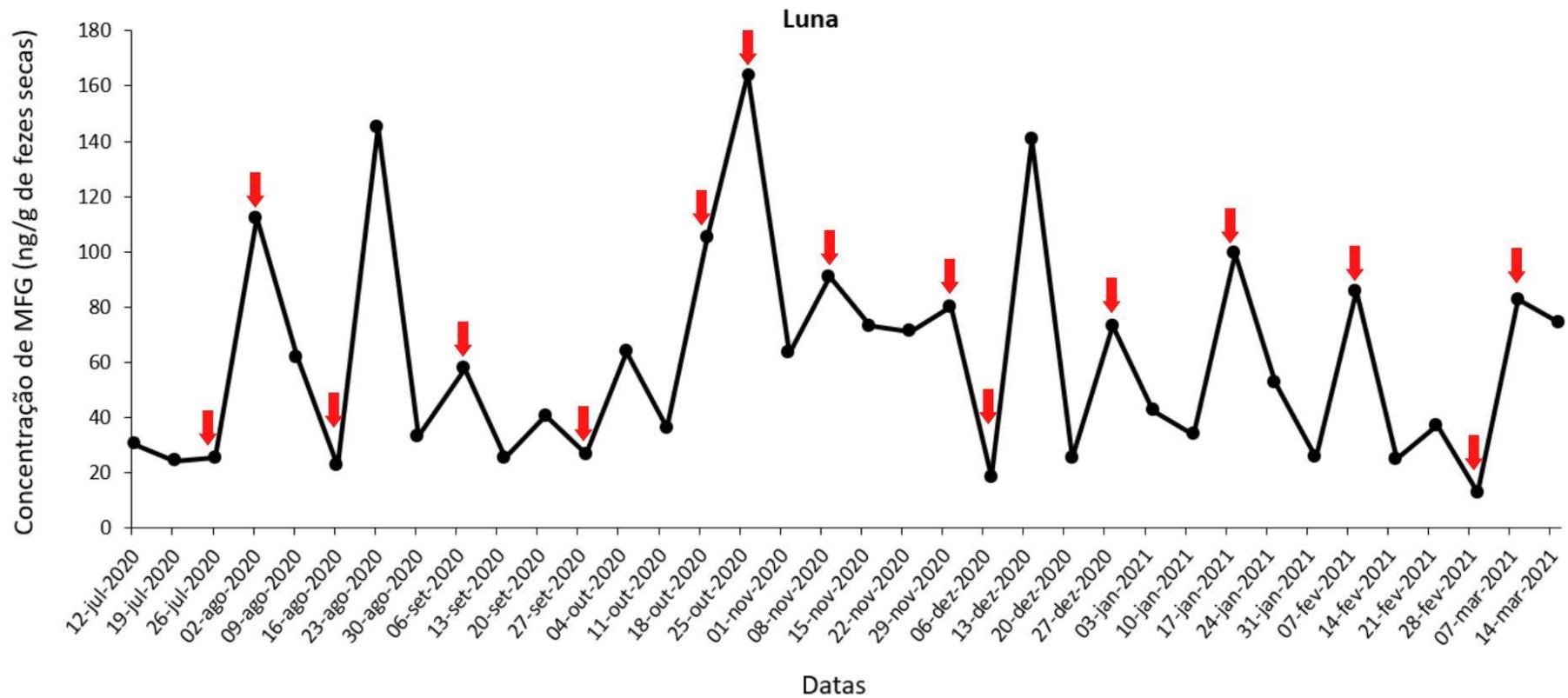
Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 21 - Concentrações de MFG da fêmea Socorro durante o período amostral. As setas indicam as coletas realizadas em diferentes momentos de seus períodos férteis.



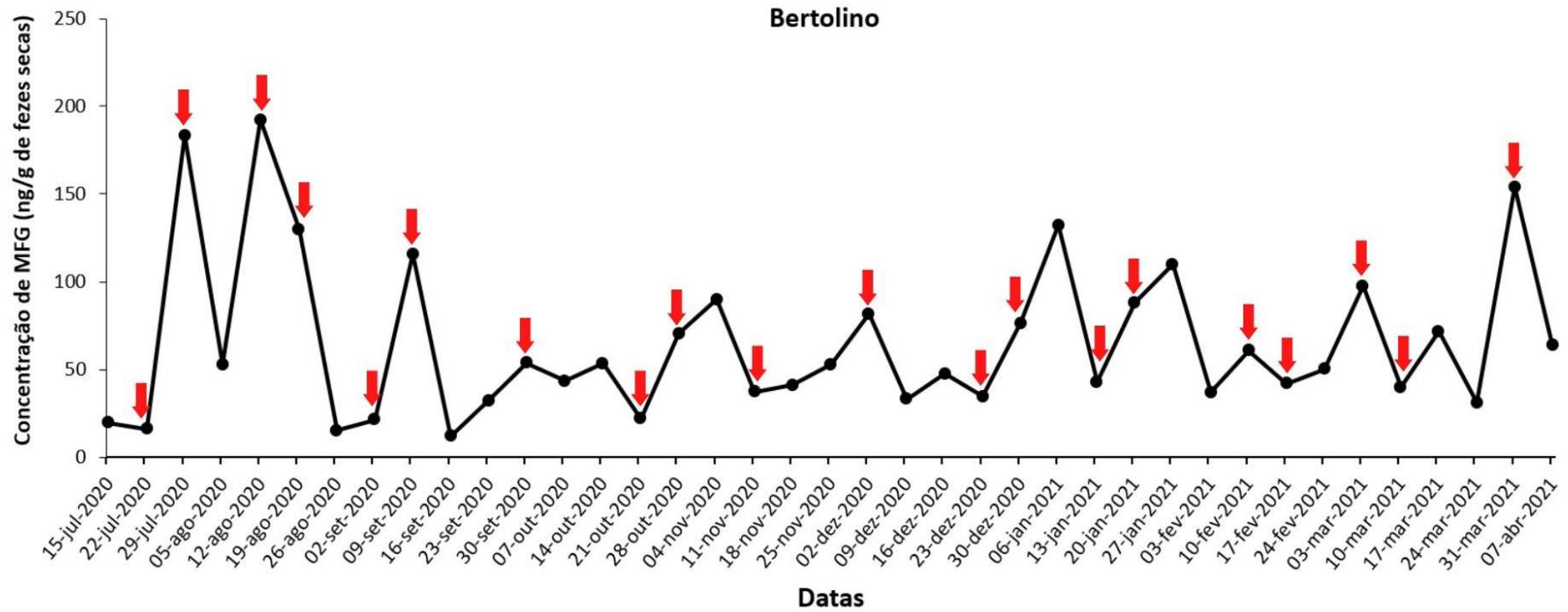
Fonte: (Arquivo pessoal, 2022).

Figura 22 - Concentrações de MFG do macho Luna durante o período amostral. As setas vermelhas indicam as amostras que, de acordo com os comportamentos sociosexuais coletados da fêmea Socorro, correspondiam aos períodos férteis desta.



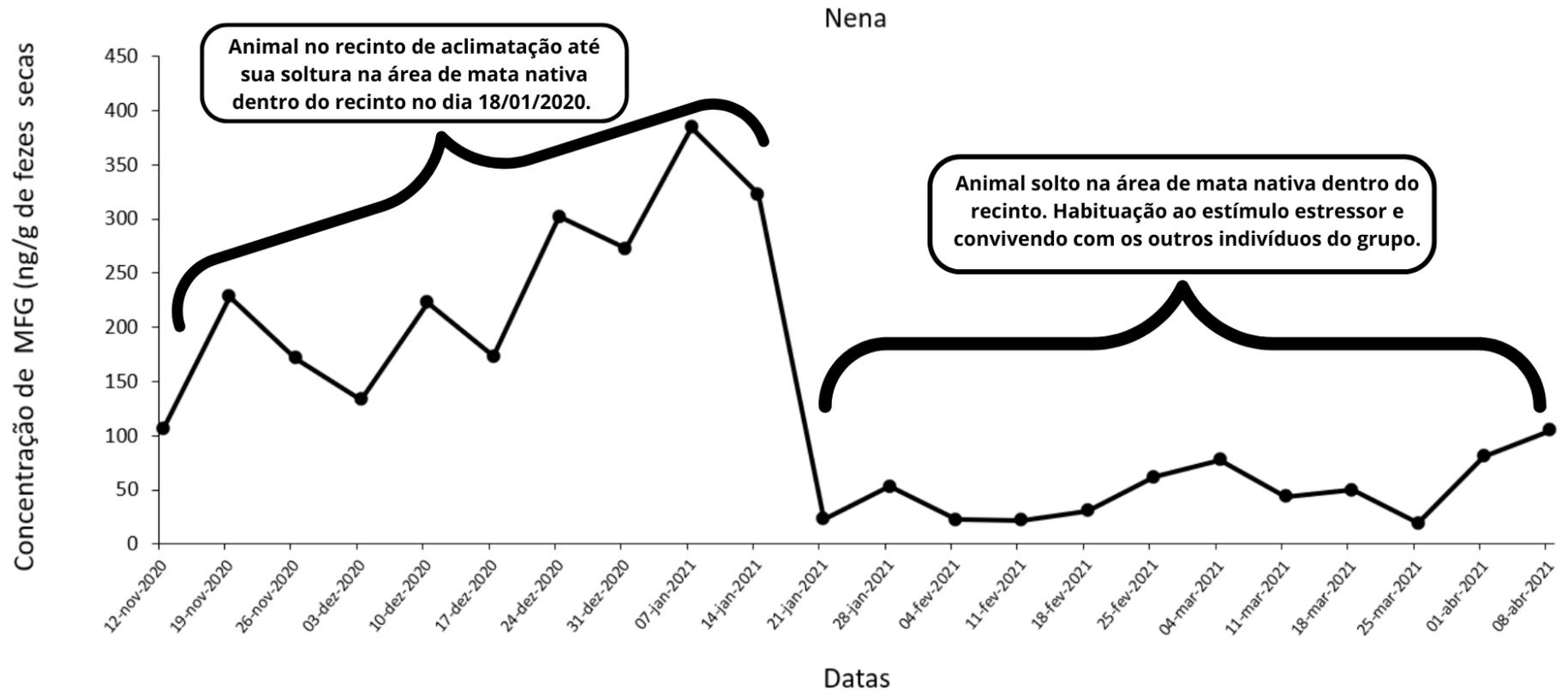
Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 23 - Concentrações de MFG do macho Bertolino durante o período amostral. As setas vermelhas indicam as amostras que, de acordo com os comportamentos sociosexuais coletados da fêmea Socorro, correspondiam aos períodos férteis desta.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 24 - Concentrações de MFG da fêmea Nena durante as fases de adaptação no recinto de aclimação e pós-soltura na área de mata nativa dentro do recinto.



Fonte: Arquivo pessoal.

A mediana das concentrações dos MFG e seus níveis máximos e mínimos nos indivíduos analisados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Mediana das concentrações dos MFG (ng/g de fezes secas) de todos os animais amostrados.

	BERTOLINO	LUNA	ECOLÓGICA	SOCORRO	NENA
MEDIANA	50,25 (12,09- 192,2)	55,10 (12,70- 145,1)	89,75 (34,12 – 287,6)	125,4 (14,47- 321,0)	93,05 (18,96- 384,4)

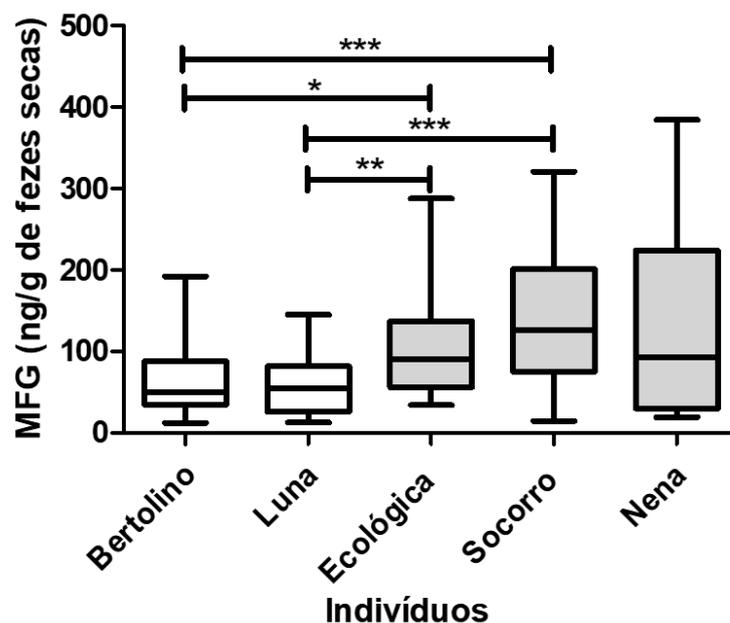
Após análise dos resultados obtidos para MFG, verificou-se que há diferença estatística entre os machos e a fêmea sexualmente ativa e entre os machos e a fêmea gestante (Mann Whitney, $p < 0,05$). Foi possível constatar também que não há diferença estatística entre as fêmeas e nem entre os machos quando comparado com a fêmea não sexualmente ativa (Mann Whitney, $p > 0,05$) (figura 25).

Figura 25 - Níveis de MFG apresentados por cada um dos indivíduos estudados e comparação estatística entre eles. Os gráficos de caixa mostram intervalos de quartis, a linha do meio indica a mediana e as laterais apresentam os valores mínimos e máximos obtidos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as concentrações de MFG nos indivíduos amostras (Mann Whitney, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). A linha superior entre os animais indica a presença de diferenças estatísticas (Kruskall-Wallis-Dunn's, $p < 0,05$) entre os animais considerando os níveis de MFG.

Nota * $p = < 0,1$

** $p = < 0,01$

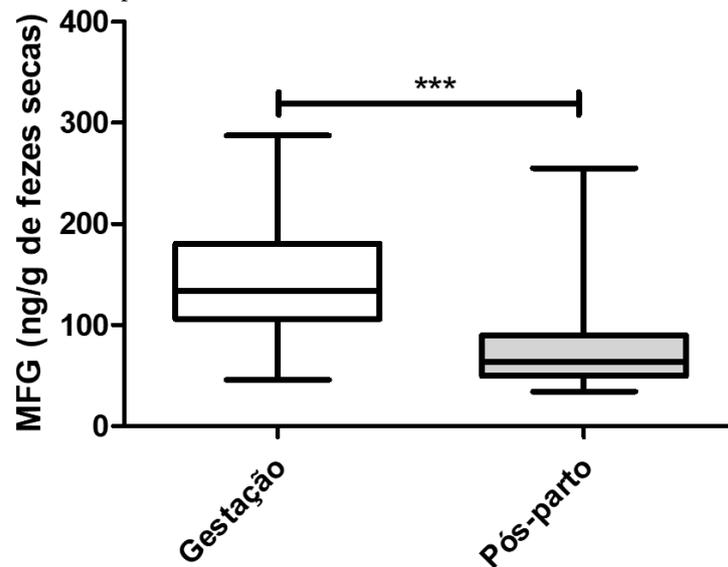
*** $p = < 0,001$



A fêmea Ecológica durante seu período gestacional apresentou uma mediana de 134,2 ng/g de fezes secas em seus níveis de MFG. Após o parto, sua mediana foi de 63,3 ng/g de fezes secas. Após as análises verificou-se que os níveis de MFG durante seu período gestacional e pós-parto são diferentes, sendo as concentrações de MFG durante seu período gestacional significativamente maior quando comparado com o pós-parto ($p < 0,05$, Mann-Whitney test) (figura 26).

Figura 26 - Diferença nas concentrações de MFG durante a gestação e pós-parto da fêmea Ecológica e comparação estatística entre eles. Os gráficos de caixa mostram intervalos de quartis, a linha do meio indica a mediana e as laterais apresentam os valores mínimos e máximos obtidos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as concentrações de MFG no indivíduo amostrado (Mann-Whitney, $***p < 0,001$). A linha superior entre os animais indica a presença (Kruskall-Wallis-Dunn's, $p < 0,05$) de diferença estatísticas entre períodos considerando os níveis de MFG.

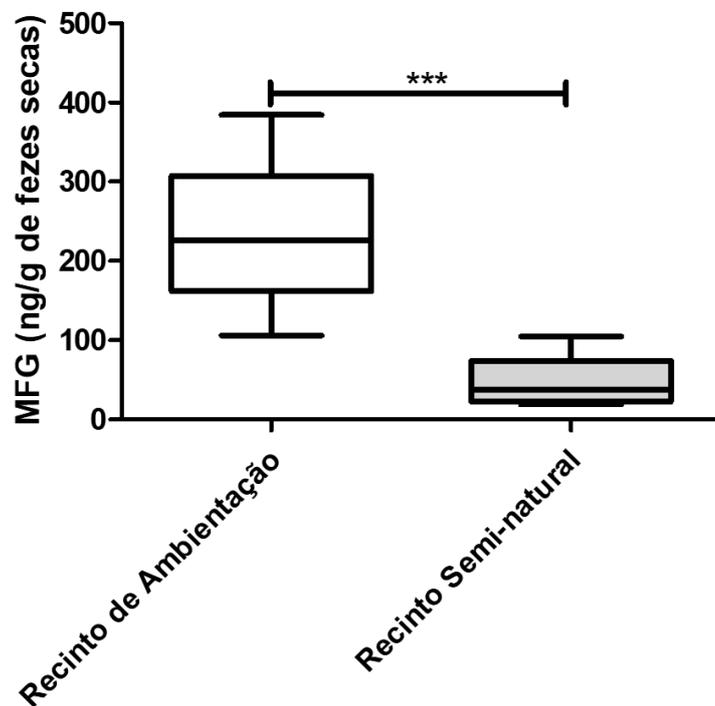
Nota: $*** p = < 0,001$.



Durante o período amostral do presente projeto, a fêmea Nena foi translocada de vida livre para cativeiro. Anteriormente à soltura no recinto seminatural, esta fêmea foi acondicionada em um recinto menor de ambientação entre os dias 12/11/2020 e 18/01/2021. Após esse período, ela foi solta no recinto com outros indivíduos do grupo. Os resultados das concentrações de MFG da Nena durante estes eventos estão demonstrados na figura 24.

Esta fêmea possui dois períodos fortemente marcados em suas concentrações de MFG: o período um, entre os dias 12/11/2020 e 18/01/2020, corresponde a processo de habituação no recinto menor de ambientação até sua soltura. Em um segundo momento, após sua soltura (período 2) no dia 18/01/2020 ao dia 08/04/2021, verificamos que a fêmea se encontrava no período de habituação ao estímulo estressor. Apesar de ter sido perseguida pelos indivíduos do grupo em momento pós-soltura, não foi verificado aumento nas concentrações de MFG. A média das concentrações de MFG desta fêmea foi de 231,7 ng/g de fezes. Após sua soltura, no período dois, sua média caiu para 46,94 ng/g de fezes secas (diferença estatisticamente significativa entre períodos, Kruskal-Wallis-Dunn's, $p < 0,05$) (figura 27).

Figura 27 - Diferença nas concentrações de MFG durante o período da fêmea Nena no recinto de aclimação e, posteriormente, na área de floresta nativa dentro do recinto e comparação estatística entre eles. Os gráficos de caixa mostram intervalos de quartis, a linha do meio indica a mediana e as laterais apresentam os valores mínimos e máximos obtidos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas encontradas entre as concentrações de MFG no indivíduo amostrado (Mann Whitney, $***p < 0,001$). A linha superior entre os animais indica a presença de diferença estatísticas entre períodos considerando os níveis de MFG (Kruskal-Wallis-Dunn's, $p < 0,05$).
Nota *** $p = < 0,001$.

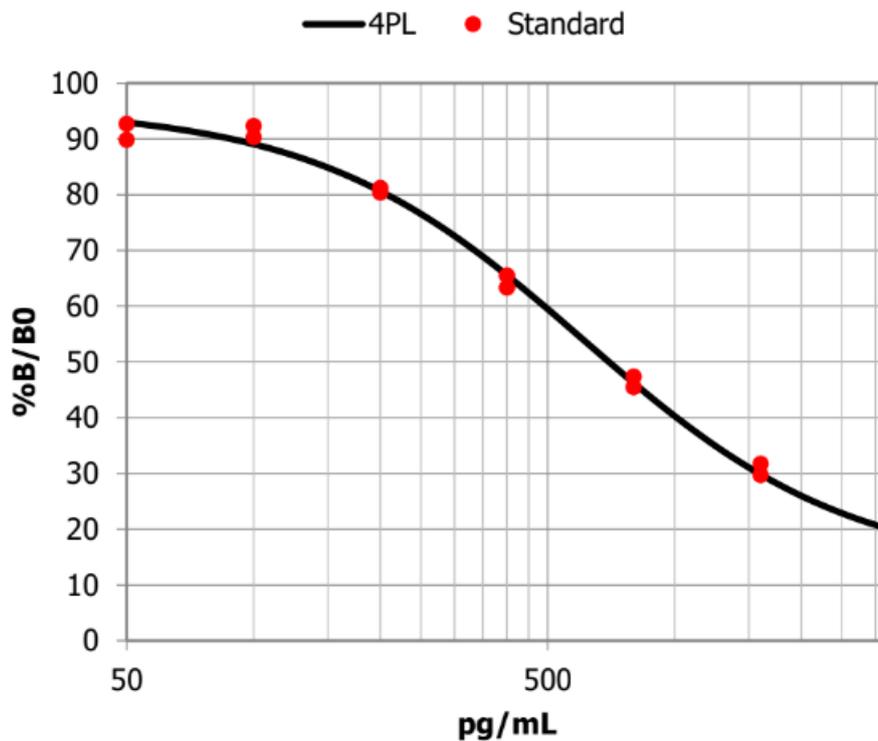


5.4. Validação laboratorial

A validação laboratorial dos ensaios de dosagens hormonais foi realizada com o teste de paralelismo. O objetivo do teste é verificar se a característica de ligação do analito endógeno aos anticorpos é a mesma do calibrador (ANDREASSON et al. 2015), resultado este encontrado em neste estudo.

Após a realizações de diluições em séries de um *pool* de extrato fecal para traçar uma linha para log (dose relativa) em relação ao limite percentual, foi obtida uma inclinação paralela, com significativa correlação entre a curva de diluição seriada obtida para o glicocorticoide e as curva padrão fornecida pelo kit de diagnóstico conforme demonstra a figura 28.

Figura 28 - Curva de validação do teste de paralelismo



Fonte: Laboratório Pesquisas Hormonais, 2022

5.5 Parâmetros de Qualidade dos Ensaios Hormonais

O controle de qualidade dos ensaios foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra-ensaio (CV intra) e inter-ensaio (CV inter) por meio de cinco

experimentos individuais. Em cada experimento, um mesmo *pool* de amostras foi utilizado em todos os ensaios, associados a controles baixo e alto com pontos de curva padrão.

O resultado do coeficiente de variação do *pool* de amostras inter-ensaio (CV inter-ensaio) foi de 9,14%, sendo aceitável para ensaios utilizando kits comerciais uma variação de até 10%. Os resultados dos CV intra e inter ensaio, valores pré-conhecidos baixo e alto seguem na tabela 4.

Tabela 4 - Coeficiente de variação (CV) inter e intra ensaio das amostras

ENSAIO	CV INTRA-ENSAIO	
	BAIXO	ALTO
1	4,63%	3,01%
2	3,94%	5,25%
3	4,75%	2,40%
4	6,73%	5,84%
5	5,36%	5,67%
CV INTER-ENSAIO	2,67%	5,05%

6 DISCUSSÃO

Pela primeira vez, indivíduos de miquiqui-do-norte, translocados de vida livre para cativeiro foram estudados acerca de sua concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides.

O sucesso na execução da metodologia de extração, bem como, dosagem hormonal em *Brachyteles hypoxanthus* corrobora com os trabalhos publicados por Strier et. al (1997 e 1999), tendo sido replicados com sucesso no presente estudo.

Em estudos de vida livre, foi reportado que fêmeas de miquiquis apresentam baixos níveis de cortisol durante sua estação reprodutiva não havendo diferenças nos níveis de MFG durante seu ciclo (STRIER et. al. 2003). Embora o poder de comparações entre as condições e fêmeas tenha sido limitado pelo pequeno número de indivíduos nesta amostra, a fêmea Socorro, não apresentou diferença estatística em seus níveis de MFG antes e durante seus ciclos reprodutivos, colaborando com os achados de Strier et al., (2003).

Nos resultados encontrados, foi verificado que as fêmeas Socorro e Ecológica apresentaram níveis mais altos de MFG quando comparados com os machos, corroborando os dados encontrado por Strier et. al. (2003) em que as fêmeas apresentam níveis mais altos de MFG quando comparadas com os machos.

É reconhecido que os hormônios gonadais exercem efeitos moduladores substanciais sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), sendo que, as fêmeas, mostram maior capacidade de resposta ao estresse em várias espécies e isso tem sido atribuído aos efeitos ativadores dos estrogênios nas fêmeas e ao efeito inibitório da testosterona nos machos (HANDA et al., 1994; MCCORMICK et al., 2002; WILSON et al., 2005; IWASAKI-SEKINO et al., 2009; SANCHEZ et al., 2010).

Há evidências consideráveis de que as fêmeas de mamíferos apresentam níveis mais altos de corticosteroides em comparação aos machos, e que essas diferenças estão relacionadas à interação com os hormônios gonadais (MCCORMICK E MATHEWS, 2007). Em estudos experimentais com humanos e primatas não-humanos, foi verificado que a reposição de testosterona reduz a sensibilidade do sistema adrenal ao hormônio liberador de corticotrofina, resultando em menor liberação de cortisol (TOUFEXIS E WILSON, 2012; LAUDENSLANGER et al., 2012). Ratos machos mostram respostas reduzidas de glicocorticoides ao estresse em comparação com seus co-específicos femininos e a magnitude dessa diminuição tem sido relacionada aos níveis individuais de testosterona nos machos (VIAU E MEANEY, 1996; VIAU, 2002), demonstrando que em várias espécies de mamíferos os níveis de MFG em machos tendem a ser menores que em fêmeas.

A fêmea Nena, que não estava sexualmente ativa durante as análises, foi a única fêmea a não apresentar diferenças estatísticas em seus níveis de MFG quando comparados com os machos. Em um estudo de Strier et al., (2000) foi verificado que os níveis de cortisol de fêmeas imaturas são semelhantes aos níveis basais encontrados nos machos durante a estação não reprodutiva, corroborando com os dados obtidos no presente estudo (STRIER et al. 1999; STRIER & ZIEGLER, 2000)

Nos estudos em muriquis-do-norte de vida livre, foi verificado variação sazonal nos níveis de glicocorticoides (STRIER et al. 1999; STRIER et al. 2003), e este padrão não foi encontrado neste grupo de cativo e, uma das possíveis causas para isto é o fato do baixo número de indivíduos no grupo em questão, animais em condições reprodutivas muito diferentes e intervalo de tempo amostral inferior a um ano. Entretanto, no estudo de Lima et al. (2021), foi verificado que em muriquis-do-sul (*Brachyteles arachnoides*) de cativo, os machos apresentaram ausência de sazonalidade na excreção de MFG.

Não foram encontradas diferenças estatísticas nos níveis de MFG entre as fêmeas, porém, devido à heterogeneidade do grupo, não é possível realizar inferências destes resultados como sendo um padrão para as fêmeas da espécie.

Em estudo realizado por Romero-Gonzalez et al. (2020), os autores descrevem que, mulheres grávidas apresentaram níveis mais elevados de cortisol quando comparados com mulheres não grávidas. Neste contexto, a fêmea Ecológica neste estudo apresentou mediana de concentrações de MFG mais alta durante a gestação (mediana de 134,2 ng/g de fezes secas) quando comparado com as medianas após o nascimento de seu filhote (mediana de 63,3 ng/g de fezes secas). É sabido que os níveis de cortisol sofrem alterações durante a gravidez, as concentrações plasmáticas de cortisol são significativamente mais altas em mulheres grávidas do que em mulheres não grávidas, e as concentrações aumentam ao longo da gestação (SMITH et al., 1990) Os níveis plasmáticos de cortisol caem significativamente dois dias após o parto e o cortisol é menor no pós-parto do que no primeiro trimestre (SMITH et al., 1990; D'ANNA-HERNANDEZ et al., 2011). A amamentação após o nascimento também está associada à diminuição do cortisol plasmático (AMICO et al., 1994). No entanto, os níveis de cortisol ainda foram significativamente maiores em mães com recém-nascido (2-4 dias de idade) do que em mulheres nulíparas controle, refletindo maior atividade do eixo HPA durante o final da gestação (KIRSCHBAUM et al., 2009).

Em primatas não humanos, o cortisol plasmático também se mostrou aumentar ao longo da gestação e cair durante o período pós-parto (GOLAND et al., 1992; SMITH et al., 1990). Da mesma forma, o cortisol urinário e fecal foi significativamente maior no pré-parto do que

no pós-parto-parto (ALTMANN et al., 2004; BARDI et al., 2003). Em *Macaca mulatta*, os níveis de cortisol também aumentaram durante a gestação (GRANT et al., 2017), e esses níveis foram mais altos durante o final da gravidez e início da lactação do que mais tarde no período pós-parto (DETTMER et al., 2015). Neste contexto, os dados de MFG obtidos a partir das fezes da fêmea Ecológica parecem corroborar os resultados obtidos em fêmeas de primatas não-humanos e mulheres.

A Nena, fêmea translocada de vida livre para cativeiro, apresentou concentrações altas e crescentes de MFG durante o período em que ficou no recinto de aclimação até ser solta na área de mata nativa dentro do recinto semi-natural. Este período foi intensamente marcado por eventos agonísticos entre ela e os membros do grupo que se apresentavam na área de floresta nativa do recinto, pois estes animais iam até o recinto de aclimação e, na parte superior, emitiam vocalizações e expressavam comportamentos agonístico para a fêmea em questão. Esta por sua vez era vista extremamente acuada na parte inferior do recinto e vocalizando.

Sabe-se que mover um animal dentro ou entre instalações pode induzir efeitos fisiológicos e comportamentais em decorrência do estresse causado pela alteração ambiental (LANDI et al., 1982; MCGLONE et al., 1993; VAN RUIVEN et al., 1998; OBERNIER et al., 2006). No entanto, existem poucos dados sobre o tempo necessário para adaptação às novas condições ambientais e sobre os fatores que podem facilitar esse processo em primatas neotropicais (WOLFENSOHN, 1997).

Em particular, apenas alguns poucos estudos abordando o estresse de translocação foram conduzidos em primatas não humanos (HONESS et al., 2004; SCHAFFNER E SMITH 2005; WATSON et al., 2005; DAVENPORT et al., 2008; REIMERS et al., 2007; DUFOUR et al., 2011; SCHAPIRO et al., 2012; YAMANASHI et al., 2016). Alguns destes estudos avaliaram as modificações comportamentais ou fisiológicas induzidas pela realocação e transferência em grupos sociais destes animais (HONESS et al., 2004; DUFOUR et al., 2011; SCHAPIRO et al., 2012). Davenport et al. (2006) e Yamanashi et al. (2016) encontraram níveis aumentados de cortisol em longo prazo após a realocação entre cativeiros.

Acredita-se que, manter um animal de vida livre em um recinto que possibilite o animal ter contatos com os indivíduos que estão soltos seja benéfico para a aproximação dos indivíduos e habituação dos mesmos. Porém, devido ao fato do animal que está dentro do recinto de aclimação estar em uma área menor e cercada, sem possibilidade de fuga, fornece ao animal uma situação de estresse, e isso pôde ser comprovado pelo aumento dos níveis de MFG deste indivíduo neste período de adaptação ao novo ambiente, após o processo de translocação. Neste contexto, alternativas, como por exemplo, o condicionamento do animal em fase de adaptação

em uma gaiola de aclimatação maior e com a presença de pontos de fuga, seja benéfico para minimizar o estresse de adaptação nessa fase do processo de translocação.

Ademais, afastar o recinto de aclimatação para torná-lo, inclusive, um local típico de quarentena em que outros animais não possuem contato com os indivíduos isolados, é benéfico para a saúde e bem-estar dos animais envolvidos, visto que indivíduos capturados em vida livre, como a Nena, não possuem história clínica conhecida. O período de quarentena para um animal recém capturado e sem história clínica é fundamental antes de qualquer tipo de contato com os demais animais do cativeiro (KOCK et al., 2010).

A fêmea Nena permaneceu no recinto de aclimatação durante dois meses, tempo necessário para que todos os exames médicos ficassem prontos uma vez que a mesma não possuía histórico clínico. A avaliação de saúde destes animais por meio de coletas não invasivas de fezes, incluindo dosagens hormonais, visa prevenir a introdução de muriquis doentes ou portadores de patógenos que representem uma ameaça potencial para outros animais e humanos no local de soltura, aumentando a chance de sobrevivência dos indivíduos que estão sendo translocados e otimizando o sucesso da reintrodução posterior.

Após soltura na área de floresta nativa do recinto, a Nena sofreu perseguições na mata até que fosse aceita no grupo. Porém, não foi verificado em suas análises hormonais aumentos nos níveis de MFG nesse período. Uma possível justificativa para isso seria o fato de a Nena ser uma fêmea sub-adulta imigrante. Em vida livre as fêmeas sub-adultas de muriqui-do-norte se dispersam antes do início da atividade sexual e da puberdade (STRIER E ZIEGLER, 2000). Após a migração em seu novo grupo, as fêmeas acompanham o grupo a distância e até serem aceitas, sofrem perseguições e *display* agonísticos (PRINTES & STRIER, 1999).

As fêmeas imigrantes são periféricas, porém, tendem a se associar mais com machos adultos e menos com fêmeas adultas em seu novo grupo (PRINTES E STRIER 1999). As relações lúdicas que pelo menos alguns imigrantes estabelecem com jovens menores também podem contribuir para a sua integração e aceitação final (STRIER, 1999). Esse comportamento foi visto neste grupo de estudo, uma vez que a Nena se aproximou fortemente em um primeiro momento com o Eliot, macho, filhote da Ecológica.

É sabido que translocação tem um alto potencial para causar estresse crônico porque consiste em múltiplos estressores agudos iniciando múltiplas respostas consecutivas de estresse agudo. Tais estressores incluem captura, manuseio, transporte, cativeiro e soltura em um novo território. (KENAGY & PLACE 2000; GROOMBRIDGE et al, 2004; OERS & CARERE, 2007; LYNN & PORTER 2008; FRANCESCHINI et al., 2008; DELEHANTY & BOONSTRA, 2009).

O estresse crônico envolvido em processos de translocação pode, inclusive, ocasionar a interrupção do eixo reprodutivo levando à diminuição da capacidade reprodutiva (DHABHAR & MCEWEN, 1997; BERGA, 2008). Todos estes efeitos merecem investigação em processos de translocações futuros, associado às coletas de fezes para dosagens hormonais em períodos anteriores, durante e após procedimentos de translocação. Essas investigações serão fontes de informação para todo o planejamento de captura como, equipe que realizará os procedimentos, insumos e materiais, planejamento de todas as etapas, transporte e habituação do animal em seu novo local.

Nesta pesquisa foi realizada a validação biológica mediante avaliação dos eventos sociais do grupo de análise associando-os com as análises hormonais de MFG. Os glicocorticoides podem estar envolvidos na modulação de uma ampla variedade de comportamentos, permitindo que os indivíduos montem uma resposta adequada ao estressor ou desafio (SAPOLSKY et al., 2000; MCEWEN E WINGFIELD, 2003). Glicocorticoides elevados ocorrem em resposta a perturbações ambientais ou ecológicas e estresse psicossocial associado a desafios sociais (REEDER E KRAMER, 2005), sendo este último de particular importância para animais sociais como os primatas (SAPOLSKY, 2005).

Um estudo descrito por Pizzutto et. al. (2008) realizou uma análise comparativa dos níveis de corticoides fecais de chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*). Para a validação fisiológica deste estudo, foi utilizada a introdução de técnicas de enriquecimento ambiental como causador de aumento dos níveis de cortisol fecal. Os resultados demonstraram claramente que houve variação significativa dos níveis fecais de corticosteroides entre as diferentes fases analisadas, refletindo as variações da intensidade das respostas do organismo animal aos diferentes estímulos ambientais, neste caso, atuando como estressores. Dessa maneira, foram detectadas as alterações fisiológicas esperadas, caracterizando a validação fisiológica.

É esperado, portanto, que o ingresso de um novo animal no grupo, neste caso atuando como estressor, desencadeasse o aumento nos níveis de MFG. Foi possível verificar o efeito do período no recinto de aclimatação nos MFG da Nena apresentando altos níveis, bem como, foi possível verificar também do ponto de vista comportamental, eventos agonísticos entre os indivíduos do grupo de estudo quando estes ficavam na parte superior do recinto de aclimatação, onde a fêmea translocada passou um período, atuando, mais uma vez, como estressores. Colaborando, portanto, com os achados de Pizzuto et. al. (2008), Reeder e Kramer (2005) e Sapolsky, (2005) em que eventos sociais como ingresso de um novo indivíduo no grupo, atuando este como um estressor, afetam os níveis de MFG.

7 CONCLUSÕES

- A técnica de enzimaensaio mostrou-se válida para a dosagem de metabólitos fecais de glicocorticoides na espécie *Brachyteles hypoxanthus ex situ*;
- Não houve determinação de padrão temporal (sazonalidade) na excreção de MFG nas amostras analisadas;
- Os níveis de MFG foram substancialmente maiores em fêmeas sexualmente ativas do que os nos machos;
- Não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de MFG entre as fêmeas do estudo;
- Não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de MFG entre os machos do estudo;
- Os níveis de MFG na fêmea gestante, no período da gestação, foi maior do que no período pós-parto;
- Os níveis de MFG na fêmea translocada de vida livre para cativeiro foram mais altos, comparativamente no período em recinto de ambientação, que em recinto semi-natural;
- Foi possível realizar a validação laboratorial dos ensaios hormonais, por paralelismo e validação biológica.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da presente pesquisa fornecem uma nova perspectiva sobre a endocrinologia dos miquis-do-norte *ex situ*. Foi possível verificar que apesar do manejo de populações *ex situ* ser fundamental para a conservação de espécies, é imprescindível garantir que os indivíduos estejam viáveis e saudáveis por meio da mitigação de eventos estressantes.

Com estes resultados foi possível constatar que apesar da composição do grupo ser heterogênea nos momentos das análises, os eventos sociais influenciam os níveis de glicocorticoides de indivíduos em ambientação. Neste contexto, precisamos aprofundar os estudos em outros indivíduos, que virão a compor este grupo para entender de forma mais clara como os níveis hormonais observados se comportam neste período.

A restauração de espécies ameaçadas através da translocação pode depender do sucesso na natureza desses indivíduos. Compreender e aliviar o estresse, sobretudo o crônico, induzido pela translocação, é um importante desafio na restauração de populações de animais selvagens ameaçadas.

Em particular, estes resultados podem ajudar a identificar e reduzir, sempre que possível, o número de agentes estressores a que os miquis translocados são submetidos, a fim de minimizar os efeitos do estresse crônico durante e após a translocação. Apesar de conseguirmos avaliar somente um indivíduo em suas etapas de captura e translocação, vimos que os processos de translocação, adaptação e introdução em um novo grupo podem gerar diversos eventos estressores em qualquer fase de sua execução.

Outro fator que deve ser melhor estudado é o tempo que um *Brachyteles hypoxanthus* deve ser mantido em cativeiro como período de quarentena até ser solto em um novo grupo e/ou local. Ademais, é importante o trabalho em conjunto entre os profissionais do bem-estar animal e da conservação animal, bem como, estratégias de *zoo design* para o recinto, sejam levados em consideração no programa de manejo estratégico da espécie visando a diminuição do estresse durante o período que os animais ficam no recinto de ambientação.

Apesar das mudanças estruturais do recinto e abordagens no manejo serem necessárias, diversos achados desta pesquisa complementam os encontrados em *Brachyteles hypoxanthus in situ* como, por exemplo, ausência de mudanças nos MFG em fêmeas e machos durante os ciclos reprodutivos, comportamento social da fêmea imigrante e de outros indivíduos do grupo durante seu período no recinto de ambientação e após ser solta no recinto semi-natural, e níveis superiores de MFG em fêmeas quando comparados com machos.

Isso demonstra que o cativeiro não afetou negativamente alguns comportamentos e características da espécie. Ademais, o nascimento de um filhote na área de mata nativa do recinto, semi-natural durante o período amostral, fruto de uma cópula entre dois indivíduos translocados de vida livre para cativeiro, representa que, apesar das mudanças necessárias, o trabalho *ex situ* está sendo feito de forma correta, com resultados positivos e novas análises como esta devem ser replicadas para outros indivíduos alvos do manejo estratégico para a espécie.

Com informações semelhantes às que foram obtidas no presente estudo, maiores dados acerca dos programas de captura poderão ser obtidos e maiores análises dos efeitos do estresse sobre os indivíduos translocados, em cada etapa dos programas de translocação de primatas, podem ser elucidadas.

9 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. C. O mono *Brachyteles arachnoides* (E. Geoffroy) – Situação atual da espécie no Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. ABC, Rio de Janeiro, 53 pp., 1971.

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3-4, p. 227-266, 1974.

ALTMANN, J.; LYNCH, J. W.; NGUYEN, N.; ALBERTS, S. C.; & GESQUIERE, L. R. Life-history correlates of steroid concentrations in wild peripartum baboons. **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 64, n. 1, p. 95-106, 2004.

AMICO, J. A.; JOHNSTON, J. M.; VAGNUCCI, A. H. Suckling-induced attenuation of plasma cortisol concentrations in postpartum lactating women. **Endocrine research**, v. 20, n. 1, p. 79-87, 1994.

ANDREASSON, U.; PERRET-LIAUDET, A.; VAN WAALWIJK VAN DOORN, L. J.; BLENNOW, K.; CHIASSERINI, D.; ENGELBORGHES, S.; ... & TEUNISSEN, C. E. A practical guide to immunoassay method validation. **Frontiers in neurology**, v. 6, p. 179, 2015.

ANGELOUSI, A; MARGIORIS, A. N.; TSATSANIS, C ACTH action on the adrenals. **Endotext [Internet]**, 2020.

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

BARDI, M.; SHIMIZU, K.; BARRETT, G. M.; BORGOGNINI-TARLI, S. M.; & HUFFMAN, M. A. Peripartum cortisol levels and mother-infant interactions in Japanese macaques. **American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists**, v. 120, n. 3, p. 298-304, 2003.

BEEHNER, J. C.; WHITTEN, P. L. Modifications of a field method for fecal steroid analysis in baboons. **Physiology & behavior**, v. 82, n. 2-3, p. 269-277, 2004.

BEKHBAT, M.; GLASPER, E. R.; ROWSON, S. A.; KELLY, S. D.; & NEIGH, G. N. Measuring corticosterone concentrations over a physiological dynamic range in female rats. **Physiology & behavior**, v. 194, p. 73-76, 2018.

BERGA, S. L. Stress and reproduction: a tale of false dichotomy?. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 867-868, 2008.

BLAS, J.; BORTOLOTTI, G. R.; TELLA, J. L.; BAOS, R.; & MARCHANT, T. A. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8880-8884, 2007.

BONIER, F.; MOORE, I. T.; MARTIN, P. R.; ROBERTSON, R. J. The relationship between fitness and baseline glucocorticoids in a passerine bird. **General and comparative endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 208-213, 2009.

BOONSTRA, R.; SINGLETON, G. R. Population declines in the snowshoe hare and the role of stress. **General and comparative endocrinology**, v. 91, n. 2, p. 126-143, 1993.

BOSSON, C.O.; PALME, R.; BOONSTRA, R. Assessment of the stress response in Columbian ground squirrels: laboratory and field validation of an enzyme immunoassay for fecal cortisol metabolites. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 82, n. 3, p. 291-301, 2009.

BROOM, D. M. Animal welfare: concepts and measurement. **Journal of animal science**, v. 69, n. 10, p. 4167-4175, 1991.

BUCHANAN, K. L., & GOLDSMITH, A. R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. **Animal Behaviour**, v. 67, p. 183-185, 2004.

BUSCH, D.S; HAYWARD, L.S. Stress in a conservation context: a discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. **Biological Conservation**, v. 142, n. 12, p. 2844-2853, 2009.

CARNEGIE, S. D.; FEDIGAN, L. M.; ZIEGLER, T. E. Social and environmental factors affecting fecal glucocorticoids in wild, female white-faced capuchins (*Cebus capucinus*). **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 9, p. 861-869, 2011.

CAVIGELLI, S. A. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. **Animal behaviour**, v. 57, n. 4, p. 935-944, 1999.

CERDA-MOLINA, A. L.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; DÍAZ-DÍAZ, G.; MEJÍA-VARAS, F.; CHAVIRA, R.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Housing with females increases testosterone and cortisol levels in captive groups of black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **Zoo Biology**, v. 31, n. 4, p. 490-497, 2012.

CHAPMAN, C. A.; WASSERMAN, M. D.; GILLESPIE, T. R.; SPEIRS, M. L.; LAWES, M. J., SAJ, T. L.; ZIEGLER, T. E. Do food availability, parasitism, and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments?. **American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists**, v. 131, n. 4, p. 525-534, 2006.

CHARBONNEL, N.; CHAVAL, Y.; BERTHIER, K.; DETER, J., MORAND, S. PALME, R.; COSSON, J. F. Stress and demographic decline: a potential effect mediated by impairment of reproduction and immune function in cyclic vole populations. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 1, p. 63-73, 2008.

CHAVES, P. B.; PAES, M. F.; LOURO, I.; MENDES, S. L.; STRIER, K. B.; FAGUNDES, V. Noninvasive genetic sampling of endangered miqui (Primates: Atelidae): efficiency of fecal DNA extraction. **Genetic and Molecular Biology**, 29: 750–754, 2006.

CHAVES, P. B.; ALVARENGA, C. S.; POSSAMAI, C. D. B.; DIAS, L. G.; BOUBLI, J. P.; STRIER, K. B.; ... & FAGUNDES, V. Genetic diversity and population history of a critically endangered primate, the northern miqui (*Brachyteles hypoxanthus*). **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20722, 2011.

CHAVES, P. B.; MAGNUS, T.; JERUSALINSKY, L.; TALEBI, M.; STRIER, K. B.; BREVES, P.; ... & BONATTO, S. L. Phylogeographic evidence for two species of murequi (genus *Brachyteles*). **American Journal of Primatology**, v. 81, n. 12, p. e23066, 2019.

CHROUSOS, G. P.; RENQUIST, D.; BRANDON, D.; EIL, C.; PUGHEAT, M.; VIGERSKY, R.; ... & LIPSETT, M. B. Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediated mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 6, p. 2036-2040, 1982.

COE, C. L.; LEVINE, S. Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in the squirrel monkey. **American Journal of Primatology**, v. 35, n. 4, p. 283-292, 1995.

CREEL, S.; FOX, J. E.; HARDY, A.; SANDS, J.; GARROTT, B. O. B.; & PETERSON, R. O. Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk. **Conservation Biology**, v. 16, n. 3, p. 809-814, 2002.

CUNHA, U. M. **Comportamento locomotor e uso da cauda de murequi-do-norte *Brachyteles hypoxanthus* Wied, 1820 (Primates, Atelidae) em cativeiro e suas implicações para o manejo da espécie.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 45, 2022.

CYR, N. E.; ROMERO, L. M. Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success. **General and comparative endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 82-89, 2007.

CYR, N. E.; ROMERO, L. M. Fecal glucocorticoid metabolites of experimentally stressed captive and free-living starlings: implications for conservation research. **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, n. 1, p. 20-28, 2008.

DALLMAN, M. F.; BHATNAGAR, Se. Chronic stress and energy balance: role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Comprehensive physiology**, p. 179-210, 2010.

D'ANNA-HERNANDEZ, K. L.; ROSS, R. G.; NATVIG, C. L.; LAUDENSLAGER, M. L. Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout

pregnancy: comparison to salivary cortisol. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 2, p. 348-353, 2011.

DANTZER, B.; FLETCHER, Q. E.; BOONSTRA, R.; SHERIFF, M. J. Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species?. **Conservation Physiology**, v. 2, n. 1, p. cou023, 2014.

DAVENPORT, M. D.; LUTZ, C. K.; TIEFENBACHER, S.; NOVAK, M. A.; MEYER, J. S. A rhesus monkey model of self-injury: effects of relocation stress on behavior and neuroendocrine function. **Biological psychiatry**, v. 63, n. 10, p. 990-996, 2008.

DAVENPORT, M. D.; TIEFENBACHER, S.; LUTZ, C. K.; NOVAK, M. A.; MEYER, J. S. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. **General and comparative endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 255-261, 2006.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463-475, 2005.

DE VILLIERS, M. S.; COOPER, J.; RYAN, P. G. Individual variability of behavioural responses by Wandering Albatrosses (*Diomedea exulans*) to human disturbance. **Polar Biology**, v. 28, n. 4, p. 255-260, 2005.

DEHNHARD, M.; NAIDENKO, S.; FRANK, A.; BRAUN, B.; GÖRITZ, F.; JEWGENOW, K. Non-invasive monitoring of hormones: a tool to improve reproduction in captive breeding of the *Eurasian lynx*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 74-82, 2008.

DELEHANTY, B.; BOONSTRA, R. Impact of live trapping on stress profiles of Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, n. 2, p. 176-182, 2009.

DETTMER, A. M.; ROSENBERG, K. L.; SUOMI, S. J.; MEYER, J. S.; NOVAK, M. A. Associations between parity, hair hormone profiles during pregnancy and lactation, and infant development in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131692, 2015.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. **Brain, behavior, and immunity**, v. 11, n. 4, p. 286-306, 1997.

DICKENS, M. J.; ROMERO, L.; MICHAEL, A. Consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. **General and comparative endocrinology**, v. 191, p. 177-189, 2013.

DUFOUR, V.; SUEUR, C.; WHITEN, A.; BUCHANAN-SMITH, H. M. The impact of moving to a novel environment on social networks, activity and wellbeing in two new world primates. **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 8, p. 802-811, 2011.

EMMONS, L. H.; GENTRY, A. H. Tropical forest structure and the distribution of gliding and prehensile-tailed vertebrates. **The American Naturalist**, v. 121, n. 4, p. 513-524, 1983.

ENGH, A. L.; BEEHNER, J. C.; BERGMAN, T. J.; WHITTEN, P. L.; HOFFMEIER, R. R.; SEYFARTH, R. M.; & CHENEY, D. L. Female hierarchy instability, male immigration and infanticide increase glucocorticoid levels in female chacma baboons. **Animal behaviour**, v. 71, n. 5, p. 1227-1237, 2006.

FAGUNDES, V. Conservation genetics of the murequi: past, present and future. **Neotropical Primates**, 13: 85-91, 2005.

FANSON, K. V.; NÉMETH, Z.; RAMENOFSKY, M.; WINGFIELD, J. C.; BUCHANAN, K. L. Inter-laboratory variation in corticosterone measurement: Implications for comparative ecological and evolutionary studies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 12, p. 1745-1754, 2017.

FENG, X.; WANG, L.; YANG, S.; QIN, D.; WANG, J.; LI, C.; ... & HU, X. Maternal separation produces lasting changes in cortisol and behavior in rhesus monkeys. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 34, p. 14312-14317, 2011.

FERRAZ, D. D. S.; TABACOW, F.; MITTERMEIER, R. A.; MELO, F.; BOUBLI, J.; JERUSALINSKY, L.; TALEBI, M. *Brachyteles hypoxanthus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2019**. Downloaded on 20 April 2020.

FLEAGLE, J. G. **Primate adaptation and evolution**. 2nd edition. Academic Press, San Diego, 1999.

FRANCESCHINI, M. D.; RUBENSTEIN, D. I.; LOW, B.; ROMERO, L. M. Fecal glucocorticoid metabolite analysis as an indicator of stress during translocation and acclimation in an endangered large mammal, the Grevy's zebra. **Animal Conservation**, v. 11, n. 4, p. 263-269, 2008.

FULLER, P.J.; SMITH, B. J.; ROGERSON, F. M. Cortisol resistance in the New World revisited. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 296-299, 2004.

GANSWINDT, A.; MÜNSCHER, S.; HENLEY, M.; PALME, R.; THOMPSON, P.; BERTSCHINGER, H. Concentrations of faecal glucocorticoid metabolites in physically injured free-ranging African elephants *Loxodonta africana*. **Wildlife Biology**, v. 16, n. 3, p. 323-332, 2010.

GANSWINDT, A.; PALME, R.; HEISTERMANN, M.; BORRAGAN, S.; & HODGES, J. K. Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth. **General and Comparative Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 156-166, 2003.

GILL, J. A.; NORRIS, K.; SUTHERLAND, W. J. Why behavioural responses may not reflect the population consequences of human disturbance. **Biological conservation**, v. 97, n. 2, p. 265-268, 2001.

GOLAND, R. S.; CONWELL, I. M.; WARREN, W. B.; WARDLAW, S. L. Placental corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenal function during pregnancy. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 5, p. 742-749, 1992.

GOYMANN, W.; EAST, M. L.; WACHTER, B.; HÖNER, O. P.; MÖSTL, E.; HOFER, H. Social status does not predict corticosteroid levels in postdispersal male spotted hyenas. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 4, p. 474-479, 2003.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 35-53, 2005.

GOYMANN, W. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 757-765, 2012.

GRAHAM, L. H.; BOLLING, J., MILLER, G.; PRATT-HAWKES, N.; JOSEPH, S. **Enzyme-immunoassay for the measurement of luteinizing hormone in the serum of African elephants (*Loxodonta africana*)**. New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2002.

GRANT, K. S.; WORLEIN, J. M.; MEYER, J. S.; NOVAK, M. A.; KROEKER, R.; ROSENBERG, K.; ... & BURBACHER, T. M. A longitudinal study of hair cortisol concentrations in *Macaca nemestrina* mothers and infants. **American journal of primatology**, v. 79, n. 2, p. e22591, 2017.

GROOMBRIDGE, J. J.; MASSEY, J. G.; BRUCH, J. C.; MALCOLM, T.; BROSIUS, C. N.; OKADA, M. M.; ... VANDERWERF, E. A. An attempt 'to recover the Po'ouli by translocation and an appraisal of recovery strategy for bird species of extreme rarity. **Biological Conservation**, v. 118, n. 3, p. 365-375, 2004.

GROVES, C.P. Order Primates. In: D.E. Wilson and D.M. Reeder (eds), **Mammal Species of the World**, pp. 111-184. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA, 2005.

GUEDES, D.; YOUNG, R. J.; STRIER, K. B. Energetic costs of reproduction in female northern muriquis, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Platyrrhini: Atelidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 587-593, 2008.

HANDA, R. J.; BURGESS, L. H.; KERR, J. E.; O'KEEFE, J. A.. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Hormones and behavior**, v. 28, n. 4, p. 464-476, 1994.

HEISTERMANN, M.; ADEMMEER, C.; KAUMANN, W. Ovarian cycle and effect of social changes on adrenal and ovarian function in *Pygathrix nemaeus*. **International Journal of Primatology**, v. 25, n. 3, p. 689-708, 2004.

HEISTERMANN, M.; PALME, R.; GANSWINDT, A. Comparison of different enzymeimmunoassays for assessment of adrenocortical activity in primates based on fecal analysis. **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 68, n. 3, p. 257-273, 2006.

HILL, W. C. O. **Primates: comparative anatomy and taxonomy**, v.5. Cebidae part. Wiley-interscience, Nova Iorque, 1962.

HIRSCHENHAUSER, K.; KOTRSCHAL, K.; MÖSTL, E. Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 138-153, 2005.

HODGES, J. K.; HEISTERMANN, M. Field endocrinology: monitoring hormonal changes in free-ranging. **Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide**, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 353-370, 2003.

HONESS, P. E.; JOHNSON, P. J.; WOLFENSOHN, S. E. A study of behavioural responses of non-human primates to air transport and re-housing. **Laboratory Animals**, v. 38, n. 2, p. 119-132, 2004.

HUBER, S.; PALME, R.; ARNOLD, W. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). **General and comparative endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 48-54, 2003.

IWASAKI-SEKINO, A.; MANO-OTAGIRI, A.; OHATA, H.; YAMAUCHI, N.; SHIBASAKI, T. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 2, p. 226-237, 2009.

JENSEN, T.; DURRANT, B. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. **Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association**, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2006.

JERUSALINSKY, L.; TALEBI, M.; MELO, F. R. Plano de ação nacional para a conservação dos muriquis. **Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2011.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 9, p. 518-530, 2013.

KENAGY, G. J.; PLACE, N. J. Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow-pine chipmunks: effects of reproduction and capture and handling. **General and comparative endocrinology**, v. 117, n. 2, p. 189-199, 2000.

KERSEY, D. C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and comparative endocrinology**, v. 203, p. 296-306, 2014.

KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; ISANI, S. S.; YU, J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. **General and comparative endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 57-64, 2002.

KINN RØD, A. M.; HARKESTAD, N.; JELLESTAD, F. K.; MURISON, R. Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2017.

KIRSCHBAUM, C.; TIETZE, A.; SKOLUDA, N.; DETTENBORN, L. Hair as a retrospective calendar of cortisol production—increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 32-37, 2009.

KOCK, R. A.; WOODFORD, M. H.; ROSSITER, P. B. Disease risks associated with the translocation of wildlife. **Revue scientifique et technique**, v. 29, n. 2, p. 329, 2010.

KORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M.; WINGFIELD, J. C.; MCEWEN, B.S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-38, 2005.

LANDI, M. S.; KREIDER, J. W.; LANG, C. M.; BULLOCK, L. P. Effects of shipping on the immune function in mice. **American journal of veterinary research**, v. 43, n. 9, p. 1654-1657, 1982.

LARM, M.; HOVLAND, A. L.; PALME, R.; THIERRY, A. M.; MILLER, A. L.; LANDA, A.; ... & EIDE, N. E.. Fecal glucocorticoid metabolites as an indicator of adrenocortical activity in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) and recommendations for future studies. **Polar Biology**, v. 44, n. 10, p. 1925-1937, 2021.

LAUDENSLAGER, M. L.; JORGENSEN, M. J.; FAIRBANKS, L. A. Developmental patterns of hair cortisol in male and female nonhuman primates: lower hair cortisol levels in vervet males emerge at puberty. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 10, p. 1736-1739, 2012.

LE CORRE, N.; GÉLINAUD, G.; BRIGAND, L. Bird disturbance on conservation sites in Brittany (France): the standpoint of geographers. **Journal of Coastal Conservation**, v. 13, n. 2, p. 109-118, 2009.

LEMOS DE SÁ, R. M.; GLANDER, K. E. Capture techniques and morphometrics for the woolly spider monkey, or muriqui (*Brachyteles arachnoides*, E. Geoffroy 1806). **American Journal of Primatology**, v. 29, n. 2, p. 145-153, 1993.

LIGHTMAN, S. L.; The neuroendocrinology of stress: a never ending story. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 880-884, 2008.

LIMA, A. B. F.; SOBRAL, G.; MARTINS, G. S.; PISSINATTI, A.; VIAU, P.; DE OLIVEIRA, C. A. Reproductive and Stress Response Hormones of the Critically Endangered Southern Muriqui (*Brachyteles arachnoides*: Atelidae) Under Captive Conditions. **International Journal of Primatology**, v. 42, n. 5, p. 781-801, 2021.

LYNCH, J. W.; KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; NJAHIRA, M. N.; RUBENSTEIN, N. Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. **General and comparative endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 264-271, 2003.

LYNN, S. E.; PORTER, A. J. Trapping initiates stress response in breeding and non-breeding house sparrows *Passer domesticus*: Implications for using unmonitored traps in field studies. **Journal of Avian Biology**, v. 39, n. 1, p. 87-94, 2008.

MARTÍNEZ-MOTA, R.; VALDESPINO, C.; SÁNCHEZ-RAMOS, M. A.; SERIO-SILVA, J. C. Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. **Animal Conservation**, v. 10, n. 3, p. 374-379, 2007.

MARTÍNEZ-MOTA, R.; VALDESPINO, C.; RIVERA-REBOLLEDO, J.A.; PALME, R. Determination of fecal glucocorticoid metabolites to evaluate stress response in *Alouatta pigra*. **International journal of primatology**, v. 29, n. 5, p. 1365-1373, 2008.

MARTINS, W. P.; STRIER, K. B. Age at first reproduction in philopatric female miquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). **Primates**, v. 45, n. 1, p. 63-67, 2004.

MASON, G. J. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 12, p. 713-721, 2010.

MCCORMICK, C. M.; LINKROUM, W.; SALLINEN, B. J.; MILLER, N. W. Peripheral and central sex steroids have differential effects on the HPA axis of male and female rats. **Stress**, v. 5, n. 4, p. 235-247, 2002.

MCCORMICK, C. M.; MATHEWS, I. Z. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 2, p. 220-233, 2007.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and behavior**, v. 43, n. 1, p. 2-15, 2003.

MCGLONE, J. J.; SALAK, J. L.; LUMPKIN, E. A.; NICHOLSON, R. I.; GIBSON, M.; NORMAN, R. L. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 4, p. 888-896, 1993.

MCHLE, U.; HEISTERMANN, M.; PALME, R.; HODGES, J. K. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 135-145, 2002.

MELO, F. R. Drones for conservation: new techniques to monitor miquis. **Oryx**, v. 55, n. 2, p. 171-171, 2021.

MELO, F. R.; CHIARELLO, A. G.; FARIA, M. B.; OLIVEIRA, P. A.; FREITAS, R. A.; LIMA, F. S.; FERRAZ, D. S. Novos registros de miqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) no Vale do rio Jequitinhonha, Minas Gerais e Bahia. **Neotropical Primates**, v. 12, n. 3, p. 139-143, 2004.

MELO, F. R.; DIAS, L. G. Miqui populations reported in the literature over the last 40 years. **Neotrop Primates**, v. 13, n. ssuppl, 2005.

MENDES, S. L., SANTOS, R. R. AND CARMO, L. P. Conserving the northern muriqui in Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo. **Neotropical Primates**, 13: 31-35, 2005.

MILLER, GREGORY E.; CHEN, EDITH; ZHOU, ERIC S. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. **Psychological bulletin**, v. 133, n. 1, p. 25, 2007.

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

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E.; MILANICK, M. A.; SLOTOW, R.; VAN DYK, G. Effects of heat and chemical treatments on fecal glucocorticoid measurements: implications for samples transport. **Wildlife Society Bulletin**, p. 399-406, 2003.

MITTERMEIER, R. A.; VALLE, C. M. C.; ALVES, M. C.; SANTOS, I. B.; PINTO, C. M.; STRIER, K. B.; ... & LEMOS DE SÁ, R. M. Current distribution of the muriqui in the Atlantic forest region of eastern Brazil. **Primate Conservation**, v. 8, p. 143-149, 1987.

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

MONCLÚS, R.; PALOMARES, F; TABLADO, Z.; MARTÍNEZ-FONTÚRBEL, A.; PALME, R. Testing the threat-sensitive predator avoidance hypothesis: physiological responses and predator pressure in wild rabbits. **Oecologia**, v. 158, n. 4, p. 615-623, 2009.

MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; ... & VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & behavior**, v. 92, n. 3, p. 317-339, 2007.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic animal endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 67-74, 2002.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 17-34, 2005.

MURRAY, C. M.; HEINTZ, M. R.; LONSDORF, E. V.; PARR, L. A.; SANTYMIRE, R. M. Validation of a Field Technique and Characterization of Fecal Glucocorticoid Metabolite Analysis in Wild Chimpanzees (*Pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v. 75, n. 1, p. 57-64, 2013.

MURTAGH, R.; BEHRINGER, V.; DESCHNER, T. LC-MS as a method for non-invasive measurement of steroid hormones and their metabolites in urine and faeces of animals. **Wien Tierärztl Monat–Vet Med Austria**, v. 100, p. 247-254, 2013.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033-1044, 2013.

OBERNIER, J. A.; BALDWIN, R. L. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. **ILAR journal**, v. 47, n. 4, p. 364-369, 2006.

OERS, K. V.; CARERE, C. Long-term effects of repeated handling and bleeding in wild caught great tits *Parus major*. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. 2, p. 185-190, 2007.

OLIVEIRA, P. C. de. **Avaliação das técnicas de captura e translocação de miquiqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*, Primates, Atelidae)**. Dissertação - (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 101. 2021.

OSTERHOLZ, M.; WALTER, L.; ROOS, C. Retropositional events consolidate the branching order among New World monkey genera. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, n. 3, p. 507-513, 2009.

OSTNER, J.; HEISTERMANN, M.; SCHÜLKE, O. Dominance, aggression and physiological stress in wild male Assamese macaques (*Macaca assamensis*). **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 5, p. 613-619, 2008.

OTOVIC, P.; HUTCHINSON, E. Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 32, n. 1, p. 41-50, 2015.

PALME, R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. **Physiology & behavior**, v. 199, p. 229-243, 2019.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M. N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MOESTL, E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, n. 1, p. 162-171, 2005.

PALME, R.; TOUMA, C.; ARIAS, N.; DOMINCHIN, M. F.; LEPSCHY, M. Steroid extraction: get the best out of faecal samples. 2013.

PIROVINO, M.; HEISTERMANN, M.; ZIMMERMANN, N.; ZINGG, R.; CLAUSS, M.; CODRON, D.; ... & STEINMETZ, H. W. Fecal glucocorticoid measurements and their relation to rearing, behavior, and environmental factors in the population of pileated gibbons (*Hylobates pileatus*) held in European zoos. **International Journal of Primatology**, v. 32, n. 5, p. 1161-1178, 2011.

PISSINATTI, A. Management of muriquis (*Brachyteles*, Primates) in captivity. **Neotropical Primates** 13: 93-99, 2005.

PIZZUTTO, C. S., NICHI, M., SGAI, M. G. F. G., CORRÊA, S. H. R., VIAU, P., BERESCA, A. M., ... & GUIMARÃES, M. A. B. V. Effect of environmental enrichment on behavioral and

endocrine aspects of a captive orangutan (*Pongo pygmaeus*). **Laboratory Primate Newsletter**, 47(2), 10-14, 2008.

POSSAMAI, C. B.; YOUNG, R. J.; DE OLIVEIRA, R. C.; MENDES, S. L.; STRIER, K. B. Age-related variation in copulations of male northern muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*). **Folia Primatologica**, v. 76, n. 1, p. 33-36, 2005.

PRINTES, R. C.; STRIER, K.B. Behavioral correlates of dispersal in female muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **International Journal of Primatology**, v. 20, n. 6, p. 941-960, 1999.

PRYCE C. R.; PALME R.; FELDOM J. Development of pituitary-adrenal endocrine function in the marmoset monkey: infant hypercortisolism is the norm. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 691-699, 2002.

PUEHRINGER-STURMAYR, V.; WASCHER, C. A.; LORETTO, M. C.; PALME, R.; STOEWEL, M.; KOTRSCHAL, K.; FRIGERIO, D. Seasonal differences of corticosterone metabolite concentrations and parasite burden in northern bald ibis (*Geronticus eremita*): The role of affiliative interactions. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0191441, 2018.

RAMAMOORTHY S.; CIDLOWSKI J. A. Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 42, n. 1, p. 15-31, 2016.

RAMINELLI, J. L. F, CORDEIRO, M. B. S.; CUNHA, M. S.; BARBOSA, M. F. V. Morning and afternoon patterns of fecal cortisol excretion among reproductive and non-reproductive male and female common marmosets, *Callithrix jacchus*. **Biological Rhythm Research**, v. 32, n. 2, p. 159-167, 2001.

RANGEL-NEGRÍN, A.; ALFARO, J. L.; VALDEZ, R. A.; ROMANO, M. C.; & SERIO-SILVA, J. C. Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. **Animal Conservation**, v. 12, n. 5, p. 496-502, 2009.

REEDER, D. M.; KOSTECZKO, N. S.; KUNZ, T. H.; & WIDMAIER, E. P. Changes in baseline and stress-induced glucocorticoid levels during the active period in free-ranging male and female little brown myotis, *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 260-269, 2004.

REEDER, D. M.; KRAMER, K. M. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 2, p. 225-235, 2005.

REIMERS, M.; SCHWARZENBERGER, F.; PREUSCHOFT, S. Rehabilitation of research chimpanzees: Stress and coping after long-term isolation. **Hormones and Behavior**, v. 51, n. 3, p. 428-435, 2007.

RODRIGUES, M. A. Female spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) cope with anthropogenic disturbance through fission–fusion dynamics. **International journal of primatology**, v. 38, n. 5, p. 838-855, 2017.

ROMERO, L. M.; WINGFIELD, J. C. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in free-living pigeons. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 171, n. 3, p. 231-235, 2001.

ROMERO L. M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 5, p. 249-255, 2004.

ROMERO-GONZALEZ, B.; CAPARROS-GONZALEZ, R. A.; GONZALEZ-PEREZ, R.; GARCIA-LEON, M. A.; ARCO-GARCIA, L.; PERALTA-RAMIREZ, M. I. “I am pregnant. Am I different?“. Psychopathology, psychological stress and hair cortisol levels among pregnant and non-pregnant women. **Journal of psychiatric research**, v. 131, p. 235-243, 2020.

SANCHEZ, M. M.; MCCORMACK, K.; GRAND, A. P.; FULKS, R.; GRAFF, A.; MAESTRIPIERI, D. Effects of sex and early maternal abuse on adrenocorticotropin hormone and cortisol responses to the corticotropin-releasing hormone challenge during the first 3 years of life in group-living *rhesus monkeys*. **Development and psychopathology**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2010.

SANTYMIRE, R. M.; ARMSTRONG, D. M. Development of a field-friendly technique for fecal steroid extraction and storage using the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Zoo Biology**, v. 29, n. 3, p. 289-302, 2010.

SAPOLSKY, R. M. Neuroendocrinology of the stress-response. **Behavioral endocrinology**, p. 287-324, 1992.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

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

SCAMMELL, J. G.; DENNY, W. B.; VALENTINE, D. L.; SMITH, D. F. Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. **General and comparative endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 152-165, 2001.

SCHAFFNER, C. M.; SMITH, T. E. Familiarity may buffer the adverse effects of relocation on marmosets (*Callithrix kuhlii*): preliminary evidence. **Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association**, v. 24, n. 1, p. 93-100, 2005.

SCHAPIRO, S. J.; LAMBETH, S. P.; JACOBSEN, K. R.; WILLIAMS, L. E.; NEHETE, B. N.; NEHETE, P. N. Physiological and welfare consequences of transport, relocation, and acclimatization of chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Applied animal behaviour science**, v. 137, n. 3-4, p. 183-193, 2012.

SCHELL, C. J.; YOUNG, J. K.; LONSDORF, E. V.; SANTYMIRE, R. M. Anthropogenic and physiologically induced stress responses in captive coyotes. **Journal of Mammalogy**, 94, 1131–1140, 2013.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52-74, 2007.

SERAPHIN, S. B.; WHITTEN, P. L.; REYNOLDS, V. The influence of age on fecal steroid hormone levels in male Budongo Forest chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 70, n. 7, p. 661-669, 2008.

SETCHELL, J. M.; SMITH, T.; WICKINGS, E. J.; KNAPP, L. A. Factors affecting fecal glucocorticoid levels in semi-free-ranging female mandrills (*Mandrillus sphinx*). **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 70, n. 11, p. 1023-1032, 2008.

SETCHELL, J. M.; CURTIS, D. J. (Ed.). **Field and laboratory methods in primatology: a practical guide**. Cambridge University Press, 2011.

SHERIFF, M. J.; BOSSON, C. O.; KREBS, C. J.; BOONSTRA, R. A non-invasive technique for analyzing fecal cortisol metabolites in snowshoe hares (*Lepus americanus*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, n. 3, p. 305-313, 2009.

SHERIFF, M. J.; DANTZER, B.; DELEHANTY, B.; PALME, R.; BOONSTRA, R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. **Oecologia**, v. 166, n. 4, p. 869-887, 2011.

SHIDELER, S. E.; ORTUNO, A. M.; MORAN, F. M.; MOORMAN, E. A.; LASLEY, B. L. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 6, p. 1290-1298, 1993.

SHUTT, K.; SETCHELL, J. M.; HEISTERMANN, M. Non-invasive monitoring of physiological stress in the Western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*): validation of a fecal glucocorticoid assay and methods for practical application in the field. **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, n. 2, p. 167-177, 2012.

SMITH, R.; CUBIS, J.; BRINSMEAD, M.; LEWIN, T.; SINGH, B.; OWENS, P.; ... & NOLAN, M. Mood changes, obstetric experience and alterations in plasma cortisol, beta-

endorphin and corticotrophin releasing hormone during pregnancy and the puerperium. **Journal of psychosomatic research**, v. 34, n. 1, p. 53-69, 1990.

SOUTHWICK, C. H; SMITH, R. B. The growth of primate field studies. In: G. MITCHEL, G. E. J; ERWIN, E. D. S. **Comparative primate biology, volume 2: Behavior, conservation, and ecology**, Nova York: Alan R. Liss, 1986 pp.73-91.

STRIER, K. B. The behavior and ecology of the woolly spider monkey, or Muriqui (*Brachyteles arachnoides* E. Geoffroy 1806). **Ph.D. Thesis, Harvard University**, Cambridge, 1986.

STRIER, K. B. Ranging behavior of woolly spider monkeys, or muriquis, *Brachyteles arachnoides*. **International Journal of Primatology**, v. 8, n. 6, p. 575-591, 1987a.

STRIER, K. B. Activity budgets of woolly spider monkeys, or muriquis (*Brachyteles arachnoides*). **American Journal of Primatology**, v. 13, n. 4, p. 385-395, 1987b.

STRIER, K. B. Reprodução de *Brachyteles arachnoides*. **A Primatologia no Brasil**, v. 2, p. 163-175, 1987c.

STRIER, K. B. New World primates, new frontiers: Insights from the woolly spider monkey, or muriqui (*Brachyteles arachnoides*). **International Journal of Primatology**, v. 11, n. 1, p. 7-19, 1990.

STRIER, K. B. Demography and conservation of an endangered primate, *Brachyteles arachnoids*. **Conservation Biology**, v. 5, n. 2, p. 214-218, 1991.

STRIER, K. B. Causes and consequences of nonaggression in woolly spider monkeys. In: **“Aggression and Peacefulness in Humans and Other Primates”** (J. Silverberg and JP Gray, Eds.), 1992.

STRIER, K. B. Reproductive ecology of female muriquis (*Brachyteles arachnoides*). In: **Adaptive radiations of neotropical primates**. Springer, Boston, MA, 511-532, 1996.

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

STRIER, K. B. Mate preferences of wild miqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*): Reproductive and social correlates. **Folia Primatologica**, v. 68, n. 3-5, p. 120-133, 1997.

STRIER, K. B. **Faces in the forest: the endangered miqui monkeys of Brazil**. Harvard University Press, 1999.

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

STRIER, K. B. Population Viabilities and Conservation Implications for Miquis (*Brachyteles arachnoides*) in Brazil's Atlantic Forest 1. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 903-913, 2000.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Lack of pubertal influences on female dispersal in miqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **Animal Behaviour**, v. 59, n. 4, p. 849-860, 2000.

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

STRIER, K. B.; DIB, L. T.; FIGUEIRA, J. E. C. Social dynamics of male miquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). **Behaviour** 139: 315-342, 2002.

STRIER, K. B.; LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E. Hormonal changes during the mating and conception seasons of wild northern miquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). **American Journal of Primatology**, 61, 85-99, 2003.

STRIER, K. B.; ZIEGLER, T. E. Variation in the resumption of cycling and conception by fecal androgen and estradiol levels in female miquis (*Brachyteles hypoxanthus*). **American Journal of Primatology**, 67, 69-81, 2005.

STRIER, K. B.; BOUBLI, J. P. A history of long-term research and conservation of northern muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*) at the Estação Biológica de Caratinga/RPPN-FMA. **Primate Conservation**, v. 2006, n. 20, p. 53-63, 2006.

STRIER, K. B.; POSSAMAI, C. B.; TABACOW, F. P.; PISSINATTI, A.; LANNA, A. M.; RODRIGUES DE MELO, F.; MOREIRA, L.; TALEBI, M.; BREVES, P.; MENDES, S. L.; JERUSALINSKY, L. Demographic monitoring of wild muriqui populations: criteria for defining priority areas and monitoring intensity. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0188922, 2017.

STRIER, K. B. Manual do Projeto Muriqui de Caratinga. Versão 3. Caratinga – MG, 2018.

STUART, M. D.; STRIER, K. B. Primates and parasites: a case for a multidisciplinary approach. **International Journal of Primatology**, v. 16, p. 577-593, 1995.

SULEMAN, M. A., WANGO, E.; SAPOLSKY, R. M.; ODONGO, H.; HAU, J. Physiologic manifestations of stress from capture and restraint of free-ranging male African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 1, p. 20-24, 2004.

TABACOW, F. P.; NERY, M. S.; MELO, F. R.; FERREIRA, A. I.; LESSA, G.; STRIER, K. B. Demographic effects of the translocation of a female northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*) in an Atlantic Forest fragment in Minas Gerais, Brazil. **Primate Conservation**, 35, 21-35, 2021.

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

TALEBI, M. G.; BELTRÃO-MENDES, R.; LEE, P. C. Intra-community coalitionary lethal attack of an adult male southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*). **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 71, n. 10, p. 860-867, 2009.

TALEBI, M.; MELO, F.R.; DIAS, L.G.; CUNHA, A.A.; MENDES, S.L.; BREVES, P. & JERUSALINSKY, L. Contextualização sobre *Brachyteles arachnoides* e *Brachyteles hypoxanthus*. In: TALEBI, M. & MELO, F.R (ed.), **Plano de Ação Nacional para a**

Conservação dos Muriquis., ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), 2011.

TARLOW, E. M.; BLUMSTEIN, D. T. Evaluating methods to quantify anthropogenic stressors on wild animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, n. 3-4, p. 429-451, 2007.

TAYLOR, W. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. **Vitamins & Hormones**, v. 29, p. 201-285, 1971.

TERIO, K. A.; BROWN, J. L.; MORELAND, R.; MUNSON, L. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. **Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association**, v. 21, n. 3, p. 215-222, 2002.

THAU, L.; GANDHI, J.; SHARMA, S. Physiology, cortisol. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2021.

THIEL, D.; JENNI-EIERMANN, S.; PALME, R. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 96-108, 2005.

THIEL D.; JENNI-EIERMANN S.; BRAUNISCH V.; PALME R.; JENNI L. Ski tourism affects habitat use and evokes a physiological stress response in capercaillie *Tetrao urogallus*: a new methodological approach. **Journal of applied ecology**, v. 45, n. 3, p. 845-853, 2008.

THIEL, D.; JENNI-EIERMANN, S. U. S. A.; N. N. E.; PALME, R.; & JENNI, L. Winter tourism increases stress hormone levels in the Capercaillie *Tetrao urogallus*. **Ibis**, v. 153, n. 1, p. 122-133, 2011.

TORRES-FARFAN, C.; VALENZUELA, F. J.; EBENSPERGER, R.; MÉNDEZ, N.; CAMPINO, C.; RICHTER, H. G.; ... & SERÓN-FERRÉ, M. Circadian cortisol secretion and circadian adrenal responses to ACTH are maintained in dexamethasone suppressed capuchin

monkeys (*Cebus apella*). **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 70, n. 1, p. 93-100, 2008.

TOUFEXIS, D. J.; WILSON, M. E. Dihydrotestosterone differentially modulates the cortisol response of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in male and female rhesus macaques, and restores circadian secretion of cortisol in females. **Brain research**, v. 1429, p. 43-51, 2012.

TOUMA, C.; SACHSER, N.; MÖSTL, E.; PALME, R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **General and comparative endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 267-278, 2003.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 54-74, 2005.

VAN METER, P. E.; FRENCH, J. A.; DLONIAK, S. M.; WATTS, H. E.; KOLOWSKI, J. M.; HOLEKAMP, K. E. Fecal glucocorticoids reflect socio-ecological and anthropogenic stressors in the lives of wild spotted hyenas. **Hormones and behavior**, v. 55, n. 2, p. 329-337, 2009.

VAN RUIVEN, R.; MEIJER, G. W.; WIERSMAN, A.; BAUMANS, V.; VAN ZUTPHEN L. F. M.; RITSKES-HOITINGA J. The influence of transportation stress on selected nutritional parameters to establish the necessary minimum period for adaptation in rat feeding studies. **Laboratory animals**, v. 32, n. 4, p. 446-456, 1998.

VIAU, V.; MEANEY, M. J. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. **Journal of neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 1866-1876, 1996.

VIAU, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and-adrenal axes. **Journal of neuroendocrinology**, v. 14, n. 6, p. 506-513, 2002.

WARK, J. D.; AMENDOLAGINE, L.; LUKAS, K. E.; KUCHAR, C. W.; DENNIS, P. M.; SNOWDON, C. T.; ... SCHOOK, M. W. Fecal glucocorticoid metabolite responses to

management stressors and social change in four species of callitrichine monkeys. **Primates**, v. 57, n. 2, p. 267-277, 2016.

WASSER, S. K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. **Conservation Biology**, v. 11, n. 4, p. 1019-1022, 1997.

WASSER, S. K.; HUNT, K. E.; BROWN, J. L.; COOPER, K.; CROCKETT, C. M.; BECHERT, U.; MILLSPAUGH, J. J.; LARSON, S.; MONFORT, S. L. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and comparative endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 260-275, 2000.

WATSON, R.; MUNRO, C.; EDWARDS, K. L.; NORTON, V.; BROWN, J.; WALKER, S. L. Development of a versatile enzyme immunoassay for non-invasive assessment of glucocorticoid metabolites in a diversity of taxonomic species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 186, p. 16-24, 2013.

WATSON, S. L.; MCCOY, J. G.; STAVISKY, R. C.; GREER, T. F.; HANBURY, D. Cortisol response to relocation stress in Garnett's bushbaby (*Otolemur garnettii*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 3, p. 22-24, 2005.

WEINGRILL, T.; GRAY, D. A.; BARRETT, L.; HENZI, S. P. Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. **Hormones and behavior**, v. 45, n. 4, p. 259-269, 2004.

WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists**, v. 107, n. S27, p. 1-23, 1998.

WIELEBNOWSKI, N. C.; FLETCHALL, N.; CARLSTEAD, K.; BUSO, J. M.; BROWN, J. L. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. **Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association**, v. 21, n. 1, p. 77-98, 2002.

WIKELSKI, M.; COOKE, S. J. Conservation physiology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 1, p. 38-46, 2006.

WILSON, M. E.; FISHER, J.; BROWN, J. Chronic subcutaneous leptin infusion diminishes the responsiveness of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis in female rhesus monkeys. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 3, p. 449-458, 2005.

WINGFIELD, J. C.; HUNT, K. A. T. H. L. E. E. N.; BREUNER, C. R. E. A. G. H.; DUNLAP, K. E. N. T.; FOWLER, G. S.; FREED, L. E. O. N. A. R. D.; LEPSON, J. A. A. N. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. **Behavioral approaches to conservation in the wild**, p. 95-131, 1997.

WOLFENSOHN, S. E. Brief review of scientific studies of the welfare implications of transporting primates. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 4, p. 303-305, 1997.

WUDY, S. A.; SCHULER, G.; SÁNCHEZ-GUIJO, A.; HARTMANN, M. F. The art of measuring steroids: principles and practice of current hormonal steroid analysis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 179, p. 88-103, 2018.

YAMANASHI, Y.; TERAMOTO, M.; MORIMURA, N.; HIRATA, S.; INOUE-MURAYAMA, M.; IDANI, G. I. Effects of relocation and individual and environmental factors on the long-term stress levels in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*): monitoring hair cortisol and behaviors. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0160029, 2016.

YOUNG, C., GANSWINDT, A., MCFARLAND, R., DE VILLIERS, C., VAN HEERDEN, J., GANSWINDT, S., ... & HENZI, S. P. Faecal glucocorticoid metabolite monitoring as a measure of physiological stress in captive and wild vervet monkeys. **General and comparative endocrinology**, v. 253, p. 53-59, 2017.

ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; SNOWDON, C. T. The relationship of cortisol levels to social environment and reproductive functioning in female cotton-top tamarins, *Saguinus oedipus*. **Hormones and Behavior**, v. 29, n. 3, p. 407-424, 1995.

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

ZINGESER, M. R. Dentition of *Brachyteles arachnoides* with reference to Alouattine and Atelinine affinities. **Folia primatologica**, v. 20, n. 5-6, p. 351-390, 1973.