UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

Zoologia

Paula Custódio Bertoli

Análise fisiológica e comportamental de micos-leões-pretos em cativeiro: uma avaliação do nível de estresse

Orientadora: Profa. Dra. Laurence Marianne Vincianne Culot
Co-Orientadora: Dr. Olivia de Mendonça Furtado
Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira

Rio Claro
2017

PAULA CUSTÓDIO BERTOLI

ANÁLISE FISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE MICOS-LEÕES-PRETOS EM CATIVEIRO: UMA AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ESTRESSE

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro, Departamento de Zoologia, Programa de Pós-graduação em Zoologia como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zoologia .

Orientadora: Profa. Dra. Laurence Marianne Vincianne Culot
Co-orientadora: Dra. Olívia de Mendonça-Furtado
Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Gonçalves Ferreira

Rio Claro
2017

611.4 Bertoli, Paula Custódio
B546a Análise fisiológica e comportamental de micos leões pretos em cativeiro: uma avaliação do nível de estresse / Paula Custódio Bertoli. - Rio Claro, 2017
92 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Laurence Marianne Vincianne Culot
Coorientador: Olívia de Mendonça-Furtado, Renata Gonçalves Ferreira

1. Endocrinologia. 2. Endocrinologia comportamental. 3. Comportamento. 4. Metabólitos fecais de glicocorticóides. 5. Condições de cativeiro. 6. Diferenças individuais. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise fisiológica e comportamental de micos leões pretos em cativeiro: uma avaliação do nivel de estresse.

AUTORA: PAULA CUSTODIO BERTOLI
ORIENTADORA: LAURENCE MARIANNE VINCIANNE CULOT
COORIENTADORA: OLÍVIA DE MENDONÇA FURTADO PIMENTA
COORIENTADORA: RENATA GONÇALVES FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LAURENCE MARIANNE VINCIANNE CULOT
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. GUILHERME GOMES
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / USP - Instituto de São Carlos - SP

Profa. Dra. PATRÍCIA IZAR
Departamento de Psicologia Experimental / Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo - Campus de São Paulo - SP (VÍDEO)

Rio Claro, 27 de abril de 2017

Scanned by CamScanner

AGREDECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais por terem me dado a oportunidade de chegar onde cheguei. Agradeço a paciência pelos dias difíceis, o carinho de todo dia, o suporte que me dão mesmo sem saber muita coisa do que faço. E agradeço ao meu pequeno pelo amor incondicional nesses dias.

Agradeço muito as minhas três orientadoras maravilhosas, cada uma com sua característica particular, mas que juntas me fizeram crescer e chegar aqui. Laurence, muito obrigada por todo o suporte em todo o momento do meu mestrado, acredito que não podia ter escolhido uma pessoa melhor para me orientar. Aprendi demais com você e tenho você como um modelo de profissional. Olivia, obrigada por todas as conversas, pessoais e profissionais que tivemos, ainda estou aprendendo muito com você. E Renata muito obrigada por ter me recebido tão bem em Natal, sei que meu trabalho não seria o mesmo sem esse tempo que passei ai.

Agradeço a todo o pessoal do zoológico de São Carlos pela ajuda durante o tempo que estive lá. Principalmente a Vânia que me ensinou muito sobre a relação entre nós e os animais. Precisamos de mais pessoas como você.

Agradeço a republica Manga Rosa pela recepção maravilhosa, pelas risadas, pela companhia, e por todo o aprendizado. Eu amei estar com vocês. Saibam que vocês sempre vão ter um lugarzinho muito especial no meu coração.

Agradeço a todos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro pela hospitalidade, ajuda e paciência. Agradeço em especial ao Dr. Alcides Pissinati e Dr. Silvia por todo o aprendizado que tive enquanto estive lá. Agradeço a Sônia por ser uma mãezona mesmo quando a minha estava longe e a Dona Ana que me fez muito bem nesse tempo longe de casa.

Agradeço também aos bombeiros e guarda-parques do núcleo Paraíso do Parque Estadual dos Três Picos pela companhia, pelas risadas, pelas angustias, enfim, por tudo.

Agradeço a minha amiga Thais, que me acolheu na sua casa durante todo o tempo que passei no Rio. Nossa amizade veio de Dublin e vai para o mundo todo. Sucesso sua linda.

Agradeço ao CBI 2009 por todos esses anos que vocês foram a minha família longe de casa, o meu porto seguro mesmo não estando perto. Amo cada um de vocês. Agradeço em especial a Vanessinha linda por tudo (se eu colocar tudo aqui vai ficar até chato) e ao Jorge pela companhia de todos os momentos.

Agradeço também a Matraca pela nossa amizade, e ótima recepção quando eu não tinha mais casa em Rio Claro.

Agradeço a todos meus amigos de Jundiaí que mesmo estando longe sempre estão por perto. Em especial a Melise por todas as conversas, aprendizados e risadas.

Agradeço a banca de qualificação: Dr. Guilherme Gomes e Dr. Karl Mokross pelas sugestões. Em especial ao Guilherme, que tenho a honra de conhecer e poder trocar conhecimentos e aflições e que se arriscou para fazer meu mestrado dar certo.

Agradeço ao laboratório do prof. Rupert Palme pela ajuda com a dosagem das amostras. Em especial ao Prof. Rupert Palme que ajudou muito no processo com as amostras.

Agradeço também ao Fernando Puertas por toda a ajuda com as análises.

Agradeço ao apoio financeiro da Capes e do projeto da FAPESP (Processo Jovem Pesquisador nº 2014/14739-0).

Resumo

O mico-leão-preto (MLP, *Leontopithecus chrysopygus*) é uma espécie de primata neotropical ameaçada de extinção, sendo que tanto esforços in situ, quanto ex situ devem ser feitos para sua conservação. O entendimento das condições do cativeiro que melhoram o bem-estar dos indivíduos é necessário para viabilizar o sucesso reprodutivo ex situ. No entanto, indivíduos com diferentes perfis comportamentais podem responder de formas distintas a um mesmo estímulo tendo seu bem-estar impactado de diferentes maneiras. O bem-estar animal pode ser avaliado através de variáveis comportamentais (via o estudo de comportamentos potencialmente indicativos de estresse – BPIS) e fisiológicas (via o estudo dos níveis de metabólitos fecais de glicocorticóides – MGFs). Assim, os objetivos desse trabalho foram: 1) determinar o efeito das condições de cativeiro, período do dia e estação do ano sobre o comportamento e sobre os níveis de MGFs; 2) determinar a relação entre os comportamentos e os níveis de MFGs; 3) definir os eixos que compõe o perfil de comportamento gênero-normativo e os eixos que representam as diferentes formas de reação ao estresse entre os BPIS; e 4) identificar os estilos de enfrentamento da população de MLP estudada (via a análise da relação entre os tipos comportamentais, formas de reação ao estresse e índices hormonais de MFGs). Foram observados 11 indivíduos (3 fêmeas e 8 machos) no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro durante 15 dias em duas estações (verão e inverno), em 4 diferentes tratamentos: 1 casal com um casal de filhotes em idade adulta, um casal, uma dupla de machos – todos estes em gaiolas grandes - e três machos sozinhos em gaiolas pequenas, Coletamos dados comportamentais dos MLP usando blocos de 10 minutos de amostragem focal com registros a cada 10 segundos duas vezes ao dia (manhã e tarde) para cada indivíduo, totalizando 10 horas de observação por indivíduo, e coletamos fezes duas vezes por dia (11h e 16h). Via uma análise de covariância (MANCOVA), encontramos que MLP em gaiolas individuais apresentaram altas frequências de estereotipias, tempo dentro do abrigo e do comportamento de coçar. Machos em dupla apresentaram altas frequências de comportamentos anormais e os maiores valores de MFGs enquanto que os indivíduos em família e casal apresentaram comportamentos mais semelhantes aos observados na natureza. O período do dia e as estações do ano influenciaram a frequência de alguns comportamentos, mas não os níveis de MFGs. Com relação às diferenças individuais nas formas de reação ao estresse, encontramos quatro eixos para os tipos comportamentais (atividade, sociabilidade, exploração e necessidade) e quatro formas de enfrentamento ao estresse (introversão, auto-proteção, ansiedade e distúrbios) via uma análise de cluster. Foram encontrados quatro estilos de enfrentamento ao estresse, dois que se assemelham a uma forma pró-ativa e dois que se assemelham a uma forma reativa. Dessa forma, esse trabalho apontou a importância de recintos grandes e da composição dos grupos no bem-estar do MLP assim como importantes diferenças inter-individuais na forma de enfrentar o estresse que devem ser consideradas no futuro manejo da espécie.

Palavras-chave: estresse, comportamento, metabólitos fecais de glicocorticóides, condições de cativeiro, diferenças individuais

Abstract

The Black Lion tamarin (BLT, *Leontopithecus chrysopygus*) is a threatened neotropical primate species for which both in situ and ex situ efforts have to be done for its conservation. The understanding of which captive conditions improve the welfare of individuals is necessary to enable ex situ reproductive success. However, individuals with different behavioral profiles may respond differently to the same stimulus, consequently impacting their welfare in different ways. Animal welfare can be assessed through behavioral (through the study of behaviors potentially indicative of stress - BPIS) and physiological variables (through the study of fecal metabolites of glucocorticoids - MGFs). Therefore, the aims of the study were: 1) to determine the effect of the captive condition, period of the day and season on the behavior and the levels of MGFs; 2) to determine the relationship between behaviors and levels of MFGs; 3) to identify axes that make up the gender-normative behavioral profile (among normative behavioral patterns - GNBs) and axes of the forms of stress reaction (among BPIS) and; 4) to identify coping styles (through an analysis of the relationship between behavioral types, forms of reaction to stress and hormonal indices of MFGs). We observed 11 individuals (3 females and 8 males) in the Primatology Center of Rio de Janeiro for 15 days in two different seasons (summer and winter) in 4 different treatments: 1 male-female pair with its adult twins, 1 male-female pair, 1 male-male pair – all in large enclosures - and three single males in small cages. They were observed. We collected behavioral data for each individual twice a day using 10-minute blocks of focal sampling with records every 10 seconds (totaling 10 hours of observation per subject) and collected feces twice a day (11a.m. and 4 p.m.). Through a covariance analysis (MANCOVA), we found that BLT in individual cages presented high frequencies of stereotyped behaviors, scratching and hiding in the shelter. Male-male pair presented high frequencies of abnormal behaviors and the highest values of MFGs while individuals in family and in male-female pair presented behaviors more similar to those observed in nature. Period of the day and seasons influenced the frequency of some behaviors, but not the levels of MFGs. In relation to individual differences we found four axes for behavioral types (activity, sociability, exploration and need) and four forms of coping with stress (introversion, self-protection, anxiety and disorders) via cluster analyses. Four coping styles were found, two similar to a proactive form and two to a reactive form. In conclusion, this work pointed out the importance of large enclosures and group composition on BLT welfare as well as significant differences of coping styles among individuals that have to be considered in the future management of the species.

Keywords: stress, behavior, fecal metabolites of glucocorticoids, captive condition, individual differences

Lista de figuras

Capítulo 1	
Figura 1: Valores de metabólitos fecais de glicocorticóides em nanogramas de metabolitos fecais de glicocorticóides por gramas de fezes frescas. Os valores que foram significativamente diferentes apresentam letras diferentes	19
Figura 2: Médias e desvio padrão das frequências de cada categoria comportamental dos tratamentos família, dupla de machos, casal e gaiolas individuais para todas as categorias comportamentais (Inatividade, vigilância, alimentação, deslocamento, comportamento social positivo, comportamento agonístico, comportamento de manutenção, comportamento territorial, comportamento auto-direcionado, exploração de ambiente, investigação de outro indivíduo, tempo dentro do abrigo, coçar, vocalizar, comportamento anormal e estereotipias.	21
Figura 3: Médias das frequências de categorias comportamentais que foram significativamente diferentes entre A) Períodos do dia, e B) Estações do ano (verão e inverno)	23
Capítulo 2	
Figura 1: Resultado da análise de cluster para GNBs e BPIS e suas respectivas frequências médias de cada categoria. Notam-se cinco principais grupos: 1) Auto-direcionado e vigilância, em roxo; 2) coçar e estereotipias, em verde; 3) Social positivo, investigação de individuo, alimentação, manutenção, deslocamento, inatividade, agonismo, explorar ambiente e territorial, em laranja; 4) Vocalização e comportamentos anormais, em azul e 5) tempo dentro do abrigo, em vermelho	48
Figura 2 – Resultado da análise de cluster para GNBs e suas respectivas frequências médias de cada categoria. Notam-se quatro principais grupos: 1) Sociabilidade em roxo, 2) "Necessidade" em verde, 3) Atividade em laranja, e 4) Exploração em azul	49
Figura 3 – Resultado da análise de cluster para BPIS e suas respectivas frequências médias de cada categoria. Notam-se quatro formas de enfrentamento ao estresse: 1) Vigiar e realizar comportamentos auto-direcionados em roxo, 2) coçar e realizar estereotipias em verde, 3) Vocalizar e realizar comportamentos anormais em azul, e 4) se esconder em azul	50
Anexo 1	
Figura 1 – Apresentação dos diferentes tipos de recinto. A) Visão geral e B) Visão Lateral do recinto maior. C) Visão do abrigo do recinto maior. D) Visão geral da gaiola individual.	62
Anexo 3	
Figura 1: Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes à A) Fêmea 1 dosado com EIA anti-cortisol descrito por Palme e Möstl (1997) e B) Fêmea 1 dosado com EIA 11-oxoaetiocholanolone descrito por Möstl e colaboradores (2002). O quadro em vermelho representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	78
Figura 2: Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes ao A) Macho 3 dosado com EIA anti-cortisol descrito por Palme andMöstl, 1997 e B) Macho 3 dosado com EIA 11-oxoaetiocholanolone descrito por Möstl e colaboradores (2002). O quadro em vermelho representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	79
Figura 3: Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóidesdurante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes ao A) Macho 1 e B) Macho 2. O quadro em vermelho representa o dia e horário da injeção de ACTH	90

aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	
Figura 4: Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes à Fêmea 6. O quadro em vermelho representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	90
Anexo 4	
Figura 1 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 1 e B) Macho 2. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	84
Figura 2 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Fêmea 1 e B) Fêmea 2. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	85
Figura 3: Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 3 e B) Macho 4. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	86
Figura 4 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 5 e B) Fêmea 3. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	87
Figura 5 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 6, B) Macho 7 e C) Macho 8. Os wild outliers estão representados por (**) e os outliers estão representados por (*)	87
Figura 6 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes a todos os indivíduos.	89

Lista de tabelas

Capítulo 1	
Tabela 1: Lista dos indivíduos de mico-leão-preto usados na coleta de dados	15
Tabela 2: Valores dos índices hormonais (basal, pico, reatividade média e reatividade máxima) para os diferentes tratamentos.	18
Tabela 3: Valores dos índices hormonais (basal, pico, reatividade média e reatividade máxima) para diferentes períodos do dia e estações do ano	22
Tabela 4: Valores de R para as correlações entre os índices hormonais e as categorias comportamentais. As diferenças significativas ($p<0.05$) estão demonstradas com asteriscos (**), e as tendências ($p<0.1$) estão demonstradas com um asterisco (*)	24
Capítulo 2	
Tabela 1: Descrição dos mico-leões-pretos usados no estudo, a composição do grupo em que eles estavam inseridos, o sexo, idade e o tamanho do recinto em que cada um estava	44
Tabela2: Valores de R das correlações entre os eixos dos tipos comportamentais e os eixos das formas de reação ao estresse. Os valores com um asterisco (*) apresentam $P<0.05$, e os valores com 2 asteriscos (**) apresentam $P<0.01$	51
Tabela 3: Valores de R das correlações entre os eixos dos tipos comportamentais e eixos das formas de reação ao estresse com os índices hormonais. Os valores com um asterisco (*) apresentam $P<0.05$, e os valores com 2 asteriscos (**) apresentam $P<0.01$	51
Anexo 2	
Tabela 1: Etograma utilizado com descrições detalhadas dos comportamentos observados na população de micos-leões-pretos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.	63
Anexo 3	
Tabela 1: Lista de indivíduos que participaram do experimento de validação, seus pesos, quantidade de ACTH administrado, e horário da injeção	76
Tabela 2: Valores basais, picos (em nanogramas de metabolitos fecais de glicocorticóides por gramas de fezes frescas), taxa de aumento, tempo até o pico e tempo até a primeira amostra após a injeção de ACTH encontrados para o experimento de validação em micos-leões-pretos	77
Anexo 4	
Tabela 1: Tratamento, sexo e número do studbook dos 11 indivíduos utilizados no experimento do ritmo circadiano	83
Anexo 5	
Tabela 1: Frequências relativas médias e desvio padrão de cada categoria comportamental da fêmea que sofreu uma mudança de recinto durante os experimentos. Os valores significativos de p apresentam um (*)	92

Sumário

Capitulo I - Efeitos das condições de cativeiro sobre o comportamento e os níveis hormonais de micos-leões-retos.....11

1. Introdução.....12
2. Materiais e método.....15
    2.1. Local e sujeitos do estudo.....15
    2.2. Coleta de dados.....16
    2.3. Extração e dosagem.....16
    2.4. Análise dos dados.....17
3. Resultados.....18
    3.1. Efeito das condições de cativeiro, do período do dia e estação do ano sobre o comportamento e MFGs.....18
    3.2. Correlação entre comportamento e MFGs.....23
4. Discussão.....24
    4.1. Condições de cativeiro.....24
    4.2. Período do dia.....30
    4.3. Estação do ano.....31
5. Conclusão.....32
6. Bibliografia.....33

Capitulo II - Estilos de enfrentamento ao estresse em uma população de micos-leões-pretos em cativeiro.....40

1. Introdução.....41
2. Materiais e método.....44
    2.1. Local e sujeitos do estudo.....44
    2.2. Coleta de dados.....44
    2.3. Extração e dosagem.....45
    2.4. Análise dos dados.....46
3. Resultados..... 47
    3.1. Identificação de padrões de comportamento gênero-normativos e comportamentos potencialmente indicadores de estresse.....47
    3.2. Identificação de eixos do perfil comportamental..... 48
    3.3. Identificação dos eixos de formas de reação ao estresse.....49

3.4. Relação tipo comportamental, formas de reação ao estresse e MFGs.....50
4. Discussão.....52
5. Conclusão.....55
6. Bibliografia.....56
Anexo 1 – Caracterização do Recinto.....61
Anexo 2 – Etograma para Micos-leões-pretos.....63
Anexo 3 – Validação do protocolo experimental de extração e dosagem de metabólitos fecais de glicocorticóides para o mico-leão-preto.....74
Anexo 4 – Variação dos níveis de cortisol ao longo do em micos-leões-pretos.....82
Anexo 5 – Efeito do isolamento social no comportamento e nos níveis de cortisol de uma fêmea de mico-leão-preto.....91

Capítulo I

Efeitos das condições de cativeiro sobre o comportamento e os níveis hormonais de micos-leões-pretos

1. INTRODUÇÃO

O ambiente de cativeiro pode afetar a saúde física e psicológica dos animais, influenciando assim o bem-estar animal (DAWKINS, 2004, 2006; FRASER *et al*, 2009). Entretanto, há uma grande dificuldade em avaliar o bem-estar diretamente, sendo necessárias medidas indiretas como a avaliação do nível de estresse (MASON *et al*, 2007; MASON, 2010; MORGAN e TROMBORG, 2007). Existem várias maneiras de medir o estresse como medidas como a dosagem de hormônios glicocorticóides (ABBOTT *et al*, 2003; RANGEL-NEGRIN, *et al*, 2009; GÓMEZ-ESPINOSA *et al*, 2014), comportamentos potencialmente indicadores de estresse (BPIS) (POMERANTZ *et al*, 2013), perfis leucocitários (DAVIS *et al*, 2008), entre outros. Entretanto, a relação entre essas medidas e o estresse ainda é mal compreendida (ROMERO, 2004; TOUMA *et al*, 2005; MADLIGER e LOVE, 2012; STETZ *et al*, 2013), o que justifica a combinação de diferentes métodos para fazer esse tipo de inferência.

O estresse é um mecanismo de defesa do organismo para os desafios cotidianos ou extraordinários (estressores) que envolve primariamente vias neuroendócrinas que sustentam o comportamento adaptativo (BOERE, 2002). Eventos estressantes desencadeiam uma resposta do organismo, podendo essa ser fisiológica e/ou comportamental, que permite com que o indivíduo se prepare para situações de luta ou fuga (SAPOLSKY, 1990, ROMERO, 2002, 2004; MORGAN e TROMBORG, 2007). Em uma resposta fisiológica ao estresse ocorre a liberação de glicocorticóides na corrente sanguínea. Esses hormônios redirecionam o fluxo sanguíneo e mobilizam glicose do fígado para órgãos que são necessários na resposta de "luta ou fuga", como coração, músculos esqueléticos e cérebro (SAPOLSKY, 1990). As modificações geradas por essa resposta levam a um aumento do débito cardíaco; cognição aguçada e diminuição na percepção da dor (SAPOLSKY, 1990). Além disso, atividades fisiológicas que não apresentem benefícios imediatos, como crescimento, reprodução, inflamação e digestão são inibidas (SAPOLSKY, 1990). Um dos eixos que é ativado por um estressor é o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), que faz com que ocorra a liberação de glicocorticóide (GCs - mais especificamente cortisol, em primatas) na circulação (ROMERO, 2002). Desse modo, uma ferramenta não invasiva para medir hormônios GCs, e consequentemente o estresse, é a dosagem de metabólitos fecais de glicocorticóides (MFGs) (MILLSPAUGHA e WASHBURNB, 2004; GLADBACH *et al*, 2011).

Podem-se classificar dois tipos de agentes estressores: agudos e crônicos. Estressores agudos estão presentes por um curto período de tempo (como ataques de predadores e

tempestades). Já estressores crônicos são aqueles que persistem ao longo do tempo (por exemplo, perda de habitat, baixo oferta de alimentos, subordinação), ativando de forma constante o eixo HHA, trazendo efeitos negativos na saúde e fitness do organismo (ROMERO, 2004). Exemplos desses efeitos são: fadiga no tecido muscular cardíaco e esquelético, hipertensão causada pelas mudanças cardiovasculares, diminuição da atividade do sistema imune, diminuição da eficiência de detecção do cio, aumento de perdas embrionárias ou mesmo comprometimento da maturação final dos folículos e atraso ou impedimento de ovulação (RANGEL-NEGRÍN *et al*, 2009;COSTA e SILVA *et al*, 2010; MADLIGER e LOVE, 2012; MENDONÇA-FURTADO, 2012). Dessa forma, estressores crônicos podem afetar, além do bem-estar animal, a reprodução, a adaptação e a viabilidade populacional (RANGEL-NEGRÍN *et al*, 2009).

Grande parte dos estudos de hormônios de estresse aplicados à conservação é baseada no pressuposto de que o aumento dos níveis de glicocorticóides é sempre um indicativo de ambientes estressantes (MADLIGER e LOVE, 2012). Contudo, algumas evidências sugerem que a correlação dos glicocorticóides com o ambiente é muito mais complexa, sendo que os níveis desses hormônios podem variar de acordo com gênero, idade, fase do ciclo de vida, período do dia, qualidade do meio ambiente, estações do ano, temperatura, dieta e entre indivíduos (KOOLHASS, 1999, 2010; ROMERO, 2004; TOUMA *et al*, 2005; MADLIGER e LOVE, 2012; STETZ *et al*, 2013).

Nesse contexto, o ambiente de cativeiro pode agir como estressor crônico para alguns indivíduos, pois apresenta muitos fatores que podem levar ao aumento do estresse: nutrição inadequada, fatores ambientais não adequados (temperatura, umidade, luminosidade, entre outros), espaço reduzido, falta de estrutura do recinto, presença contínua de seres humanos, e mudanças nos padrões de agrupamento (ESTEP e DEWSBURY, 1996; RANGEL-NEGRÍN *et al*, 2009). Dessa maneira, o cativeiro pode resultar em inúmeras alterações comportamentais para diversas espécies (HEDIGER, 1970; POMERANTZ *et al*, 2013), principalmente para animais que apresentam alta inteligência e grande complexidade social, como os primatas (YERKES, 1925; MASSEM *et al*, 2010; POMERANTZ *et al*, 2013). O cativeiro pode, assim, aumentar a frequência de comportamentos estereotipados, vigilância, tempo despendido dentro do abrigo, agressão, medo e comportamentos de "freezing"; além disso, pode diminuir a frequência de comportamentos espécie-específicos, comportamentos ligados à reprodução e comportamentos de exploração, reduzindo então a complexidade dos comportamentos (MORGAN e TROMBORG, 2007). Sendo assim, o estudo do

comportamento se torna uma ferramenta complementar à análise de MFGs para avaliar questões em relação ao estresse em cativeiro.

O mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) é, atualmente, uma das espécies de primatas ameaçadas de extinção no Brasil, segundo a lista da União Internacional para a Conservação da Natureza/IUCN. Em consequência da baixíssima probabilidade de sobrevivência da espécie nos próximos cem anos, foi determinado um Plano de Manejo de metapopulação no qual os animais devem ser movimentados entre as populações, incluindo as populações de cativeiro (MARTINS, 2003). Entretanto, as populações desses micos em cativeiro apresentam problemas sérios relacionados à reprodução, como: baixo número de casais reprodutores, idade avançada desses casais, altas taxas de mortalidade dos filhotes, consanguinidade, baixa diversidade genética e baixo potencial adaptativo (BURBANO, 2015). Nesse sentido, a redução de comportamentos reprodutivos, comportamentos espécie-específicos, entre outros podem ser interpretados como indicadores de estresse e consequentemente podem caracterizar o bem-estar comprometido de populações cativas (MORGAN e TROMBORG, 2007). Assim, uma importante ferramenta na conservação de espécies ameaçadas de extinção é o aumento do bem-estar animal já que este é um pré-requisito para a manutenção de populações viáveis e para a preservação e proteção de diversidade genética (KLEIMAN *et al*, 1986; BERCOVITCH e ZIEGLER, 1989).

Desse modo, a avaliação de MFGs e análise comportamental se apresentam como ferramentas complementares de grande importância na avaliação do estresse em micos-leões pretos, sendo utilizadas com o propósito de auxiliar na compreensão da fisiologia e manejo desses animais.

Sendo assim, os objetivos desse trabalho são: 1) determinar os efeitos do tamanho de recinto, da composição social, do período do dia e da estação do ano sobre o comportamento e sobre os níveis de MGFs; e 2) determinar a relação entre a frequência dos comportamentos e os níveis de MFGs.Com relação ao objetivo (1), espera-se que animais em recintos menores e em isolamento apresentem maiores frequências de comportamentos potencialmente indicativos de estresse e maiores níveis de MFGs. Também espera-se que os indivíduos em recinto em família apresentem uma maior frequência de comportamentos espécie-específicos, uma menor frequência de BPIS e níveis mais baixos de MFGs. Esperamos também que no período da manhã, em conseqüência do horário de alimentação, e no inverno, em consequência de menores temperaturas, os níveis de MFGs sejam mais altos, bem como a frequência de BPIS seja maior em comparação com o período da tarde e o verão. Com relação

aos objetivos 2, esperamos que algumas categorias comportamentais que indiquem estresse em ambientes de cativeiro se correlacionem positivamente com os níveis de MFGs.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1. Local e sujeitos do estudo

O experimento foi realizado no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), situado no município de Guapimirim, Rio de Janeiro. O CPRJ é localizado dentro do núcleo Paraíso do Parque Estadual dos Três Picos, uma área de proteção ambiental. Somente pessoas autorizadas têm acesso ao local, sendo assim os indivíduos não são expostos ao público.

No total, foram utilizados oito indivíduos para os experimentos, todos machos. Os sujeitos foram mantidos em quatro tratamentos que diferiam em relação à formação social e ao tamanho do recinto: 1) família (um casal com um casal de filhotes em idade adulta) em recinto grande; 2) dupla de machos em recinto grande; 3) casal em recinto grande; e 4) solitário (três machos) em gaiolas pequenas (Tabela 1). Os diferentes tratamentos vão ser considerados como condições de cativeiro diferentes, já que não era possível separar as variáveis composição social e tamanho do recinto, sendo que suas características físicas e ambientais estão descritas no anexo 1. Apesar de dois tratamentos apresentarem fêmeas em sua composição, elas não foram incluídas nas análises porque eram poucas (N=3) para testar o efeito do sexo e podiam enviesar nossos dados caso elas fossem incluídas nas análises.

Tabela 1 – Lista dos indivíduos de mico-leão-preto usados na coleta de dados

Indivíduos	Tratamento	Idade	Tamanho do recinto	Tamanho do grupo	Densidade populacional
M1	Família	5 anos	3.0 x 6.0 x 2.5 m	4 indivíduos	11.2 indivíduos por m³
M2		19 anos			
M5	Casal	9 anos	3.0 x 6.0 x 2.5 m	2 indivíduos	22.5 indivíduos por m³
M3	Dois machos	15 anos	3.0 x 6.0 x 2.5 m	2 indivíduos	22.5 indivíduos por m³
M4		5 anos			
M6	Solitário	9 anos	0.45 x 0.45 x 0.45m	Isolamento	0.09 indivíduos por m³
M7		8 anos			
M8		9 anos			

Os indivíduos eram alimentados duas vezes ao dia (às 8h e às 11h da manhã). Na primeira refeição era oferecido pão com vitaminas dissolvidas em leite, ou ração, e na segunda refeição eram oferecidas frutas da época (banana, maçã, uva, pepino, laranja, abacaxi e melancia). A água era oferecida durante o tempo que o alimento estava disponível, e era

retirada no período da tarde com os potes de comida. Nas gaiolas individuais, os animais muitas vezes viravam o pote de água e ficavam sem água até o próximo trato ser oferecido.

Para a identificação das fezes dos animais que se encontravam no mesmo recinto, foi oferecida uma guloseima com corante alimentício. Os corantes foram adicionados a guloseimas (uva passa, larvas de tenébrios, doce de banana sem açúcar, bala de goma ou banana amassada com Neston - 3 cereais (Nestlé), farinha de aveia e farinha láctea) que foram oferecidas separadamente para cada indivíduo 30 minutos antes das refeições.

2.2. Coleta de dados

A coleta foi realizada por 15 dias durante o verão (25 de janeiro a 19 de fevereiro de 2016) e 15 dias durante o inverno (30 de maio a 17 de junho de 2016), totalizando 30 dias. Devido a questões de manejo, os dados do M5 só foram coletados durante 25 dias. Nas semanas anteriores a cada fase do experimento, uma no verão e outra no inverno, foi realizada a habituação dos indivíduos à presença da pesquisadora (3 semanas no verão [incluiu também testes com corantes e elaboração do etograma] e 1 semana no inverno), a qual consistiu na observação e entrada no recinto duas vezes ao dia.

Com o início da coleta de dados, cada indivíduo foi observado duas vezes por dia (uma pela manhã e uma pela tarde) pelo método animal focal durante 10 minutos com registros a cada 10 segundos. Foram também coletadas as fezes desses animais duas vezes por dia (11h e 16h). Todas as fezes encontradas foram coletadas com o auxílio de um palito de café limpo, e foram então acondicionadas em *eppendorf*s e identificadas em relação à data, horário, sujeito. Dados de luminosidade, temperatura e umidade foram coletados para serem inseridos como covariáveis nos modelos estatísticos a fim de levar em conta o efeito dessas variáveis no comportamento e nos níveis de MFGs. Para a coleta desses dados foram utilizados um datalogger Extech instrumental RHT10 Graph para medir a temperatura e a umidade, e um datalogger Testo 540 para medir a luminosidade.

2.3. Extração e dosagem

As fezes obtidas ao longo dos experimentos foram conservadas em um freezer à -20ºC no próprio CPRJ. As amostras foram transportadas em isopor com gelo até o Laboratório de Endocrinologia Comportamental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. Para a extração, as amostras foram retiradas do freezer e deixadas em temperatura ambiente até descongelarem. Devido à incerteza do horário em que cada uma dessas fezes foi feita, todas as amostras de um mesmo indivíduo, em um mesmo dia, e no mesmo período foram

agrupadas. Esse conjunto de fezes foi então homogeneizado com o auxílio de uma espátula de metal. Uma alíquota de 0,2g da amostra homogeneizada e úmida foi pesada em balança analítica, e acondicionada em um novo tubo devidamente identificado. Então, os metabólitos fecais de glicocorticóides foram extraídos acrescentando-se 2ml de metanol 80% à amostra (detalhes em Palme *et al*. [2013]). Esse extrato foi seco em banho-maria acoplado a um fluxo de ar, para transporte ao laboratório do Prof. Rupert Palme, na Universidade de Medicina Veterinária, em Viena, na Áustria. Lá esses extratos foram re-suspendidos e dosados seguindo o protocolo de Palme e Möstl (1997).

2.4. Análise dos dados

Primeiramente foram calculadas a frequência relativa de cada comportamento por indivíduo por dia e por período. As frequências dos comportamentos presentes em cada categoria comportamental (etograma – anexo 2) foram somadas a fim de chegar a um valor para cada categoria comportamental. Essas frequências de cada categoria comportamental por indivíduo foram calculadas pela divisão de todos os pontos de cada categoria (soma de pontos de todos os comportamentos dentro de cada categoria como observado no etograma) pelo total de ocorrências registradas durante toda a observação.

Para testar o efeito do recinto, foi realizada uma Análise Multivariada de Covariância (MANCOVA), com todas as categorias comportamentais e níveis de MFGs como variáveis dependentes, tratamento (família, casal, dupla de machos e gaiolas individuais), o período do dia e a estação do ano como variáveis independentes, e a temperatura e luminosidade como covariáveis. Também foi rodado um teste post-hoc por contraste simples para saber entre quais tratamentos quais as categorias comportamentais eram diferentes entre si.

Para determinar se existe correlação entre os comportamentos e os índices hormonais, usamos correlações simples de Pearson. Os índices hormonais calculados foram: os níveis basais, o pico, a média, a reatividade média e a reatividade máxima de MFGs. Os níveis basais foram medidos através do cálculo da mediana dos valores de cada indivíduo após a retirada iterativa de outliers e outliers selvagens. O pico foi o maior outlier encontrado para cada indivíduo. A média foi calculada com todos os valores, inclulindo os outliers e outliers selvagens. A reatividade média foi calculada através da subtração da média dos outliers e outliers selvagens pelos valores basais. E a reatividade máxima foi calculada pela subtração do pico pelos valores basais. Todas as análises foram realizadas pelo software IBM SPSS Statistics 20.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da condição de cativeiro, do período do dia e estação do ano sobre o comportamento e MFGs

O resultado da Análise Multivariada de Covariância foi significativo ($F=3.68$, $p<0.001$, $DF= 153$ e $n=486$), sendo que o tratamento ($p<0.0001$), o período do dia ($p<0.0001$) e a estação do ano ($p<0.05$) tiveram um efeito significativo no orçamento de atividades dessa população. As covariáveis temperatura ($p<0.0001$) e luminosidade ($p<0.0001$) também tiveram um efeito significativo no orçamento de atividades dessa população de mico-leão-preto.

Condição de cativeiro

Os níveis médios de MFGs (MANCOVA) foram significativamente maiores somente na dupla de machos em comparação com o tratamento família ($p<0.0005$), casal ($p<0.05$) e gaiolas individuais ($p<0.0005$) (Fig 1). Além disso, os valores basais e reatividade média foram maiores na dupla de machos do que nos outros tratamentos enquanto que pico e reatividade máxima foram maiores nas gaiolas individuais (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores dos índices hormonais (basal, pico, reatividade média e reatividade máxima) para os diferentes tratamentos.

	Basal	Pico	Reatividade média	Reatividade máxima
Família	61 ±47	1034	376	973
Dupla de machos	139 ±177	1869	1039	1729
Casal	107 ±148	609	502	502
Gaiolas individuais	43 ±44	3311	675	3268

De 16 categorias comportamentais, dez foram significativamente diferentes entre o tratamento família e o recinto com dois machos. Assim, a dupla de machos apresentou maiores frequências de alimentação ($p<0.0005$), deslocamento ($p<0.05$), exploração de ambiente ($p<0.05$), vocalização ($p<0.05$), e comportamento anormal ($p<0.0005$) enquanto apresentaram valores menores de vigilância ($p<0.05$), comportamento social positivo ($p<0.05$), comportamento auto-direcionado ($p<0.05$), investigação de outro individuo ($p<0.05$), e coçar ($p<0.05$) do que o tratamento família.

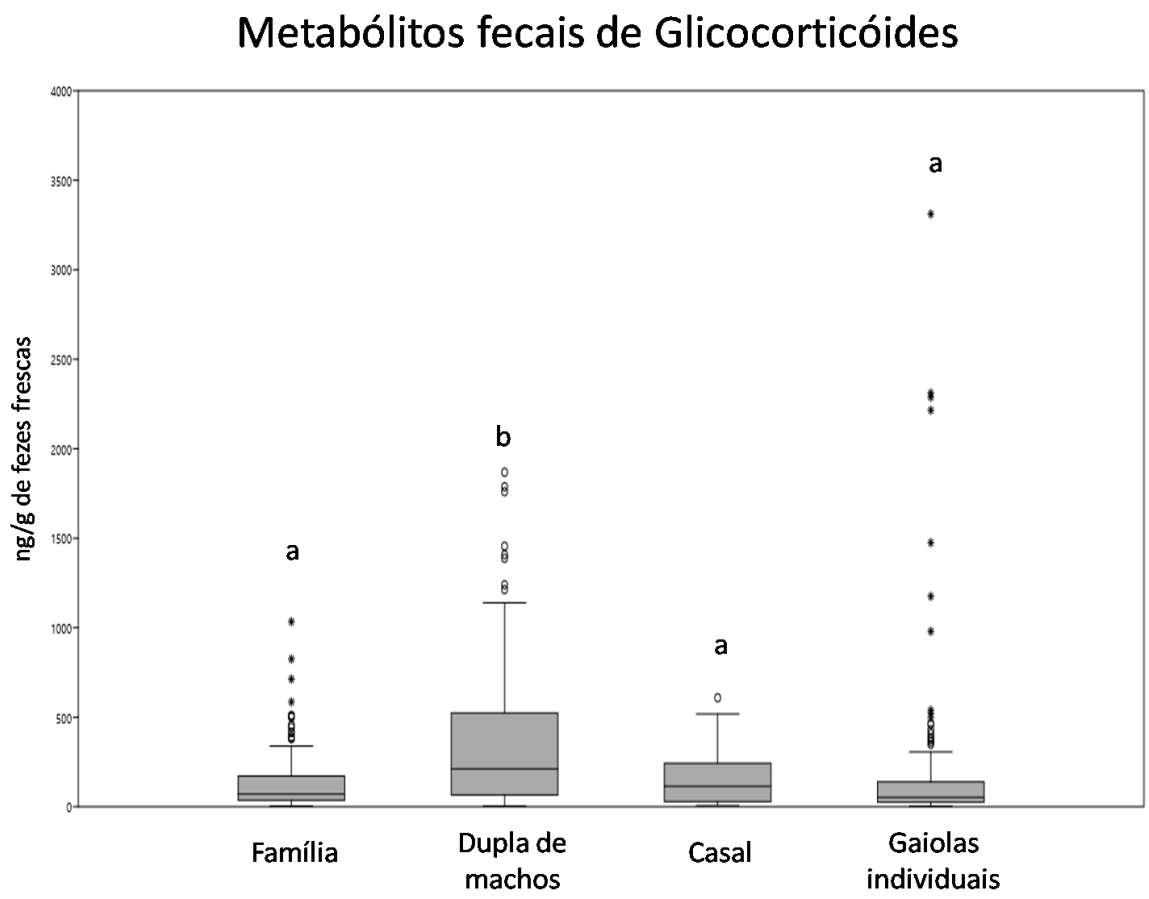

Figura 1 – Valores de metabólitos fecais de glicocorticóides em nanogramas de metabolitos fecais de glicocorticóides por gramas de fezes frescas. Os valores que foram significativamente diferentes apresentam letras diferentes.

Entre o tratamento família e o tratamento casal, sete das 16 categorias individuais foram significativamente diferentes. O tratamento família apresentou maiores valores em inatividade ($p<0.005$), vigilância ($p<0.005$), comportamento territorial ($p<0.05$), comportamento auto-direcionado ($p<0.05$), exploração de ambiente ($p<0.05$) e coçar ($p<0.05$), e menor frequência em tempo dentro do abrigo ($p<0.0005$) do que o tratamento casal (Fig 2).

Oito de 16 categorias diferiram entre o tratamento família e gaiolas individuais. O tratamento família apresentou maiores valores em inatividade ($p<0.0005$), deslocamento ($p<0.0005$), comportamento agonístico ($p<0.05$), comportamento territorial ($p<0.05$), exploração de ambiente) ($p<0.005$) e menores frequências em tempo despendido dentro do abrigo ($p<0.0005$), coçar ($p<0.0005$) e estereotipias ($p<0.0005$) do que as gaiolas individuais (Fig 2).

Sete categorias foram significativamente diferentes entre a dupla de machos e o casal . O tratamento dupla de machos apresentou maiores frequências em inatividade ($p<0.05$), vigilância ($p<0.05$), alimentação ($p<0.005$), deslocamento ($p<0.0005$), comportamento territorial ($p<0.05$), e exploração de ambiente ($p<0.0005$) e menor frequência em tempo dentro do abrigo ($p<0.0005$) do que o tratamento casal (Fig 2).

Entre a dupla de machos e as gaiolas individuais, 12 comportamentos foram significativamente diferentes. A dupla de machos apresentou maiores frequências de inatividade ($p<0.0005$), alimentação ($p<0.0005$), deslocamento ($p<0.0005$), comportamento agonístico ($p<0.05$), comportamento territorial ($p<0.0005$), exploração de ambiente ($p<0.0005$) e comportamentos anormais ($p<0.0005$) e menores frequências em vigilância ($p<0.05$), comportamento auto-direcionado ($p<0.0005$), tempo dentro do abrigo ($p<0.0005$), coçar ($p<0.0005$) e estereotipias ($p<0.0005$) (Fig 2).

E de 16 comportamentos, seis foram significativamente diferentes entre o tratamento casal e o tratamento das gaiolas individuais. As gaiolas individuais apresentaram maiores frequências em vigilância ($p<0.0005$), comportamento auto-direcionado ($p<0.005$), coçar ($p<0.0005$) e estereotipias ($p<0.005$) e menores frequências em deslocamento ($p<0.05$) e tempo dentro do abrigo ($p<0.05$) (Fig 2).

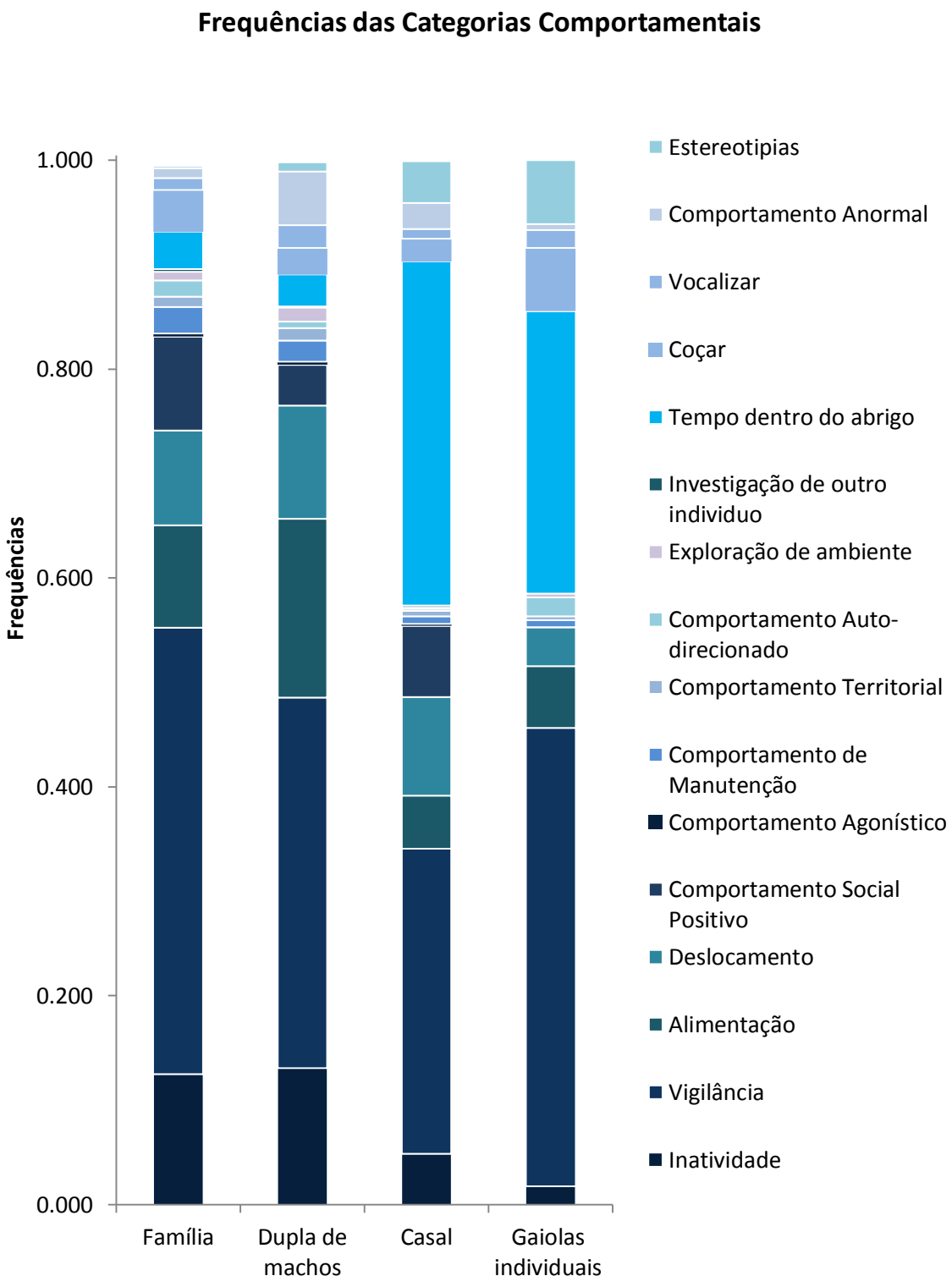

Figura 2 – Médias e desvio padrão das frequências de cada categoria comportamental dos tratamentos família, dupla de machos, casal e gaiolas individuais para todas as categorias comportamentais (Inatividade, vigilância, alimentação, deslocamento, comportamento social positivo, comportamento agonístico, comportamento de manutenção, comportamento territorial, comportamento auto-direcionado, exploração de ambiente, investigação de outro indivíduo, tempo dentro do abrigo, coçar, vocalizar, comportamento anormal e estereotipias.

Período do dia e estações do ano

Os níveis médios de MFGs (MANCOVA) não diferiram nem entre os diferentes períodos do dia e nem entre as estações do ano. Entretanto, os valores basais, picos, reatividade média e reatividade máxima foram maiores durante o período do verão (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores dos índices hormonais (basal, pico, reatividade média e reatividade máxima) para diferentes períodos do dia e estações do ano.

	Basal	Pico	Reatividade média	Reatividade máxima
Manhã	29 ±33	3311	530	3282
Tarde	79 ±72	2310	633	2231
Verão	57 ±67	3311	725	3254
Inverno	54 ±65	1787	575	1733

Sete categorias comportamentais diferiram significativamente entre os períodos do dia. De manhã houve maiores frequências em vigilância ($p<0.05$), deslocamento ($p<0.0005$), exploração de ambiente ($p<0.0005$), vocalizar ($p<0.0005$), e comportamento estereotipados ($p<0.005$), e menores frequências em inatividade ($p<0.05$) e em comportamentos anormais ($p<0.0005$) (Fig. 6A). Já entre as diferentes estações do ano, quatro categorias apresentaram diferenças significativas. No inverno houve maiores frequências de comportamento de manutenção ($p<0.005$), comportamento territorial ($p<0.05$) e exploração de ambiente ($p<0.05$), e menor frequência de comportamentos estereotipados ($p<0.005$) (Fig. 6B).

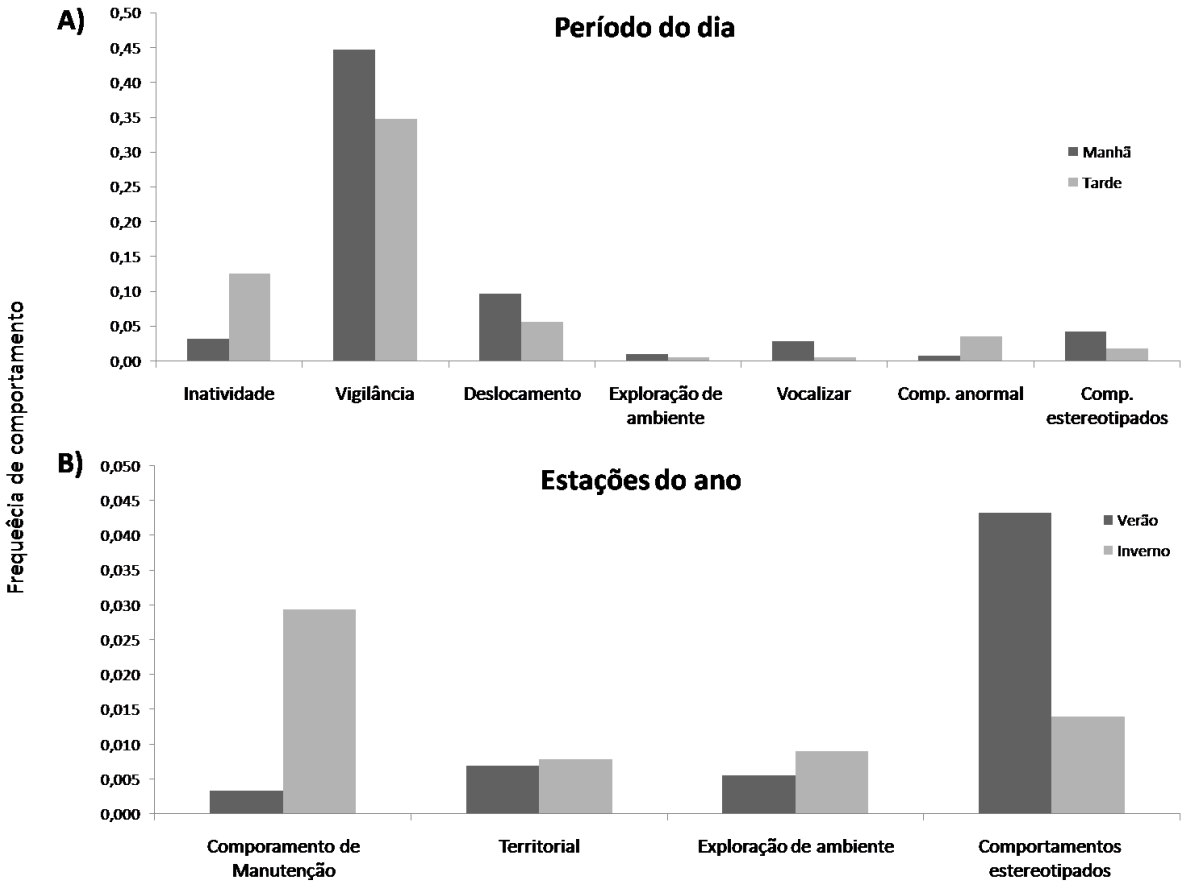

Figura 3 – Médias das frequências de categorias comportamentais que foram significativamente diferentes entre A) Períodos do dia, e B) Estações do ano (verão e inverno).

3.2. Correlação entre comportamento e MFGs

Como resultado das correlações temos que: 1) A categoria inatividade está correlacionada positivamente com médias de MFGs; 2) Comportamentos investigativos direcionados a outros indivíduos estão correlacionados negativamente com picos e reatividade máxima de MFGs; e 3) Comportamento anormal está correlacionado positivamente com níveis basais de MFGs (Tabela 4).

Além disso, algumas tendências foram observadas nos resultados da correlação: 1) Comportamentos sociais positivos são negativamente correlacionados com picos, e reatividade máxima; 2) Comportamento agonistico se relaciona positivamente com as médias de MFGs; 3)Comportamento auto-direcionado se relaciona positivamente com as médias de MFGs; 4) Tempo despendido dentro do abrigo se relaciona negativamente com as médias de MFGs; e 5) Estereotipias se relaciona negativamente com as médias de MFGs (Tabela 3).

Tabela 4 – Valores de R para as correlações entre os índices hormonais e as categorias comportamentais. As diferenças significativas ($p<0.05$) estão demonstradas com asteriscos (**), e as tendências ($p<0.1$) estão demonstradas com um asterisco (*).

	Basal	Pico	Média	Reatividade média	Reatividade máxima
Inatividade	.452	-.516	**.968****	.165	-.531
Vigilância	-.698	.441	.308	-.117	.471
Alimentação	.423	.377	.406	.846	.344
Deslocamento	.705	-.831	.763	.034	-.853
Comp.Social positivo	.097	**-.925***	.735	-.606	**-.910***
Comp. Agonístico	.534	-.736	**.926***	.016	-.751
Comp. Territorial	.635	-.516	.893	.308	-.541
Comp. Auto-direcionado	-.178	-.470	**.912***	-.367	-.449
Investigação de outro individuo	.222	**-.986****	.610	-.586	**-.977****
Exploração de ambiente	.519	-.204	.844	.491	-.229
Tempo dentro do abrigo	-.227	.174	**-.911***	-.277	.184
Coçar	-.741	.874	-.633	.011	.898
Vocalizar	.786	-.443	.765	.479	-.478
Comp. Anormal	**.975****	-.315	.390	.670	-.364
Estereotipias	-.476	.739	**-.945***	.034	.750

4. DISCUSSÃO

4.1. Condição de cativeiro

Os indivíduos do tratamento "gaiolas individuais" apresentam menos comportamentos "típicos" da espécie, talvez pela falta de possibilidade de movimentação e interação social, o que parece resultar em muitas estereotipias, muito tempo dentro do abrigo e se coçando. Tanto estereotipias quanto tempo dentro do abrigo foram negativamente correlacionados com os níveis médios de MFGs.Os indivíduos do tratamento "dupla de machos" demonstraram uma concentração média de MFGs significativamente maior do que os outros tratamentos. Além disso, foram os indivíduos com maiores níveis de comportamentos anormais, o que foi positivamente correlacionado com o aumento de MFGs. Os indivíduos do tratamento "casal" são os que passam mais tempo dentro do abrigo em relação a todos os outros tratamentos. Já o tratamento "família" apresenta os menores níveis de comportamentos anormais e estereotipias e frequências comportamentais mais semelhantes às frequências encontradas para espécie na natureza.

Em ambientes de cativeiro, tempo despendido dentro do abrigo, coçar e comportamentos estereotipados, todos encontrados em frequências altas nos sujeitos que se encontravam em gaiolas individuais, podem indicar estresse crônico (CARLSTEAD *et al*., 1993;MAESTRIPI, 1993; KITCHEN E MARTIN, 1996;OLSSON e WESTLUND, 2007; MORGAN e TROMBORG, 2007; PRICE e STOINSKI, 2007). Entretanto, dois desses comportamentos (estereotipias e tempo dentro do abrigo) foram correlacionados negativamente com MFGs. Mason e Latham (2004) levantam suposições de que os comportamentos estereotipados possam ter efeitos calmantes em indivíduos submetidos à ambientes de cativeiro, o que teria como conseqüência uma diminuição nos níveis hormonais. Nesse estudo, como a maior parte das estereotipias é desempenhada por indivíduos em gaiolas individuais, existem duas possibilidades. Os baixos níveis de cortisol basal em gaiolas individuais podem significar que as estereotipias têm um efeito calmante, ajudando os indivíduos a lidarem com uma situação desfavorável. Nesse mesmo sentido, o maior tempo despendido dentro do abrigo também poderia indicar que esses indivíduos lidam de forma apropriada com o estresse. Entretanto, o fato dos menores níveis basais de MFGs terem sido encontrados em gaiolas individuais pode nos dar outra perspectiva sobre o assunto. Em níveis basais, esses hormônios promovem o equilíbrio energético, pois influenciam processos como forrageamento e mobilização de glicose e lipídios, o que permite que os indivíduos atendam suas necessidades energéticas diárias (MADLIGER e LOVE, 2012). Indivíduos em gaiolas individuais apresentam os menores valores basais (43 ±44 ng/gde fezes frescas) comparados com o tratamento família, dupla de machos e casal (61±47, 107±177 e 139±148 ng/g de fezes frescas respectivamente), e maiores picos (3311 ng/gde fezes frescas) quando comparados com os outros 3 tratamentos (1034, 1869 e 609 ng/g de fezes frescas respectivamente). Essa resposta hormonal, pode então demonstrar que por estarem em recintos menores, os indivíduos nas gaiolas individuais não têm a oportunidade de desempenhar uma gama de comportamentos "típicos" da espécie (deslocamento, exploração e comportamentos sociais) que gerariam uma demanda energética que requereriam maiores valores basais de GCs. Já os picos altos sugerem que a resposta a estressores é intensa. Baixos níveis basais também podem ser associados com tédio gerado pelo ambiente empobrecidos.O tédio é característico de indivíduos que parecem ter expectativas menores em relação aos estímulos em seu entorno, diminuindo o desempenho motor, a motivação e os comportamentos de consumo (BOERE, 2001). Além disso, o tédio pode ajudar a desenvolver padrões de estratégias comportamentais alternativas na esperança de aumentar a estimulação ambiental, como coprofagia, posturas anormais, baixa socialização, auto-mutilação, comportamentos estereotipados e expressão de

alguns comportamentos normais fora de contexto (BOERE, 2001). Dessa forma, os baixos valores basais das gaiolas individuais podem demonstrar bem-estar animal comprometido, devido à falta de liberdade de movimento ou ao tédio. Além disso, podemos notar que os indivíduos podem expressar o estresse com muitos comportamentos estereotipados, muito tempo se coçando e dentro do abrigo, entretanto, essas parecem ser as formas que encontraram para lidar com o estresse nessa situação desfavorável. Essa tendência onde as estereotipias parecem diminuir os níveis hormonais e possivelmente acalmar os animais também foi observada em Mendonça-Furtado (2006).

Para indivíduos sociais como os primatas, o isolamento social pode induzir o estresse e afetar profundamente o comportamento, cognição e desenvolvimento de habilidades sociais dos indivíduos (MASON, 1991; OLSSON e WESTLUND, 2007; CRONEY e NEWBERRY, 2007). Morgan e Tromborg (2007) e Price e Stoinski (2007), em duas revisões sobre fontes de estresse físico e sociais em ambientes de cativeiro, apontam o isolamento social como um fator que gera altos índices de comportamentos indicadores de estresse, comportamentos reprodutivos e sociais ineficientes e estresse crônico. Um teste de preferência com macacos-prego mostrou que entre o acesso ao contato social e o alimento, o contato social foi escolhido, até mesmo depois de muitas horas em privação de alimento (DETTMER e FRAGASZY, 2000). Além disso, o contato tátil em primatas não humanos com um co-específico contribui substancialmente para a saúde dos indivíduos (CROCKETT *et al*., 1997 apud OLSSON e WESTLUND, 2007). Nosso desenho amostral não permitiu separar o efeito do isolamento social e do tamanho do recinto em micos-leões-pretos. No entanto, o aumento significativo de estereotipias observado na transferência da fêmea de um recinto grande em família para um recinto grande em isolamento social (anexo 5) indica que uma simples mudança de contexto social pode comprometer o bem-estar dos indivíduos desta espécie. Gottlieb (2013) demonstrou que macacos rhesus (*Macaca mulatta*) acondicionados sozinhos apresentavam mais estereotipias locomotoras do que indivíduos em dupla. Dessa forma, o isolamento social é um dos fatores que pode contribuir para o comprometimento do bem-estar nos indivíduos das gaiolas individuais nessa população de micos, além do efeito do tamanho do recinto. E mesmo que os indivíduos consigam lidar com esse estresse, o isolamento ainda é um problema preocupante nesses recintos, pois impossibilita a expressão de comportamentos sociais típicos da espécie e favorece padrões de comportamento que indicam estresse crônico.

Os recintos devem dar aos animais oportunidades de satisfazer necessidades físicas, psicológicas e sociais (BUCHANAN-SMITH *et al*, 2004; PRESCOTT E BUCHANAN-SMITH, 2004). As dimensões verticais e horizontais dos recintos devem permitir que os

indivíduos desempenhem atividades de locomoção normais das espécies, para não desenvolverem atrofia muscular nem diminuírem a mobilidade (BUCHANAN-SMITH *et al*, 2004). A restrição de movimento devido a limitações de espaço pode ser um dos principais contribuintes para o estresse em cativeiro (MORGAN e TROMBORG, 2007). São vários os fatores que devem ser levados em consideração ao determinar tamanhos de recinto para cada espécie em particular, entre eles: tamanho corporal, peso, tamanho de áreas de vida, arborealidade, uso do espaço do recinto e comprimento do percurso diário - além é claro da complexidade social apresentada por primatas (BUCHANAN-SMITH *et al*, 2004; PRESCOTT E BUCHANAN-SMITH, 2004). Espécies do gênero *Leontopithecus* apresentam o maior tamanho e peso corporais (atinge 26,1cm de comprimento do corpo e 37 cm de cauda e 410 à 700g) entre os calitriquídeos (THOMPSON*et al*, 1994; KIERULFF *et al*. 2002; OLIVEIRA, 2016). Micos-leões dependem de micro-habitats para encontrar alimento de origem animal, assim, necessitam de grandes áreas de vida e distância diária percorrida, podendo chegar a 277ha e 3km em *L. chrysopygus*, as maiores entre calitriquídeos (KIERULFF *et al*. 2002). Além disso, apesar de todos os calitriquídeos serem arborícolas, há uma diferença entre preferência de uso do espaço em cativeiro (alguns indivíduos preferem as partes de baixo do recinto enquanto outros preferem ficar mais no alto), o que pode diminuir o espaço utilizado pelos indivíduos (KIERULFF *et al*. 2002; PRESCOTT E BUCHANAN-SMITH, 2004). Dessa forma, quanto menor o recinto, como no caso das gaiolas individuais, menores são as oportunidades de deslocamento e exploração de ambiente, comportamentos importantes na natureza, o que também pode favorecer maiores frequências de comportamento auto-direcionado, de tempo despendido dentro do abrigo, o comportamento de coçar e comportamentos estereotipados e também os menores valores de MFGs, caso isso tenha relação com restrição de movimentação.

O tratamento "dupla de machos" apresentou frequências de comportamentos anormais (caracterizados basicamente pela estimulação do ânus para a produção de fezes e sua posterior ingestão) e concentração média de MFGs significativamente maiores que os outros tratamentos. Na natureza, calitriquídeos podem apresentar um sistema de acasalamento monogâmico ou poliândrico cooperativo, onde todos os indivíduos do grupo social (2 a 8 indivíduos entre machos e fêmeas) ajudam a cuidar da prole (BAKER *et al*, 2002; BALES *et al*, 2006). Esses grupos sociais podem conter dois machos adultos (aparentados ou não entre si), mas na maioria das vezes somente o macho alfa pode copular com a fêmea reprodutora (BAKER *et al*, 2002; BALES *et al*, 2006). Bales e colaboradores (2006), em um estudo sobre a relação entre hormônios (testosterona e cortisol) e hierarquia em *L. rosalia*, não encontraram

diferenças nos níveis de cortisol entre machos de diferentes status hierárquicos. Apesar da hierarquia não influenciar os níveis de cortisol nesse estudo em vida livre, a ausência da possibilidade de acasalamento poderia explicar os níveis de cortisol aumentados no tratamento dupla de machos. Além disso, o ambiente de cativeiro não dá opções aos machos para sair daquela situação, assim, machos não teriam a oportunidade de migrar caso a tensão social fosse muito grande. Esses indivíduos também apresentam os maiores níveis de comportamentos ativos (deslocamento, exploração, vocalização entre outros), sendo assim, como o cortisol é um hormônio que em níveis basais promovem o equilíbrio energético, (MADLIGER e LOVE, 2012), os níveis aumentados desses hormônios podem também estar ligados à necessidade energética desses indivíduos.

Krief e colaboradores (2004) discutem que a coprofagia em primatas em cativeiro pode ser explicada por: a) deficiência alimentar, b) tédio, c) estresse social e d) problemas médicos. Primatas neotropicais necessitam de altas taxas de proteína por dia, cerca de 3.35 g e de 4.76 g de proteína para micos-leões-dourados e micos-leões da cara dourada (Yaxley, 2007 apud BAIRRÃO RUIVO, 2010). Foi relatado um aumento da ingestão de fezes em resposta a deficiência de proteínas, em saguis comuns(FLURER eZUCKER, 1988). Em um trabalho com macacos pregos, a coprofagia pareceu estar ligada a deficiências alimentares, e não com estresse social, pois foi mais frequente no período da tarde, sendo que a alimentação dos indivíduos é fornecida somente uma vez no período da manhã (PRATES e BICCA-MARQUES, 2005). Nesse estudo, o comportamento anormal, no qual está incluído o comportamento de coprofagia (e estimulação anal para a produção de fezes e posterior ingestão), também ocorre em maior frequência no período da tarde, período em que não era fornecido mais alimento, podendo assim ser classificado como deficiência nutricional. Além disso, baseada na composição de sua dieta, ração (que eles quase não ingeriam), pão e frutas da época, há uma grande possibilidade da falta de proteína ter causado o aumento da estimulação anal/coprofagia. Entretanto, como o tratamento que mais apresentou esse padrão de comportamento foi a"dupla de machos", e já que esse padrão de agrupamento não é natural da espécie, a coprofagia também pode representar um estresse social. Dessa forma, diferente do que ocorre para estereotipias e tempo dentro do abrigo que se correlacionam negativamente com níveis médios de MFGs, os comportamentos anormais, ao se correlacionarem positivamente com níveis médios de MFGs, parecem ser somente uma expressão desse estresse, e não uma forma de aliviar as tensões, e diminuir os valores de MFGs.

O tratamento “família” apresenta os menores níveis de comportamentos anormais e estereotipias e mais comportamentos “naturais” da espécie. Tanto para fins na conservação quanto para o bem-estar desses animais, é importante que calitriquídeos em cativeiro sejam capazes de desempenhar comportamentos “naturais” da espécie (BAIRRÃO RUIVO, 2010). Na natureza, o orçamento de atividades dos micos-leões é dividido essencialmente entre alimentação, deslocamento, forrageamento e inatividade. Indivíduos em ambiente selvagem passam de 10 a 33% do seu orçamento de atividades se deslocando, o que se assemelha mais com o tratamento família (9%) e em dupla (10.4%) e casal (9,4%) do que com indivíduos em gaiolas individuais (3.6%). Para comportamentos de alimentação e forrageamento, na natureza, os indivíduos despendem de 6 à 29%, e 2 à 15% (KIERULFF *et al*. 2002) (se somados, 8 à 44%) respectivamente, enquanto que em cativeiro foram obtidas medias de 17%, 9%,5%,e 5% na alimentação (o que inclui tanto comportamentos de ingerir alimentos quanto forrageamento no etograma) para dupla de machos, família, casal e gaiolas individuais respectivamente. Como a maioria dos primatas, os micos-leões são espécies sociais, que apresentam em seu orçamento de tempo comportamentos sociais (social positivo, investigação de indivíduos) em ambientes naturais com o intuito de formar e manter a coesão do grupo (KIERULFF *et al*. 2002). Dessa forma, com uma frequência e gama de comportamentos parecidas com as encontradas em ambientes selvagens, o tratamento família parece ser o com melhor bem-estar entre todos os tratamentos.

Por mais que os indivíduos do tratamento casal não apresentem muitas diferenças significativas com o tratamento família, são os indivíduos que passam maior tempo dentro do abrigo, o que pode indicar estresse crônico (MORGAN e TROMBORG, 2007). Entretanto, esse tempo dentro do abrigo foi correlacionado negativamente com os hormônios glicocorticóides, o que pode sugerir que tenha um efeito calmante e seja uma forma de lidar com o estresse nesses ambientes (como já foi citado acima). Além disso, o tratamento família e o tratamento casal apresentam maiores frequências de comportamento social entre os recintos, o que foi correlacionado negativamente com picos e reatividade máxima de MFGs, ou seja, parece estar ligado à redução do estresse. Como já apresentado, o contato social é muito importante para primatas (DETTMER e FRAGASZY, 2000; CROCKETT *et al*., 1997 apud OLSSON e WESTLUND, 2007). Já que o contato tátil em primatas contribui substancialmente para a saúde dos indivíduos (CROCKETT *et al*., 1997 apud OLSSON e WESTLUND, 2007), comportamentos sociais e comportamentos investigativos de outros indivíduos podem reduzir o estresse em cativeiro. Já foi demonstrado para babuínos que viver em grupos sociais reduz os níveis de hormônios glicocorticóides, e consequentemente o

estresse, o que pode aumentar então o bem-estar (RAY e SAPOLSKY, 1992; VIRGIN e SAPOLSKY 1997). Dessa forma, mesmo com altos níveis de tempo dentro do abrigo, o tratamento casal talvez seja a segunda melhor condição de cativeiro em que os micos podem ser colocados.

4.2. Período do dia

O período do dia afetou a frequência dos comportamentos expressados, mas não afetou as médias de MFGs. No período da manhã, foram apresentadas maiores frequências nas categorias de vigilância, deslocamento, exploração de ambiente, vocalizar e comportamento estereotipado, e menores frequências em inatividade e nos comportamentos anormais. Embora a média das concentrações de MFGs não tenha diferido entre períodos, o valor basal de MFGs foi maior no período da tarde (79±72 x 29±33 ng/g por fezes frescas), mas o pico foi maior no período da manhã (3311ng/g x 2310ng/g por fezes frescas) (Ver anexo 1).

Dessa forma, percebe-se uma tendência para uma maior atividade no período da manhã em relação ao período da tarde. Animais em cativeiro enfrentam um cronograma geralmente rígido e sem muita variação temporal, o que impõe aos indivíduos uma alta previsibilidade e falta de controle sobre o ambiente, gerando frustração e estresse crônico (VASCONCELOS *et al*, 2016; BASSET e BUCHANAN-SMITH, 2007). As rotinas de alimentação previsíveis são associadas com "atividades antecipatórias", a qual é caracterizada por um aumento da excitação e atividade dos animais em cativeiro antes da alimentação (BASSET e BUCHANAN-SMITH, 2007). Esse comportamento antecipatório é observado em várias espécies de primatas, e incluem uma gama variável de comportamentos desempenhados (WASSERMAN e CRUIKSHANK, 1983; BLOOMSMITH e LAMBETH, 1995;WAITT e BUCHANAN-SMITH, 2001). Desse modo, níveis mais altos de atividade durante o período da manhã (vigilância, deslocamento, exploração de ambiente, vocalizar e nos comportamentos estereotipados) podem expressar ansiedade de "atividades antecipatórias", já que a alimentação no CPRJ era fornecida exclusivamente na parte da manhã (8h e 11h). Os resultados encontrados para a validação do EIA (Anexo 3), mostram uma janela de tempo de em média 20 horas entre a contenção e injeção de ACTH e o pico de MFGs, permitem que essa hipótese possa ser confirmada, já que o estresse de um período, só iria ser encontrado no mesmo período do dia seguinte. Além da ausência de fornecimento de alimentos no período da tarde, um aumento na temperatura nesse período também pode explicar o aumento na frequência da inatividade, já que em períodos que a temperatura

ambiente está mais alta (11h às 14h) há um aumento na inatividadede indivíduos selvagens (KIERULLF *et al,* 2002).

Comportamentos estereotipados e vigilância também podem indicar estresse crônico (MORGAN e TROMBORG, 2007), sendo assim, uma maior frequência desses comportamentos poderiam indicar, maior nível de estresse no período da manhã ao invés de ansiedade de atividades antecipatórias.

4.3. Estação do ano

Houve um aumento significativo de comportamentos de manutenção, comportamento territorial e exploração do ambiente, e uma diminuição de comportamentos estereotipados durante o período do inverno. Não houve diferença significativa entre as médias das concentrações de MFGs entre as estações, entretanto os picos, reatividade média e máxima foram muito maiores no período do verão. De acordo com a estratégia mundial de bem-estar animal de zoológicos e aquários (World Associationof Zoos and Aquariums – WAZA United for Conservation) temperaturas extremas, que estão no domínio ambiental do "modelo dos cinco domínios" para compreender o bem-estar animal, podem gerar impactos negativos no comportamento de animais em cativeiro. Ainda dentro desse domínio, para o bem-estar favorável, o ambiente deve prover oportunidades na escolha dos ambientes.

Espécies animais apresentam uma zona de neutralidade térmica onde o seu metabolismo não é alterado por mudanças na temperatura do ambiente. Valores acima e abaixo desse nível aceitável farão com que os indivíduos promovam mudanças fisiológicas e comportamentais para lidar com a mudança (THOMPSON *et al*, 1994). Já foi demonstrado que temperaturas mais baixas podem favorecer o aparecimento de comportamentos estereotipados em elefantes africanos (*Elephas maximus*) (REES, 2002), indivíduos com a zona de termo-neutralidade alta devido ao ambiente em que ocorrem. Já coelhos, apresentam comportamentos maternos e sexuais anormais com o aumento da temperatura ambiental (MARAI e RASHWAN, 2004). Dessa forma, um aumento das estereotipias, picos e reatividades de MFGs no período do verão, onde a média de temperatura foi de 30.5ºC (contra 21.7ºC no inverno), pode estar relacionada com uma possível fuga da zona de neutralidade térmica do mico-leão-preto. Visto que micos-leões-pretos apresentam uma zona de ocorrência em regiões com temperaturas mais amenas no Estado de São Paulo, as temperaturas mais altas do estado do Rio de Janeiro e um ambiente com pouca oportunidade para os indivíduos escolherem ambientes mais confortáveis, podem ter gerado estresse térmico promovendo uma

maior incidência de comportamentos estereotipados, picos e reatividade de MFGs no período do verão.

Comportamentos de exploração foram maiores no período do inverno. Micos-leões apresentam um alto gasto metabólico, necessitando de muita energia para a manutenção do peso corporal (KIERULLF *et al,* 2002). Dessa forma, como a quantidade diária de alimento disponibilizada não varia entre as estações no CPRJ, os indivíduos podem aumentar comportamentos exploratórios para a procura de alimentos no período do inverno (nesse caso, não somente através de forrageamento, mas também com exploração de ambiente).

Comportamentos de manutenção foram mais frequentes durante o período do inverno. O comportamento de tomar sol, presente dentro da categoria de "comportamentos de manutenção", foi observado somente na estação do inverno, e pode ser interpretado como um comportamento de termo-regulação. Dessa forma, o aumento de comportamentos de manutenção no inverno provavelmente se deu para a termo-regulação.

Também houve um aumento de comportamentos auto-direcionados no período do inverno. O comportamento de auto-catação, presente dentro da categoria auto-direcionados, pode aumentar por uma maior incidência de parasitas durante o inverno. Raios infravermelhos, são conhecidos por ajudarem a "matar" os parasitas. Durante o inverno a incidência desses raios são muito inferiores que durante o verão, o que pode levar a um aumento de parasitas e portanto, na auto-catação nesses indivíduos.

5. CONCLUSÃO

Um recinto de boa qualidade (tamanho e complexidade) e uma estrutura social adequada são cruciais para o bem-estar animal, pois permitem que os indivíduos apresentem comportamentos que mais se assemelham aos exibidos na natureza, além de proporcionar uma maior interação entre os indivíduos. O bem-estar animal é crucial para animais em cativeiro, ainda mais para espécies como o mico-leão-preto que estão ameaçadas de extinção e necessitam de esforços *ex situ*, pois pode favorecer as chances de reprodução. Entretanto, muitas etapas devem ser alcançadas para se atingir o sucesso reprodutivo e projetar uma reintrodução desses animais na natureza, o que possibilita o desenvolvimento de diversos estudos que entremeiam essas duas linhas de pesquisas.

Dessa forma, a escolha de tamanho e composição de grupo devem seguir as necessidades de cada espécie em particular, para que o bem-estar seja priorizado e o sucesso reprodutivo maximizado. Como já foi apontado, micos-leões necessitam de características especificas no recinto para que esse objetivo seja alcançado. Com os dados comportamentais

e hormonais percebe-se que recintos grandes em família e casal diminuem a probabilidade do desenvolvimento de comportamentos anormais ou estereotipados e permitem comportamentos mais próximos aos observados em ambientes naturais além de reduzir os níveis de MFGs.

Nessa população de micos-leões-pretos parece existir indivíduos que estão em momentos distintos dessa adaptação ao ambiente potencialmente estressante: os que expressam comportamentos que indicam estresse, ou seja, indivíduos lidam com o ambiente de cativeiro de forma adaptativa; e indivíduos que expressam comportamentos para lidar com o estresse, ou seja, animais que ainda não estão adaptados ao cativeiro, e talvez nunca se adaptem a esse ambiente.

O comportamento dos mico-leões-pretos em cativeiro varia ao longo do dia e também ao longo das estações do ano, mas os níveis de MFGs não. Assim, esses indivíduos parecem estar mantendo a alostase, mas de acordo com os dados comportamentais e dados da literatura, eles estão tendo um grande desgaste fisiológico/comportamental para que isso aconteça. Além disso, de acordo com essas variações, alguns ajustes estruturais nos recintos devem ser feitos para proporcionar o bem-estar desses indivíduos, e diminuir o estresse de atividades antecipatórias e o estresse térmico.

Nesse trabalho avaliamos os comportamentos e MFGs através de uma variação entre tratamentos, período do dia e diferentes estações. Entretanto, não foram levadas em conta variações inter-individuais nas análises, sendo que essas podem ser importantes em estudos que avaliam comportamento e perfis hormonais. A variação individual tem, cada vez mais, ganhado atenção em estudos de comportamento. Portanto, essa variação deve ser estudada mais detalhadamente nos estudos de comportamento animal.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbott, D.H., Keverne, E.B., Bercovitch, F.B., Shively, C.A., Mendoza, S.P., Saltzman, W., Snowdon, C.T., Ziegler, T.E., Banjevic, M., Garland, T. Sapolsky, R.M. 2003. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. **Hormones and Behavior**, 43, 67–82

Altmann, J. 1974. Observation study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, 49, 227-267.

Angeloni, L.; Schlaepfer, M.A.; Lawler, J.J; Crooks, K.R. 2008. A reassessment of the interface between conservation and behaviour. **Animal Behaviour**, 75, 731-737.

Anestis, S. F. (2010). Hormones and social behavior in primates.**Evolutionary Anthropology**, 19, 66–78.

Gladbach, A; Gladbach, D.J.; Koch, M.; Kuchar, A.; Möstl, R.; Quillfeldt, P. 2011. Can faecal glucocorticoid metabolites be used to monitor body condition in wild Upland geese Chloephagapicta leucoptera? **Behavior Ecology Sociobiology**, 65, 1491–1498.

Bassett, L. e Buchanan-Smith, H.M. 2007. Effects of predictability on the welfare of captive animals. **Applied Animal Behaviour Science**, 102, 223–245

Bercovitch, F.B.; Ziegler, T.E. 1989.Reproductive strategies and Primate Conservative. **Zoo Biology,** 1, 163-169.

Bloomsmith, M.A., Lambeth, S.P., 1995. Effects of predictable versus unpredictable feeding schedules on chimpanzee behavior. **Applied Animal Behavior Science**, 44, 65–74.

Boere V. 2002. Efeitos do estresse psicossocial crônico e do enriquecimento ambiental em sagüis (Callithrix penicillata): um estudo comportamental, fisiológico e farmacológico. **Tese (Doutorado)** - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Boinski, S., Swing, S. P., Gross, T. S., & Davis, J. K. 1999. Environmental enrichment of brown capuchins (Cebus apella): Behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology**, 48, 49–68.

Brownie, A. C. 1992. The metabolism of adrenal cortical steroids. In: W. H. T. James (Ed.), **The adrenal gland** (pp. 209–224). New York: Raven Press.

Buchanan-Smith, H.M., Prescott, M.J. and Cross, N.J. 2004. What factors should determine cage sizes for primates in laboratory? **Animal Welfare**, 13, 197-201.

Burbano, P.A.A. Variabilidade genética e verificação de paternidade da colônia cativa do mico-leão-preto *(Leontopithecus chrysopygus)* (*Primates*, *Callithricidae*) utilizando marcadores microssatélites. **Dissertação de Mestrado.** São Carlos. Universidade Federal de São Carlos.

Carey, C. 2005. How Physiological Methods and Concepts Can Be Useful in Conservation Biology. **Integrative and Comparative Biology**, 45, 4–11.

Carlstead, K., Brown, J.L., Strawn, W., 1993b. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science,** 38, 143–158.

Choo, Y.; Todd, P.A.; Li, D. 2011.Visitor effects on zoo orangutans in two novel, naturalistic enclosures.**Animal Behaviour Science,** 133, 78– 86

Cook, S., Hosey, G.R., 1995. Interaction sequences between chimpanzés and human visitors at the zoo. **Zoo Biology**, 14, 431–440

Costa-e-Silva, E.V.; Rueda, P.M., Carneiro, R.C.P.B.; Macedo, G.G.; Zúccari, C. E. S.N. Estratégias para avaliar bem-estar animal em animais em Reprodução. II Congresso brasileiro de bioética e bem estar animal 04 a 06 de agosto de 2010 - UFMG – Belo Horizonte – MG

Crockett, C.M. 1998. Conservation biology of the genus *Alouatta*. **International Journal of Primatology**, 19, 549-578.

Croney, C.C and Newberry, R.C. 2007. Group size and cognitive processes. **Applied Animal Behaviour Science**, 103, 215–228

Cruz, E. L. 2009. Estrutura e uso do repertorio vocal de Leontopithecus chrysomelas (Primates: Callitrichinae) em cativeiro. **Dissertação de Mestrado em biologia animal**. Universidade Federal de Pernambuco.

Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, 22, 760–772

Decreto nº 60.519, de 05 de junho de 2014 - Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo

Dettmer, E., Fragaszy, D., 2000. Determining the value of social companionship to captive tufted capuchin monkeys (Cebusapella). **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 3, 293–304.

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

Estep, D.Q.; Dewsbury, D.A. Mammalian Reproductive behavior. In: KLEIMAN, D, *et al*. **Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques.** The University of Chicago Press, 1996. (379-389).

Ferreira, R. G., Mendl, M., Wagner, P. G. C., Araujo, T., Nunes, D., & Mafra, A. L. 2016. Coping strategies in captive capuchin monkeys (Sapajus spp.). **Applied Animal Behaviour Science**, 176, 120-127.

Ferreira, V. H.B. Enfrentando o estresse: um estudo comportamental e fisiológico em macacos-prego (*sapajus libidinosus*) cativos. **Dissertação de Mestrado** (Psicobiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Defendido em 24/03/2017.

Gómez-Espinosa, E.,Rangel-Negrín, A., Chavira, R., Canales-Espinosa, D., Dias, P.A.D. 2014. The Effect of Energetic and Psychosocial Stressors on Glucocorticoids in Mantled Howler Monkeys (Alouatta palliata). **American Journal of Primatology**, 76, 362–373.

Hediger, H. **Man and animal in the zoo: zoo biology**. London: Routledge and Kegan Paul, 1970. (303).

Heistermann, M.; Palme,R.; Ganswindt, A. 2006. Comparison of Different Enzymeimmunoassays for Assessment of Adrenocortical Activity in Primates Based on Fecal Analysis. **American Journal of Primatology**, 68, 257–273

Hosey, G.R., 2000. Zoo animals and their human audience: what is the visitor effect? **Animal Welfare**, 9, 343–357.

Hosey, G.R., 2008. A preliminary model of human–animal relationships in the zoo. Appl. **Animal Behaviour Science**, 109, 105–127.

Keay, J. M., Singh, J., Gaunt, M. C., &Kaur, T. 2006. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: A literature review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 37, 234–244.

Kierulff, M.C.M., Rylands, A.B., Mendes. S.L. & de Oliveira, M.M. 2008. *Leontopithecus chrysopygus*. The IUCN Red List of Threatened Species.Version 2014.1.<www.iucnredlist.org>. Downloaded on 08 July 2014.

Kierulff, M.C.M; raboy, B.E.; Oliveira, P.P.; Miller, K.; Passos, F.C. and Prado,F. Behavioral Ecology of Lion Tamarins. In: **Lion Tamarins Biology and Conservation** D.G. Kleiman and A.B. Rylands (eds.) pgs. 157-187. 2002a

Kleiman, D. G. 1991. Costs of a re-introduction and criteria for success: accounting and accountability in the Golden Lion Tamarin Conservation Program. **Symposia of the Zoological Society of London**, 62, 125-142.

Madliger, C.L.; Love, O.P. 2013.The Need for a Predictive, Context-DependentApproach to the Application of Stress Hormones in Conservation. **Conservation Biology**, 00, 1–5.

Maestripieri, D. Maternal anxiety in rhesus macaques (Macaca mulatta): Measurement of Anxiety and Identification of Anxiety-eliciting Situations. 1993.**Ethology**, 95, 19-31

Martins, C.S. 2003. Conservação do Mico-leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*): três tipos de manejo avaliados através da ecologia e comportamento. Tese (Doutorado) no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

Mason, G., 1991. Stereotypies and suffering. **Behavioural Processes**. 25, 103–115.

Mason, G., e Lathan, N.R. 2004. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? **Animal Welfare**, 13, 57-69.

Mason G,;Clubb, R.; Latham, N.;Vickery, S. 2007. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? **Applied Animal Behaviour Science**, 102, 163–188

Mason, G and Rushen, J. 2008. **Stereotypic animal behaviour fundamentals and applications to welfare.**2º Edition.

Massen, J.J.M., Sterck, E.H.M., de Vos, H. 2010. A review of close social associations in animal and humans: functions and mechanisms of friendship. **Behaviour**, 147, 1379-1412.

Mendonça-Furtado, O. (2012). Medidas de metabólitos de cortisol em macacos-prego (Gênero *Sapajus*): análise comparativa entre populações para investigação de fatores estressores. Dissertação de Doutorado, São Paulo, Universidade de São Paulo.

Millspaugha, J.J; Washburnb, B.E. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, 138, 189–199

Morgan, K.N.; Tromborg, C.T. 2007.Sources of stress in captivity.**Applied Animal Behaviour Science**, 102, 262–302

Möstl, E.; Palme, R. 2002.Hormones as indicators of stress.**Domestic Animal Endocrinology**, 23, 67-74.

Olsson, I. A. S., Westlund, K. 2007. More than numbers matter: The effect of social factors on behaviour and welfare of laboratory rodents and non-human primates. **Applied Animal Behaviour Science**, 103, 229–254.

Passos, F.C. 1999. Dieta de um grupo de mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan) (Mammalia, Callitrichidae), na estação Ecológica de Caeteus, São Paulo. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16, 269-278.

Price, E.E. and Stoinski, T.S. 2007. Group size: Determinants in the wild and implications for the captive housing of wild mammals in zôos. **Applied Animal Behaviour Science**, 103, 255–264

Quadros, S.; Goulart, V.D.L.; Passos, L.; Vecci, M.A.M.; Young, R.J. 2014. Zoo visitor effect on mammal behaviour: Does noise matter? **Applied Animal Behaviour Science**,156, 78–84

Raminelli, J.L. *et al.* 2001. Morning and afternoon patterns of fecal cortisol excretion among reproductive and non-reproductive male and female common marmosets, *Callitrix jacchus*. **Biological Rhythm Research**,32,159–167.

Rangel-Negrín, A.; Alfaro, J. L.; Valdez, R. A.; Romano, M. C.; Serio-Silva, J. C. 2009. Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. **Animal Conservation,**12, 496–502.

Rangel-Negrín, A.; Flores-Escobar, E.;Chavira, R.; Canales-Espinosa, D.; Dias, P.A.D. 2014. Physiological and analytical validations of fecal steroid hormone measures in black howler monkeys. **Primates**, 55, 459–465.

Ray, J.C. e Sapolsky, R.M. 1992. Styles of Male Social Behavior and Their Endocrine Correlates Among High-Ranking Wild Baboons. **American Journal of Primatology**, 2823, 1-250

Rimbach, R.; Heymann, E.W.; Link, A.; Heistermann, M. 2013. Validation of an enzyme immunoassay for assessing adrenocortical activity and evaluation of factors that affect levels of fecal glucocorticoid metabolites in two New World primates. **General and Comparative Endocrinology**, 191, 13–23

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

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

Rylands, A.B. 1993. The ecology of the lion tamarins, *Leontopithecus*: some intrageneric diferences and comparisons with other callitrichids. **Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology.**296-313.

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

Schmidt-Nielsen,K. **Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente**. 5.ª Edição. Editora Santos, 2002. (301-388).

Sherwen, S.L.; Harveya, T.J.; Magrathb, M.J.L.; Butlera, K.L.; Fansond, K.V.; Hemsworth, P.H. 2015. Effects of visual contact with zoo visitors on black-capped capuchin welfare. **Animal Behaviour Science**, 167, 65–73.

Sgai, M.G.F.G. 2007. Avaliação da influência das técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrinos e comportamentais de Callitrix penicillata (saguis de tufos pretos) mantidos em estabilidade social e isolados. Dissertação de Mestrado, São Paulo, Universidade de São Paulo.

Snowdon, T.C.1989.The criteria for successful captive propagation of endangered primates. **Zoo Biology**, 1, 149-161.

Stetz, J., Hunt, K., Kendall, K.C., Wasser, S.K.. 2013. Effects of Exposure, Diet, and thermoregulation on Fecal Glucocorticoid Measures in Wild Bears. **PLoS ONE,** 8, issue 2: e55967.

Thompson, S.D., Power, M.L., Rutledge, C.E., Kleiman, D.G.1994. Energy Metabolism and Thermoregulation in the Golden Lion Tamarin *(Leontopithecus rosalia)*. **Folia Primatologica**, 63, 131-143

Touma, C; Palme, R. 2005.Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. **Annals of the New York Academy of Sciences,** 1046, 54–74.

Vasconcellos, A.D.S., Virányi Z, Range F, Ades C, Scheidegger JK, Möstl E. 2016. Training Reduces Stress in Human-Socialised Wolves to the Same Degree as in Dogs. **PLoS ONE**, 11(9): e0162389.

Virgin, C.E. e Sapolsky, R.M. 1997**.** Styles of Male Social Behavior and Their Endocrine Correlates Among Low-Ranking Baboons. **American Journal of Primatology,** 42:25–3

Waitt, C., Buchanan-Smith, H.M., 2001. What time is feeding? How delays and anticipation of feeding schedules affect stump-tailed macaque behaviour. **Applied Animal Behavioral Science**, 75, 75–85.

Wasserman, F.E., Cruikshank,W.W., 1983. The relationship between time of feeding and aggression in a group of captive hamadryas baboons. **Primates**, 24, 432–435.

Wheeler, B.C.; Tiddi, B., Kalbitzer, U.; Visalberghi, E.; Heistermann, M. 2012. Methodological Considerations in the Analysis of Fecal Glucocorticoid Metabolites in Tufted Capuchins (Cebus apella).**International Journal of Primatology**, 34, 879–898.

Yerkes, R.M. **Almost human**. London: Jonathan Cope, 1925. (229).

Capítulo II

Estilos de enfrentamento ao estresse em uma população de micos-leões-pretos em cativeiro

1. INTRODUÇÃO

Diferenças individuais entre organismos da mesma espécie são extremamente comuns (GROOTHIUS e CARERE, 2005). Em humanos, essas diferenças têm sido exploradas exaustivamente por muitos pesquisadores ao longo dos anos, gerando o modelo hierárquico com cinco eixos de personalidade, o "Big-Five" (DIGMAN, 1990; GOSLING e JOHN 1999, GOSLING, 2001). Diferente dos estudos em humanos, variações inter-individuais em espécies animais foram, por muito tempo, negligenciadas, sendo tratadas como resíduos em modelos estatísticos ou consequências de medições imprecisas (GROOTHIUS e CARERE, 2005; SLIPOGOR *et al*, 2016). No entanto, nas últimas décadas, essas diferenças inter-individuais em espécies animais têm se tornado objeto de estudo em pesquisas em diferentes áreas do conhecimento como psicologia, fisiologia, genética, ecologia e evolução, tanto em ambientes naturais quanto em cativeiro (KOOLHAAS *et al*., 1999, 2010;SIH *et al*, 2004;DINGEMANSE e GOEDE, 2004; GROOTHIUS e CARERE, 2005; RÉALE *et al*, 2007, 2010; POMERANTZ *et al*, 2013;FERREIRA *et al*, 2016).

O estudo de diferenças individuais é importante já que indivíduos com diferentes perfis comportamentais podem responder de formas distintas a um mesmo estímulo, mostrando vários níveis de tolerância a estressores (agudos ou crônicos), e tendo seu bem-estar impactado de diferentes maneiras, quando em ambientes de cativeiro (GROOTHIUS e CARERE, 2005; FERREIRA *et al*, 2016). Ainda, devido a essas divergências nas formas de resposta, a saúde de cada indivíduo pode ser mais ou menos afetada, dependendo do tipo de estimulo (GROOTHIUS e CARERE, 2005; KOOLHAAS *et al*., 1999; FERREIRA *et al*, 2016). Essas diferenças refletem diretamente no manejo de animais silvestres mantidos em cativeiro, já que esses ambientes podem apresentar diversos fatores, tanto abióticos (ruídos muito altos, temperatura inadequada e substrato inadequado) quanto próprios do confinamento (restrição de movimento, proximidade com humanos, grupos sociais anormais, entre outros), que podem ser fonte de estresse (MORGAN e TROMBORG, 2007).

Essas diferenças individuais, que podem ser definidas como formas consistentes pelas quais os indivíduos da mesma espécie diferem no seu comportamento, ao longo do tempo e/ou em diferentes situações e/ou contextos, apresentam uma grande variação em sua terminologia dependendo do campo que ela é estudada (GOSLING, 2001; RÉALE *et al*, 2007, 2010; SIH *et al*, 2004; LOCURTO, 2007). Em estudos com animais em cativeiro, a terminologia "estilos de enfrentamento" ("coping styles") tem sido utilizada no contexto do conjunto de respostas a um estressor, e refere-se à capacidade ou estratégia, comportamental e

fisiológica, dos animais quando tem que lidar com uma situação ou ambiente estressor (KOOLHAAS *et al*., 1999, 2010; FERREIRA *et al*, 2016).

Numa sequência de trabalhos, Koolhaas e colaboradores (1999, 2010) argumentam que os estilos de enfrentamento podem ser avaliados através do eixo de pró-atividade e reatividade e apresentam correlatos comportamentais e fisiológicos. Indivíduos pró-ativos aumentam os níveis de atividade locomotora, têm ataques rápidos e tem baixas taxas de reatividade do eixo HHA durante um estresse agudo. Além disso, sem estressores físicos e ambientais apresentam uma tendência a formar rotinas uma vez que notam muito pouco as mudanças no ambiente e apresentam altos níveis de cortisol no plasma sanguíneo (KOOLHAAS *et al*.,1999, 2010; IJICHI *et al*, 2013; FERREIRA *et al*, 2016). Já indivíduos reativos adotam respostas passivas à estressores, e mostrando pouco ou nenhum controle sobre eles, mostram uma resposta de "congelamento" frente ao estresse, sendo caracterizada pela imobilidade e baixos níveis de agressão. Porém, fisiologicamente apresentam altas taxas de reatividade do eixo HHA. Além disso, em ambientes neutros, mostram maior atenção a mudanças no ambiente e apresentam baixos níveis de cortisol no plasma sanguíneo (KOOLHAAS *et al*.,1999, 2010; IJICHI *et al*, 2013; FERREIRA *et al*, 2016).

Segundo Ijichi e colaboradores, (2013) a personalidade do animal, inferida pelo seu padrão comportamental normal, também reflete a forma como ele irá reagir a um estressor (agudo ou crônico). Nesse âmbito, Ijichi e colaboradores (2013), propuseram que animais ativos compartilham muitas características comportamentais e fisiológicas com indivíduos que apresentam estereotipias. Sendo assim, indivíduos ativos tenderiam a reagir ao estresse agudo de forma pró-ativa e ao crônico apresentando esses padrões de comportamento estereotipados enquanto que indivíduos menos ativos, tenderiam a reagir de forma reativa e, em estresse crônico, apresentar comportamentos que sugerem depressão (IJICHI *et al*, 2013). Essa tendência de certos tipos comportamentais apresentarem estereotipias e outros tipos não já foi documentada em alguns trabalhos com macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (VANDELEEST *et al*, 2011; GOTTLIEB *et al*, 2013) e papagaios do mangue (*Amazona amazonica*) (CUSSEN e MENCH, 2016).

Dessa forma, as diferenças nos perfis comportamentais e nas formas de reagir ao estresse podem afetar a aptidão dos indivíduos ao lidar com o cativeiro. Portanto, as diferenças inter-individuais, tanto no comportamento quanto na fisiologia, devem ser consideradas na implementação de programas de conservação *ex situ* de espécies ameaçadas de extinção já que impactam diretamente o bem-estar e a sobrevivência dos indivíduos

(McDOUGALL *et al*, 2006; HAAGE *et al*, 2017). Além disso, a pressão seletiva do ambiente de cativeiro pode resultar em fenótipos comportamentais inadequados para a sobrevivência em ambientes naturais, em uma possível reintrodução (McDOUGALL *et al*, 2006). Um estudo com raposas-orelhudas (*Vulpes velox*) mostrou que indivíduos ousados apresentam maior sucesso reprodutivo em cativeiro, mas também maior risco de morte por predação após reintrodução (BREMNER-HARRISON *et al*, 2004). Dessa forma, diferentes tipos comportamentais mostram diferentes estratégias de lidar com o risco, situações novas e/ou mudanças (HAAGE *et al*, 2017).

Uma das espécies de primatas ameaçados de extinção, segundo a lista da União Internacional para a Conservação da Natureza/IUCN, é o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*). Para aumentar as chances de sobrevivência dessa espécie, foi realizado um plano de manejo de metapopulação, que incluiu translocações de indivíduos selvagens e reintroduções de indivíduos reproduzidos em cativeiro (MARTINS, 2003). Entretanto, para que seja dada continuidade nesse projeto, a reprodução em cativeiro é uma ferramenta essencial às reintroduções. Um dos desafios para a reprodução em cativeiro, e posterior reintrodução, é a saúde física e capacidade comportamental dos animais, já que o ambiente de cativeiro afeta tanto componentes comportamentais quanto fisiológicos (POOLE *et al*, 1999; BUCHANAN-SMITH *et al*, 2004). O estudo de estilos de enfrentamento em micos-leões-pretos cativos pode auxiliar uma maior compreensão de como os diferentes estressores vão afetar cada indivíduo.

Desse modo, os objetivos desse trabalho são: 1) Identificar os padrões de comportamento gênero-normativo (Genus Normative Behavioural Patterns- GNB – JACOBSEN *et al*., 2010) e os comportamentos potencialmente indicadores de estresse (Behavior potentially indicative of stress – BPIS – Mendonça-Furtado, 2006) através de uma classificação entre todas as categorias comportamentais; 2)definir os eixos que compõem o perfil de comportamento gênero-normativos; 3) definir os eixos que representam as diferentes formas de reação ao estresse em micos-leões-pretos cativos entre os BPIS; e 4) testar se existe uma relação entre as formas de reação ao estresse e os tipos comportamentais a fim de identificar os estilos de enfrentamento da população de micos estudada, do ponto de vista do comportamento e da fisiologia (níveis de metabólitos fecais de glicocorticóides - MFGs). De acordo com o proposto por Ichiji e colaboradores (2016), testamos as predições de que: 1) indivíduos mais ativos (avaliados a partir de seus eixos para GNBs), apresentem formas de reação ao estresse ativas (avaliados a partir de seus eixos para BPIS), 2) estes eixos irão

apresentar correlatos fisiológicos, com indivíduos mais ativos e os mais estereotipados apresentando altos níveis basais de hormônios glicocorticóides e baixa reatividade do eixo HHA, e indivíduos menos ativos apresentem formas de reação ao estresse passivas, como comportamentos auto-direcionados e tempo despendido dentro do abrigo e baixos níveis basais, mas alta taxa de reação de hormônios glicocorticóides.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1. Local e sujeitos do estudo

Esse estudo foi realizado no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) que é localizado dentro do núcleo Paraíso do Parque Estadual dos Três Picos, em Guapimirim, Rio de Janeiro. O CPRJ é um centro de pesquisa fechado para visitação, assim somente pessoas autorizadas têm acesso ao local.

Foram utilizados dez indivíduos para o estudo, oito machos e duas fêmeas. Os sujeitos da pesquisa foram mantidos em recinto de dois tamanhos distintos e agrupados de quatro formas diferentes (tabela 1). Todos os indivíduos nasceram em cativeiro.

Tabela 1 – Descrição dos mico-leões-pretos usados no estudo, a composição do grupo em que eles estavam inseridos, o sexo, idade e o tamanho do recinto em que cada um estava.

Tratamento	Indivíduos	Sexo	Idade	Tamanho do recinto
Família	M1	Macho	5 anos	3.0 x 6.0 x 2.5 m
	M2	Macho	19 anos	
	F1	Fêmea	13 anos	
Casal	M5	Macho	9 anos	3.0 x 6.0 x 2.5 m
	F3*	Fêmea	16 anos	
Dois machos	M3	Macho	15 anos	3.0 x 6.0 x 2.5 m
	M4	Macho	5 anos	
Gaiolas individuais	M6	Macho	9 anos	0.45 x 0.45 x 0.45m
	M7	Macho	8 anos	
	M8	Macho	9 anos	

*Óbito nos últimos cinco dias da coleta de dados (ver abaixo)

2.2. Coleta de dados

Dados de comportamento e fezes foram coletados durante 15 dias no período do verão (25 de janeiro a 19 de fevereiro de 2016) e 15 dias no período do inverno (30 de maio a 17 de junho de 2016), totalizando 30 dias de coleta por indivíduo. Além disso, antes do início de cada fase da coleta de dados (verão e inverno) os animais passaram pela habituação à presença da pesquisadora (3 semanas no verão [incluiu também testes com corantes e elaboração do etograma] e 1 semana no inverno). Após esse período, os dados comportamentais foram então coletados através de blocos de 10 minutos de amostragem focal para cada animal, com registros instantâneos do estado comportamental a cada 10 segundos

(ALTMANN, 1974), com cada indivíduo sendo observado duas vezes ao dia (manhã e tarde), o que totalizou 10 horas de observações por indivíduo. A ordem de observação dos indivíduos foi feita diariamente, de forma aleatória. Além disso, um intervalo de cinco minutos entre a observação de cada sujeito foi utilizado a fim de diminuir a dependência inter-individual no comportamento.

Foram também coletadas as fezes desses animais duas vezes por dia (11h e 16h). Antes das refeições foram oferecidas guloseimas com corantes para cada um dos indivíduos que se encontravam em recintos coletivos, de modo a possibilitar a identificação das fezes de cada indivíduo. Todas as fezes encontradas foram coletadas com o auxílio de um palito de café limpo, acondicionadas em *eppendorf*s identificadas em relação à data, horário e sujeito e congeladas. Para avaliar influências ambientais no comportamento e nos níveis de metabolitos fecais de glicocorticóides (MFGs), foram coletados dados de luminosidade, temperatura e umidade.

A fêmea 3 morreu na última semana da coleta de dados, assim o macho ficou em um recinto sozinho, para esse casal foram coletados somente os dados dos primeiros 25 dias de experimento.

2.3. Extração e dosagem

As fezes obtidas ao longo do estudo foram conservadas em um freezer à temperatura de -20ºC no CPRJ. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Endocrinologia Comportamental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. No laboratório, as amostras foram retiradas do freezer para descongelaram. Como não havia certeza do horário em que cada uma dessas fezes foi feita, todas as amostras de um mesmo indivíduo, em um mesmo dia, e no mesmo período do dia (manhã e tarde) foram agrupadas. Esse conjunto de fezes foi então homogeneizado com o auxílio de uma espátula de metal. Para extração dos MFGs, uma alíquota de 0,2 gramas dessa amostra homogeneizada e úmida foi acondicionada em um novo tubo devidamente identificado onde se adicionou 2ml de metanol 80% (PALME *et al*.,2013). Esse extrato foi então seco em banho-maria para o posterior transporte para o laboratório do Prof. Dr. Rupert Palme, na Universidade de Medicina Veterinária, em Viena, na Áustria. Lá, técnicos do laboratório re-suspenderam esses extratos e realizaram a dosagem de MFGs seguindo o protocolo de Palme e Möstl (1997).

2.4. Análise dos dados

A partir da amostragem instantânea, foram calculadas as frequências relativas médias de cada comportamento por indivíduo, ou seja, a quantidade total de cada comportamento apresentado pelo indivíduo, dividida pelo total de comportamentosamostrados paracada indivíduo.

Baseado em estudos que avaliaram o comportamento de primatas em cativeiro, os 64 comportamentos observados foram alocados em 16 categorias comportamentais (Anexo 2): inatividade, vigilância, alimentação, deslocamento, comportamento social positivo, comportamento agonístico, exploração de ambiente, investigação de outro indivíduo, marcação de território, comportamento de manutenção, comportamento auto-direcionado, tempo despendido dentro do abrigo, comportamentos anormais, coçar, vocalizar e comportamentos estereotipados. Tais categorias foram baseadas em outras trabalhos com a espécies e sobre bem-estar de primatas (KNOX e SADE, 1991; KITCHEN e MARTIN, 1996; BARKER *et al*, 1999; FRAGASZY *et al*, 2004; CRUZ, 2009; FERREIRA *et al*, 2016). As frequências de cada comportamento dentro de cada categoria comportamental foram somadas a fim de se obter um único valor para cada categoria.

Com relação aos dados hormonais foram calculados para cada indivíduo, os níveis basais, o pico, a reatividade média e a reatividade máxima de MFGs. Os níveis basais foram obtidos através do cálculo da mediana dos dados restantes após a retirada iterativa de outliers e outliers selvagens. Foi considerado como pico maior valor encontrado para cada individuo sem a retirada de outliers e outliers selvagens. A reatividade média foi calculada através da subtração da média dos outliers e outliers selvagens pelo valor basal. E a reatividade máxima foi calculada pela subtração do pico pelo valor basal.

Identificação de padrões de comportamento gênero-normativos e comportamentos potencialmente indicadores de estresse

Para a identificação dos eixos comportamentais em micos-leões-pretos foi realizada uma análise de cluster entre todas as 16 categorias comportamentais. Para a análise de agrupamento em cluster foi utilizado o método de ligação por centróide medindo a similaridade através de distancia euclidiana quadrática.

Identificação dos eixos do perfil comportamental e dos eixos de formas de reação ao estresse

Para determinar os eixos do perfil comportamental em micos-leões-pretos foi realizada uma análise de cluster somente entre os padrões de comportamento gênero-normativos. Para determinar as formas de reação ao estresse também foi realizada uma análise de cluster entre os comportamentos potencialmente indicadores de estresse. Para ambas as análises de agrupamento em cluster, o método utilizado foi o de ligação por centróide medindo a similaridade através de distancia euclidiana quadrática foi utilizado.

Relação tipo comportamental, formas de reação ao estresse e MFGs

Para cada indivíduo, as frequências das categorias agrupadas nas análises de cluster, tanto de GNBs quanto de BPIS, foram somadas e padronizadas em Z. Assim, cada indivíduo possui um valor nos eixos de GNB e BPIS encontrados. Após a padronização dos dados, foi realizada uma correlação linear de Pearson entre os tipos comportamentais, formas de reação ao estresse e MFGs (níveis basais, reatividade média, reatividade máxima e picos de MFGs).

Como os dados não seguiam uma distribuição normal e o número amostral era pequeno, foi utilizada a técnica de bootstrap nas correlações com o intuito de construir intervalos de confiança no conjunto de dados. Todas as análises foram realizadas no software IBM SPSS Statistics 20.

3. RESULTADOS

3.1. Identificação de padrões de comportamento gênero-normativos e comportamentos potencialmente indicadores de estresse

A análise de cluster confirmou nossa categorização a priori, e agrupou os comportamentos GNB em um único cluster. (grupo laranja na Figura 1). As categorias que foram separadas desse grupo maior podem indicar estresse em ambientes de cativeiro (MORGAN e TROMBORG, 2007), sendo classificadas como BPIS nas análises posteriores.

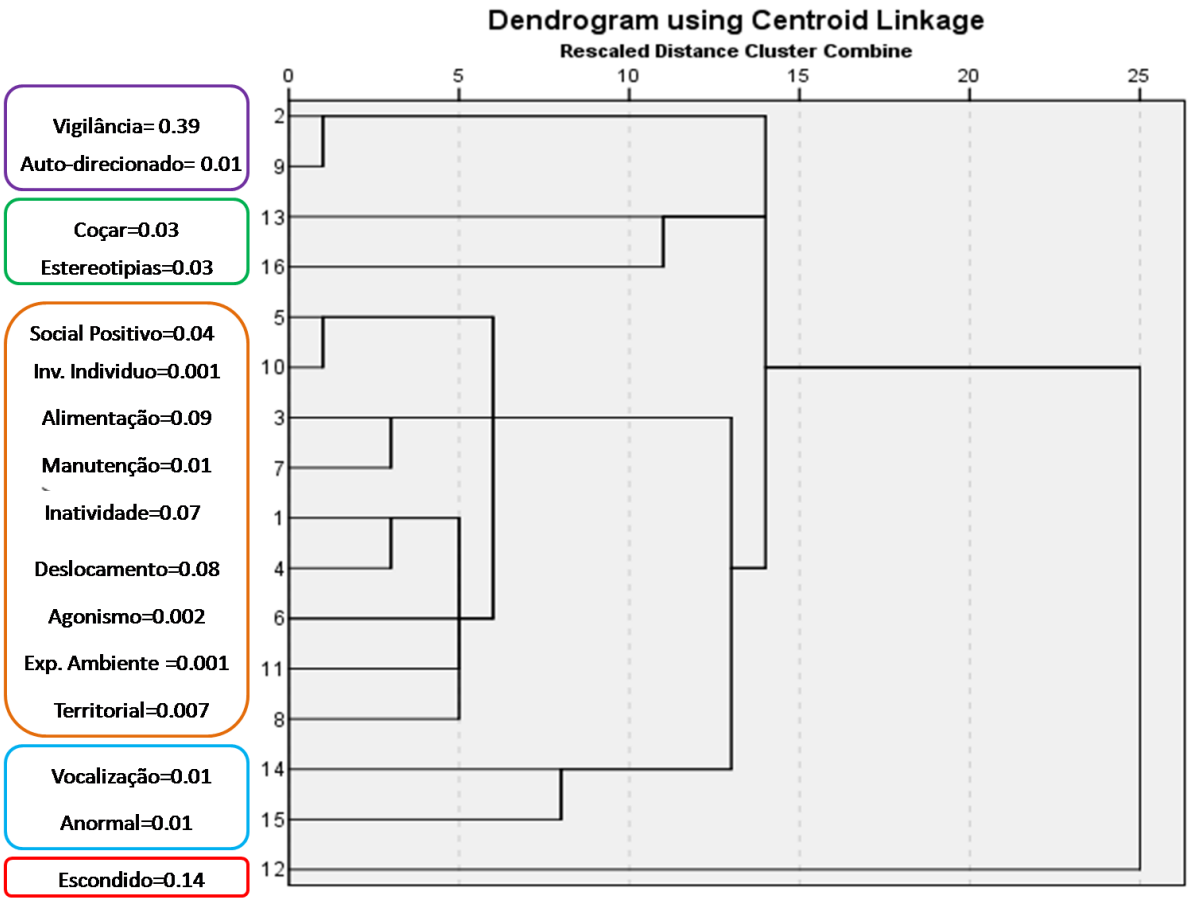

Figura 1 – Resultado da análise de cluster para GNBs e BPIS e suas respectivas frequências médias de cada categoria. Notam-se cinco principais grupos: 1)Auto-direcionado e vigilância, em roxo; 2) coçar e estereotipias, em verde; 3) Social positivo, investigação de individuo, alimentação, manutenção, deslocamento, inatividade, agonismo, explorar ambiente e territorial, em laranja; 4) Vocalização e comportamentos anormais, em azul e 5) tempo dentro do abrigo, em vermelho.

3.2. Identificação de eixos do perfil comportamental

A análise de clusters usando apenas comportamento GNB indicou quatro eixos que compõe o perfil comportamental de cada indivíduo (Figura 3): 1) "Sociabilidade" caracterizado por altos valores em comportamentos sociais positivos e comportamentos investigativos direcionados a outro individuo; 2) "Necessidade" caracterizado por altos valores em categorias comportamentais de alimentação e manutenção; 3) "Atividade" caracterizado por altos valores em categorias de inatividade e deslocamento; e 4) "Exploração" caracterizado por altos valores em categorias exploração de ambiente, comportamento agonístico e comportamento territorial.

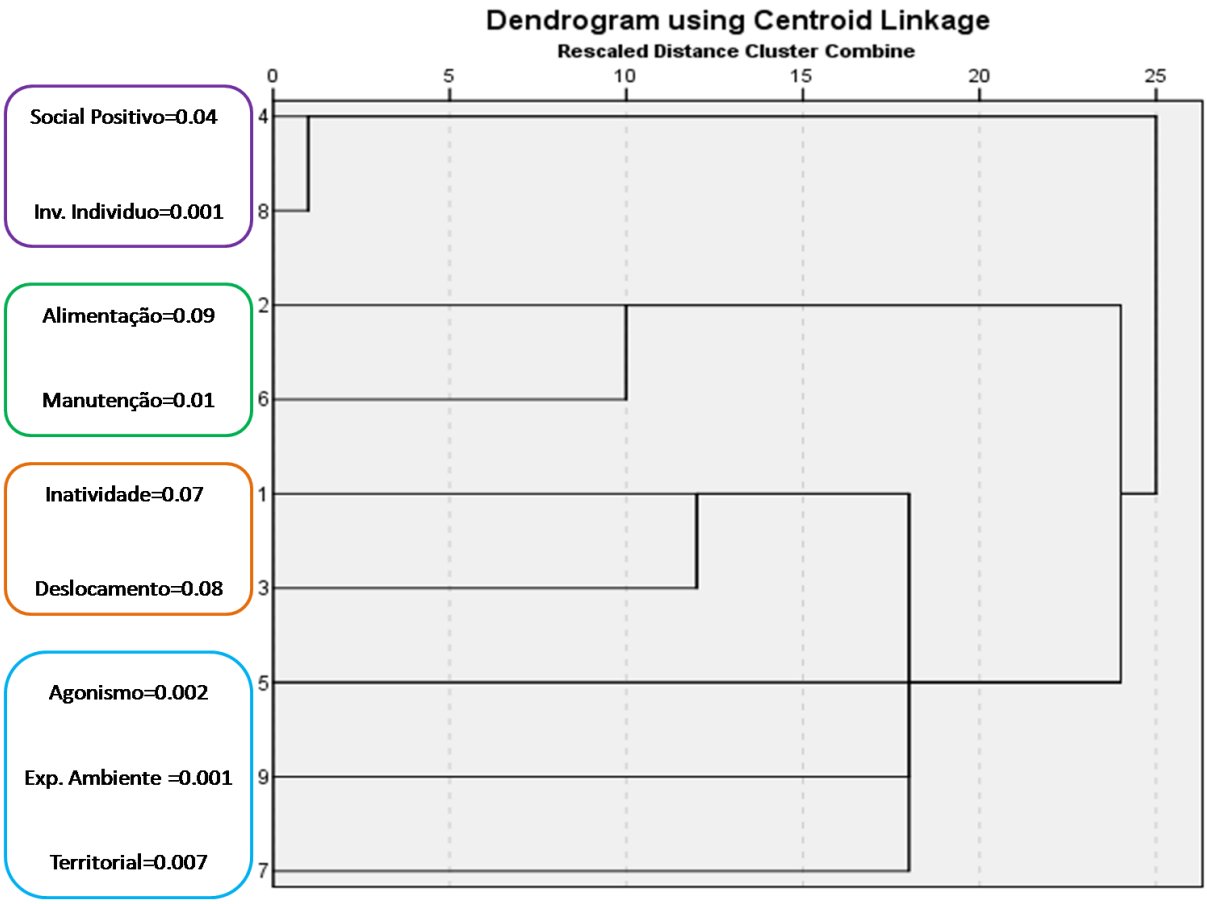

Figura 2 – Resultado da análise de cluster para GNBs e suas respectivas frequências médias de cada categoria. Notam-se quatro principais grupos: 1) "Sociabilidade" em roxo, 2) "Necessidade" em verde, 3) "Atividade" em laranja, e 4) "Exploração" em azul.

3.3. Identificação de formas de reação ao estresse

A análise de clusters para BPIS separou as categorias BPIS em quatro eixos deformas de reação ao estresse (Figura 3): 1) "Auto-proteção": caracterizado por altos valores nas categorias de vigilância e em comportamento auto-direcionados; 2) "Ansiedade": caracterizado por altos valores nas categorias de coçar e estereotipias; 3)"Distúrbio": caracterizado por altos valores nas categorias de comportamentos anormais (estimulação anal para produção e posterior ingestão de fezes) e vocalização; 4)"Introversão": caracterizado por altos valores nas categorias em tempo dentro do abrigo.

Dois comportamentos que foram encontrados em vários trabalhos para várias espécies de primatas (BOINSKY *et al*., 1999, b; POMERANTZ *et al*., 2012; UYLAN *et al*., 2006; BIRKETT e NEWTON-FISHER, 2011, FERREIRA *et al*, 2016) – auto-enganchar e automutilação – não foram observados em micos-leões-pretos.

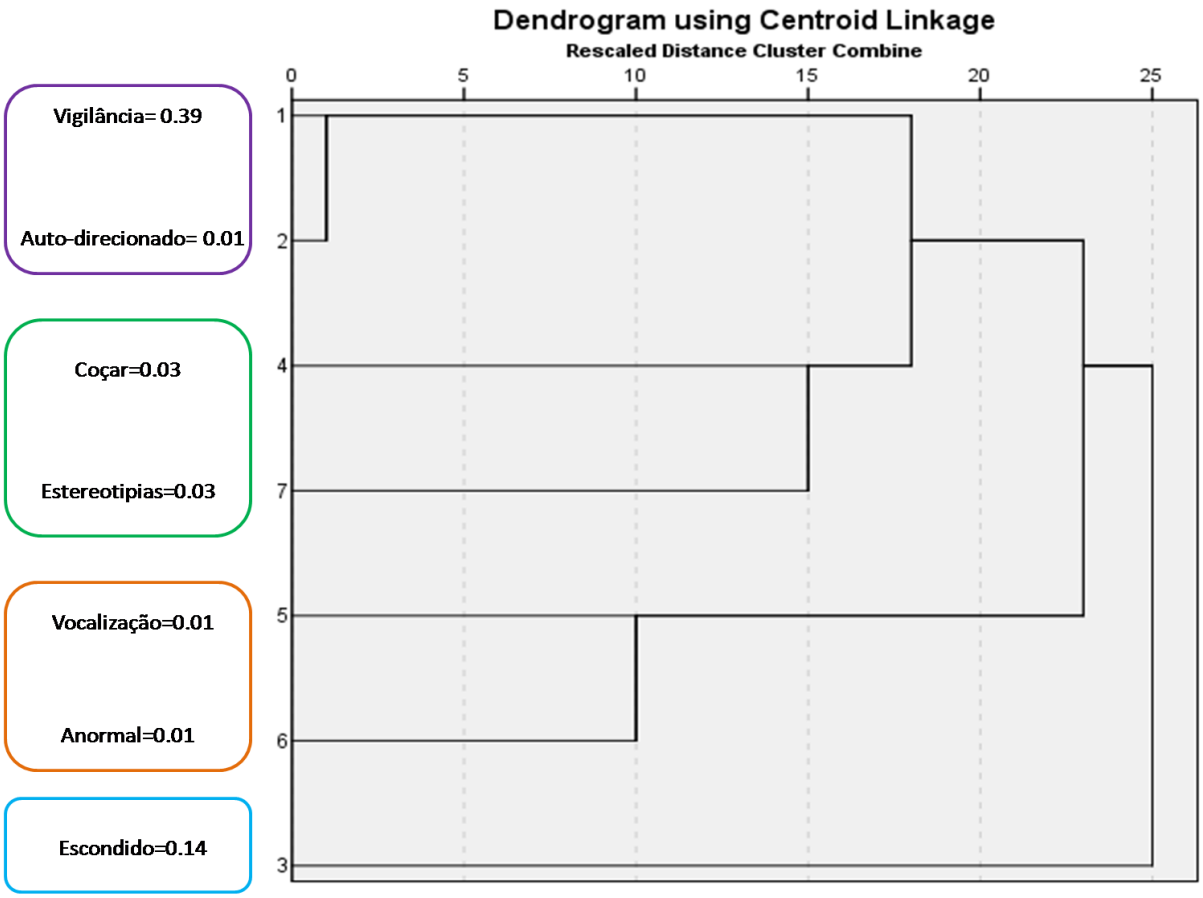

Figura 3 – Resultado da análise de cluster para BPIS e suas respectivas frequências médias de cada categoria. Notam-se quatro formas de enfrentamento ao estresse: 1) Vigiar e realizar comportamentos auto-direcionados em roxo, 2) coçar e realizar estereotipias em verde, 3) Vocalizar e realizar comportamentos anormais em azul, e 4) se esconder em azul.

3.4. Relação tipo comportamental, formas de reação ao estresse e MFGs

Como resultado da correlação entre os valores z dos indivíduos em cada um dos eixos dos tipos comportamentais e cada um dos eixos das formas de reação ao estresse (Tabela 3), foi encontrado que indivíduos com altos valores em "Introversão" apresentavam baixos valores em "Atividade", "Necessidade" e "Exploração", e que indivíduos com altos valores em "Ansiedade" apresentam baixos valores em "Atividade" e "Sociabilidade".

Tabela 2: Valores de R das correlações entre os eixos dos tipos comportamentais e os eixos das formas de reação ao estresse. Os valores com um asterisco (*) apresentam P<0.05, e os valores com 2 asteriscos (**) apresentam P<0.01

	Introversão	**Auto-proteção**	**Distúrbio**	**Ansiedade**
Atividade	**-,725***	-.167	.449	**-,679***
Necessidade	**-,681***	-.131	.402	-.419
Sociabilidade	-.426	-.137	-.253	**-,661***
Exploração	**-,766****	.009	.480	-.536

Já como resultado da correlação entre os eixos dos tipos comportamentais e eixos das formas de reação ao estresse com os índices hormonais (Tabela 4), foi encontrado que: indivíduos com altos valores em exploração apresentavam maiores valores basais de MFGs; indivíduos com altos índices em "Auto-proteção" apresentavam maiores picos e maior reatividade máxima do eixo HHA; e indivíduos com altos valores em "Distúrbio" apresentam maiores valores basais.

Tabela 3: Valores de R das correlações entre os eixos dos tipos comportamentais e eixos das formas de reação ao estresse com os índices hormonais. Os valores com um asterisco (*) apresentam P<0.05, e os valores com 2 asteriscos (**) apresentam P<0.01

		Basal	**Pico**	**Reatividade média**	**Reatividade máxima**
Eixos de Tipos comportamentais	Atividade	.621	.016	.380	-.041
	Necessidade	.261	-.017	.164	-.042
	Sociabilidade	.194	-.266	-.085	-.289
	Exploração	**,636***	.180	.515	.124
Eixos de Formas de Reação ao Estresse	Introversão	-.361	-.318	-.441	-.290
	Auto-proteção	-.230	**,677***	.277	**,710***
	Distúrbio	**,697***	.165	.583	.103
	Ansiedade	-.402	-.031	-.194	.005

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, trabalhamos com a hipótese de que iríamos encontrar diferentes eixos nos tipos comportamentais. Essa predição foi corroborada através da identificação de quatro eixos que compõem o perfil do padrão de comportamento gênero-normativo: 1) atividade: deslocamento e inatividade; 2) sociabilidade: comportamentos sociais positivos e comportamentos investigativos direcionados a outros indivíduos; 3) necessidade: alimentação e manutenção; e 4) exploração: comportamentos territoriais, marcação de território e agonismo. Reále (2007) propôs uma análise fundamentada em cinco eixos comportamentais: 1) timidez-ousadia (shyness-boldness): caracterizada pela reação de um indivíduo a uma situação de risco, mas não uma situação nova; 2) exploração-evitação (exploration-avoidance): caracterizada pela reação de um animal a uma nova situação; 3) atividade: caracterizada pelo nível geral de atividade de um indivíduo; 4) agressividade: caracterizada pela reação de um indivíduo contra seus co-específicos; e 5) sociabilidade: a reação de um animal a presença e ausência de co-específicos. Em micos leões pretos encontramos 3 eixos comuns com os descritos por Reále (2007) (atividade, sociabilidade e exploração-evitação), que também já foram encontrados em testes de tipos comportamentais em sagüis comuns sujeitos a ambientes de laboratório (atividade e exploração-evitação) (SLIPOGOR *et al*, 2016) e macacos-prego em cativeiro (atividade, sociabilidade, exploração) (FERREIRA e colaboradores, 2017).

Além disso, esperávamos encontrar diferentes formas de reação ao estresse para micos-leões-pretos em cativeiro. Essa predição também foi corroborada ao encontrarmos quatro formas de reação ao estresse entre os comportamentos potencialmente indicadores de estresse: 1) Introversão: indivíduos que passam muito tempo dentro do abrigo; 2) Ansiedade: realizar estereotipias e se coçar; 3) Distúrbio: vocalizar e desempenhar comportamentos anormais; e 4) Auto-proteção: vigiar e realizar comportamentos auto-direcionados. Todos esses comportamentos já foram apresentados em vários estudos como comportamentos que podem indicar estresse em ambientes de cativeiro (TROISI *et al*, 1991; CARLSTEAD *et al*, 1993; MAESTRIPI, 1993; CILIA e PIPIER, 1997; BARROS *et al*, 2000; PRESCOTT E BUCHANAN-SMITH, 2004; PRATES e BICCA-MARQUES 2005; BARROS *et al*, 2007, 2008;MORGAN e TROMBORG, 2007; NORSCIA E PALAGE, 2011; POMERANTZ *et al*. 2012; RIMPLEY e BUCHANNAN-SMITH 2013; FERREIRA *et al*, 2016).

De acordo com o esperado, foram encontrados diferentes estilos de enfrentamento para essa população de micos ao correlacionar os eixos dos tipos comportamentais e formas de

reação ao estresse e os índices hormonais. Entretanto, ao contrario do esperado, foram encontrados dois estilos pró-ativos e dois reativos, sendo que um estilo de enfrentamento pró-ativo não apresenta as características da predição.

Dois estilos de enfrentamento reativos foram encontrados, sendo que um deles apresenta somente componentes comportamentais (Introversão/Atividade-Necessidade-Exploração) e o outro apresenta relações entre comportamento e hormônio (Auto-proteção/Picos-reatividade máxima). O tipo de estilo de enfrentamento reativo que melhor se encaixou em nossas predições (Auto-proteção/Picos-reatividade máxima), integrou variáveis comportamentais e fisiológicas. Esse estilo de indivíduos que apresentam altas frequências de vigilância e comportamentos auto-direcionados, altos picos e reatividade máxima do eixo pode ser interpretado, de acordo com o proposto por Koolhas e colaboradores (1999) como o clássico estilo reativo. Esse padrão reativo foi observado também um estudo com macacos-prego sujeitos a ambientes de cativeiro, onde indivíduos que observam mais o ambiente também apresentam mais comportamentos auto-direcionados (FERREIRA, 2017).

Além disso, a relação entre o aumento de tempo dentro do abrigo e diminuição nos eixos de "Atividade", "Necessidade" e "Exploração" pode ser considerada como um estilo de enfrentamento reativo, já que este pode ser interpretado como uma resposta de "congelamento" frente ao estresse que é caracterizada pela imobilidade e baixos níveis de agressão (IJICHI *et al*, 2013), ou seja, indivíduos que passam longos tempos dentro do abrigo tendem a ficar parados (não se ouvia barulhos dentro da caixa na maior parte das vezes que estavam dentro do abrigo), sem realizar outras atividades, em ambientes que apresentam estímulos estressores. Dembiec e colaboradores (2004) encontraram resultados semelhantes em um estudo em que tigres cativos apresentavam diferenças nas formas de reagir a um evento estressante causado por um transporte, sendo que alguns reagem de maneira estacionaria, permanecendo por mais tempo em um mesmo lugar e outros responderam mais ativamente ao estresse, desempenhando pacing. Esse estilo de enfrentamento reativo não apresentou componentes hormonais, o que não é esperado de acordo com nossas predições e alguns trabalhos da literatura (KOOLHAS *et al*, 1999;2010; IJICHI *et al*, 2013)

Em outro estilo de enfrentamento encontrado, altos scores no eixo de "Distúrbio" se correlacionam positivamente com picos e reatividade máxima,somente então com correlatos fisiológicos, o que pode ser interpretado como um estilo de enfrentamento pró-ativo descrito por Koolhas e colaboradores (1999). Ferreira e colaboradores (2016) encontraram em macacos pregos sujeitos a ambientes de cativeiro, somente levando em consideração fatores

comportamentais, um estilo de enfrentamento (self-narcotizing/fear) que pode ser relacionado com “Disturbio”. Self-narcotizing, caracterizado por altas taxas de masturbação e vocalização, se aproxima muito dos resultados encontrados nesse trabalho, pois engloba um comportamento de manipulação (masturbação – estimulação anal/coprofagia) com vocalizações (FERREIRA *et al*, 2016).

Ao contrário do proposto por Ijichi e colaboradores (2013), e do encontrado em outros estudos sobre diferenças individuais nas formas de reação ao estresse (Cussen e Mench, 2015; Ferreira *et al*, 2016; Joshi e Pilay, 2016 Ferreira *et al*, 2017) indivíduos que apresentavam estereotipias, nesse trabalho descrito pelo eixo de “Ansiedade”, foram os que apresentaram baixos scores no eixo de “Atividade”. Esse resultado, embora apresente corroborações para o eixo de “Sociabilidade” também, pode ter sido influenciada pela presença de tipos de recinto distintos no trabalho. No capitulo 1 dessa dissertação, foi constatado que indivíduos em gaiolas individuais apresentam frequências baixas de inatividade e deslocamento (categorias presentes dentro do eixo de “Atividade”) e de comportamentos sociais (categorias presentes dentro do eixo “Sociabilidade”), entretanto altas frequências de estereotipias e do comportamento coçar (eixo “Ansiedade”). Dessa forma, essa diferença entre diferentes tipos de recinto pode ter influenciado negativamente os resultados aqui presentes. Esse eixo de “Ansiedade” também foi correlacionado negativamente com o de “Sociabilidade”. Dessa forma, o contato social tende a diminuir a expressão de comportamentos que indicam estresse em cativeiro. Uma serie de estudos com babuínos em vida livre demonstram que a sociabilidade reduz os níveis de glicocorticóides e consequentemente o estresse (RAY e SAPOLSKY, 1992; VIRGIN e SAPOLSKY 1997), o que corrobora com esses resultados. DeVries e colaboradores (2003), em uma revisão sobre a relação entre comportamento social e o eixo HHA, aponta que o maior contato social tende a diminuir indicadores comportamentais e fisiológicos de estresse.

Koolhas e colaboradores (1999), em uma revisão sobre estilos de enfrentamento, mostram que muitos estudos que apresentam dois estilos de enfrentamento definidos (estilo pró-ativo e estilo reativo), trabalham com linhagens genéticas selecionadas para os extremos; e que em alguns estudos que utilizaram linhagens genéticas não selecionadas, essa distinção clara de estilos de enfrentamento não foi encontrada. Dessa forma, o fato de não termos encontrado somente um tipo pró-ativo e um tipo reativo pode estar relacionado com as linhagens genéticas utilizadas nas pesquisas. Diferenças individuais podem ser maiores em situações de estresse, o que pode obscurecer as diferenças individuais em situações de

cativeiro (UHER, 2011). Assim, ainda podemos supor que se os níveis de estresse forem muito altos nessa população, todos os animais podem convergir para um mesmo padrão comportamental, o que afetaria as análises apresentadas.

Outro problema que pode ter obscurecido alguns resultados foi a influencia de diferentes tipos de recinto. Esse fator pode ter enviesado os padrões de resposta apresentados (como por exemplo a correlação negativa entre "Ansiedade" e "Atividade/Sociabilidade"), já que recintos menores podem impedir o aparecimento de alguns tipos de comportamento e facilitar o aparecimento de outros. Entretanto, ressalta-se que mesmo nesses indivíduos em gaiolas individuais, foi notada a presença de diferenças individuais, sendo que um dos indivíduos claramente passava muito tempo dentro da caixa, enquanto outro desempenhava uma gama de estereotipias, e outro ainda apresentava altas frequências de comportamentos auto-direcionados e se coçava bastante. Dessa forma, optamos por deixá-los nas analises.

Além disso, o fato de esse trabalho ter sido feito somente com 11 indivíduos, ou seja, um número amostral relativamente baixo para modelos estatísticos, pode ter favorecido as chances de ocorrer um erro do tipo dois, onde há significância, mas ela não é encontrada, mesmo empregando a técnica de bootstrap. Dessa forma, algumas correlações entre padrões comportamentais e fisiológicos remetidos aos estilos de enfrentamento podem não ter sido observadas nesse estudo devido a esse fator estatístico. Entretanto, é interessante lembrar que mesmo com o baixo numero amostral, alguns padrões foram encontrados, o que reforça que existam estilos de enfrentamento nessa espécie e que essas podem ser utilizadas para o manejo de animais cativos como forma de melhorar o bem-estar, a reprodução e ajudar na conservação da espécie.

5. CONCLUSÃO

Nós identificamos quatro eixos que compõe os padrões de comportamento gênero-normativos encontrados nesse estudo (atividade, sociabilidade, exploração e necessidade), das quais três já têm sido descritas na literatura para primatas neotropicais. Também encontramos quatro formas de enfrentamento ao estresse em micos-leões-pretos alojados em condições de cativeiro (Introversão, Auto-proteção, Ansiedade e Distúrbios). Foram encontrados dois estilos de enfrentamento ao estresse que se assemelham ao que é proposto para forma reativa, e dois estilos de enfrentamento que se assemelham ao que é proposto para a forma pró-ativa. Esses estilos apresentam correlatos fisiológicos e/ou comportamentais que diferenciam os

indivíduos na maneira de como lidam com ambientes estressantes, demonstrando importância desse estudo para futuras indicações sobre manejo dessa espécie.

Estudos adicionais a essa pesquisa, aumentando o número amostral, o período de pesquisa e em ambientes semelhantes, como os tipos de recinto seriam interessantes para o estudo de estilos de enfrentamento com micos-leões-pretos. Entretanto, mesmo com problemas metodológicos, foi possível que as predições propostas nesse estudo fossem parcialmente corroboradas, o que demonstra a importância desse estudo para o bem-estar e conservação da espécie em cativeiro.

6. BIBLIOGRAFIA

Altmann, J. 1974. Observation study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, 49, 227-267.

Baker, J.V., Abbott, D.H., Saltzman, W. 1999. Social determinants of reproductive failure in male common marmosets housed with their natal family. **Animal Behaviour**, 58, 501–513

Bairrão-Ruivo. 2010. EAZA Husbandry Guidelines for Callitrichidae – 2nd Edition. Beauval Zoo

Barros, M., Boere, V., Huston, J.P., Tomaz, C. 2000. Measuring fear and anxiety in the marmoset (*Callithrix penicillata*) with a novel predator confrontation model: effects of diazepam. **Behavioural Brain Research** 108, 205–211

Barros, M., Giorgetti, M., Souto, A.A.V., Vilela, G., Santos, K., Vilas Boas, N., Tomaz, C. 2007. Persistent anxiety-like behavior in marmosets following a recent predatory stress condition: Reversal by diazepam. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 86, 705–711.

Barros, M., Maior, R.S., Huston, J.P., Tomaz, C. 2008. Predatory Stress as an Experimental Strategy to Measure Fear and Anxiety-related Behaviors in Non-human Primates. **Reviews in the Neurosciences**, 19, 157-169.

Birkett, L., Newton-Fischer, N., 2011. How abnormal is the behaviour of captive,zoo-living chimpanzees? **Plos One** 6 (6), 1–7.

Boinsky, S., Swing, S., Gross, T., Davies, J., 1999a. Environmental enrichment of brown capuchins (Cebus apella): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology**. 48, 49–68.

Boinsky, S., Gross, T., Davis, J., 1999b. Terrestrial predator alarm vocalizations are valid monitor of stress in captive brown capuchins (Cebus apella). **Zoo Biology**, 18, 295–312.

Byrne, G., & Suomi, S. J. (2002). Cortisol reactivity and its relation to home cage behavior and personality ratings in tufted capuchin (Cebus apella) juveniles from birth to six years of age. **Psychoneuroendocrinology,**27 (1–2), 139–154.

Buchanan-Smith, H.M.; Prescott, M.J. and Cross, N.J. 2004 What factors should determine cage sizes for primates in the laboratory? **Animal Welfare**, 13, S197-201.

Capitanio, J. P. (2011). Individual differences in emotionality: social temperament and health. **American Journal of Primatology**, 73(6), 507-515.

Careau, V., Thomas, D., Humphries, M.M., Réale, D. 2008. Energy metabolism and animal personality. **Oikos**, 117, 641-653.

Cilia, J. and Piper, D.C. 1997. Marmoset conspecific confrontation: An ethologically-based model of anxiety. **Pharmacological Biochemestry Behavior,** 58(1) 85–91.

Cruz, E. L. 2009. Estrutura e uso do repertorio vocal de Leontopithecus chrysomelas (Primates: Callitrichinae) em cativeiro. **Dissertação de Mestrado em biologia animal**. Universidade Federal de Pernambuco.

Cussen, V.A. and Mench, J.A. 2015. The Relationship between Personality Dimensions and Resiliency to Environmental Stress in Orange-Winged Amazon Parrots (Amazonaamazonica), as Indicated by the Development of Abnormal Behaviors. **PLoS ONE**, 10, 6

Dall, S.R.X., Houston, A.I., McNamara, J.M. 2004. The behavioural ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective. **Ecology Letters**, *7*, 734–739

Dembiec, D. P., Snider, R. J., &Zanella, A. J. (2004). The effects of transport stress on tiger physiology and behavior**. Zoo Biology**, 23(4), 335–346.

DeVries, A. C., Glasper, E. R., &Detillion, C. E. (2003). Social modulation of stress responses. **Physiology & Behavior**, 79(3), 399–407.

Digman, J.M. 1990. Personality structure: emergence of the five-factor model. **Annual Review of Psychology**, 41, 417-40

Dingemanse NJ, de Goede P. 2004. The relation between dominance and exploratory behaviour is context-dependent in wild great tits. **Behavioral Ecology**,15, 1023–1030.

Dunbar, R.I.M. 1992. Time: a hidden constraint on the behavioural ecology of baboons. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 31, 35-49.

Ferreira, R.G., Mendl. M., Wagner, P.G.C., Araujo, T., Nunes, D., Mafra, A.L. 2016. Coping strategies in captive capuchin monkeys (Sapajus spp.). **Applied Animal Behavioral Science,** 176, 120-127.

Fragaszy, D., Visalberghi, E., Fedigan, L., 2004. **The Complete Capuchin: The Biologyof the Genus Cebus.** Cambridge University Press, Cambridge.

Gosling, S.D. and John, O.P. 1999. Personality Dimensions in Nonhuman Animals : A Cross-Species Review. **Current Directions in Psychological Science**, 8, 69 – 75.

Gosling, S.D. 2001. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? **Psychological Bulletin,** 127, 45–86.

Gottlieb, D.H.;capitanio, J.P.; McCowan, B. 2013. Risk Factors for Stereotypic Behavior and Self-Biting in Rhesus Macaques(Macaca mulatta): Animal's History, Current Environment, and Personality. **American Journal of Primatology**, 9999, 1–14.

Groothuis, T.G.G. and Carere, C. 2005. Avian personalities: characterization and epigenesis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 29, 137–150.

Haage, M.; Maran, T.; Bergvall, U.A.; Elmhagen, B.; Angerbjörn, A. 2017. The influence of spatiotemporal conditions and personality on survival in reintroductions–evolutionary implications. **Oecologia**, 183, 45–56

Ijichi, C. L., Collins, L.M., Elwood, R.W. 2013. Evidence for the role of personality in stereotypy predisposition. **Animal Behaviour**, 85, 1145-1151.

Jacobsen, K.R., Mikkelsen, L.F., Hau, J., 2010. The effect of environmental enrichment on the behavior of captive tufted capuchin monkeys (Cebusapella). **Lab Anim**, Research Note

Joshi, S. and Pillay, N. 2016. Association between personality and stereotypic behaviours in the African striped mouse Rhabdomys dilectus. **Applied Animal Behaviour Science**, 174 , 154–161

Knox, K.L. and Sade, D.S. 1991. Social Behavior of the Emperor Tamarin in Captivity: Components of Agonistic Display and the Agonistic Network. **International Journal of Primatology**, 12, 5.

Kitchen, A.N. and Martin, A.A. 1996. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive common marmosets, *Callithrix jacchusjacchus*. **Laboratory Animals**, 30, 317-326.

Koolhaas, J., Korte, S., de Boer, S., Van DerVegt, B., van Reenen, C., Hopster, H.,de Jong, I., Ruis, M., Blokhuis, H., 1999. Coping styles in animals: current statusin behavior and stress-physiology. **Neuroscience Behaviour Reviews**, 23, 925–935.

Koolhaas, J., de Boer, S., Coppens, C., Buwalda, C., 2010. Neuroendocrinology of coping styles: towards understanding the biology of individual variation. **Frontiers in Neuroendocrinology,** 31, 307–321.

Marai, I.F.M e Rashwan, A.A. 2004. Rabbits behavioural response to climatic and managerial conditions – a review. **Arch. Tierz. Dummerstorf**, 47, 469-482

Mason, G., 1991. Stereotypies and suffering.**Behavioural Processes**. 25, 103–115.

Massen JJM, Antonides A, Arnold AMK, Bionda T, Koski SE. 2013. A behavioral view on chimpanzee personality: exploration tendency, persistence, boldness, and tool-orientation measured with group experiments. **American Journal of Primatology,** 75, 947–958.

McDougall, P.T., Réale, D., Sol, D., Reader, S.M. 2006. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. **Animal Conservation**, 9, 39–48.

Mendonça-Furtado, O. 2006. Uso de ferramentas como enriquecimento ambientalpara macacos-prego (Cebus apella) cativos. 77 f. **Dissertação (Mestrado em Psicologia Experimental)** - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo,São Paulo.

Morgan, K.N.; Tromborg, C.T. 2007.Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, 102, 262–302

Novak, M.A., Bollen, K.S., in press. Differences in the prevalence and form of abnormal behaviour across primates. Box 3, Chapter 3. In: Mason, G., Rushen, J. (Eds.), **Stereotypic Behaviour in Captive Animals: Fundamentals and Applications for Welfare**, 2nd ed. CAB International, Wallingford.

Pomerantz, O.,Terkel, J., Suomi, S., Paukner, A., 2012. Stereotyped head twirls, but not pacing, are related to a pessimistic-like judgment bias among captive tufted capuchins (Cebus apella). **Animal Cogition**, 15, 689–698

Pomerantz, O.,Meiri, S., Terkel, J., 2013. Socio-ecological factors correlate with levels of sterotypic behavior in zoo-housed primate. **Behavioral Processes**, 98, 85–91.

Poole, T.B. (ed.) (1999) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 7th edn. Blackwell Science, Oxford.

Prates, M. H., & Bicca-Marques, J. C. (2005). Coprophagy in brown captive capuchin monkeys (Cebus apella). **Neotropical Primates**, *13*(3), 18–21.

Rimpley, K., & Buchanan-Smith, H. M. (2013). Reliably signalling a startling husbandry event improves welfare of zoo-housed capuchins (Sapajus apella). **Applied Animal Behaviour Science**, 147(1–2), 205–213.

Sih A, Bell AM, Johnson JC, Ziemba RE. 2004. Behavioral syndromes: an integrative overview. **The Quarterly Review of Biology**, 79, 241–277.

Slipogor, V., Gunhold-de Oliveira, T., Tadic, Z., Massen, J.J.M., Bugnyar, T. 2016. Consistent Inter-Individual Differences in Common Marmosets (Callithrix jacchus) in Boldness-Shyness, Stress-Activity, and Exploration-Avoidance. **American Journal of Primatology**, 78, 961–973.

Sorrentino, E., Schino, G., Tiddi, B., Aurelli, F., 2012. Scratching as a window into the emotional responses of wild tufted capuchin monkeys. **Ethology**, 118, 1072–1084.

Troisi, A. 2002. Displacement Activities as a Behavioral Measure of Stress in Nonhuman Primates and Human Subjects. **Stress**, 5 (1), 47–54

Uher, J. (2011) Individual behavioral phenotypes: an integrative meta-theoretical framework. Why "behavioral syndromes" are not analogs of "personality". **Developmental Psychobiology**, 53 (6). pp. 521-548.

Uylan, M., Burrows, A., Buzzell, C., Raghanti, M., Marcinkiewicz, J., Phillips, K., 2006.The effects of predictable and unpredictable feeding schedules on the behavior and physiology of captive brown capuchins (Cebus apella). **Applied Animal Behavioral Science**, 101, 154–160.

Vandeleesta, J.J.; McCowanb, B.; Capitanio, J.P. 2011. Early rearing interacts with temperament and housing to influence the risk for motor stereotypy in rhesus monkeys (Macaca mulatta). **Applied Animal Behaviour Science** 132, 81–89

Wilson, D.S., Clark, A.B., Coleman, K. &Dearstyne, T. 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. **Trends of Ecological Evolution**, 9, 442–446.

Anexo 1 – Caracterização do recinto

Os recintos maiores (tratamentos: família, dupla de machos e casal) tinham 3 x 6 x 2.5m (Fig. 1A e 1B), enquanto que as gaiolas individuais tinham 0.45 x 0.45 x 0.45m (Fig. 1D). Os recintos maiores apresentavam um substrato de terra com folhas secas (Fig. 1C) troncos e grades para a locomoção dos indivíduos, e um abrigo de madeira de mesmo tamanho entre os recintos. Além disso, todos os recintos grandes apresentavam um telhado de telha brasilit. Já as gaiolas individuais não apresentavam qualquer tipo de substrato, apresentavam um abrigo de tamanho padrão para o recinto e um galho para a locomoção.

Todos os recintos, incluindo as gaiolas individuais, pegavam sol durante o período da manhã no período do verão. Já no período do inverno a gaiola do tratamento casal pegava pouco sol. Além disso, houve uma grande variação de temperatura e luminosidade ao longo do dia e das estações. No verão a temperatura média no período da manhã foi de 28.4ºC, enquanto que a luminosidade foi de 26873 lux, enquanto que no período da tarde a temperatura média foi 32.6ºC e a luminosidade de 40631 lux. Já no período do inverno a temperatura média no período da manhã foi de 20.8ºC e a luminosidade de 15584 lux, enquanto que no período da tarde a temperatura média foi de 22.6ºC e a luminosidade de 16266 lux. Todas as temperaturas e luminosidades foram tiradas do lado de fora do recinto, sendo que dentro do recinto, em razão da cobertura de telha brasilit, essa temperatura podia mudar um pouco.

Figura 1 – Apresentação dos diferentes tipos de recinto. A) Visão geral e B) Visão Lateral do recinto maior. C) Visão do abrigo do recinto maior. D) Visão geral da gaiola individual.

Anexo 2 – Etograma para Micos-leões-pretos

Etograma utilizado com descrições detalhadas dos comportamentos observados na população de micos-leões-pretos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.

Categoria comportamental	COMPORTAMENTO	DEFINIÇÕES	Referência
Inativo	Repouso	O indivíduo está relativamente estático numa posição relaxada. Ele pode estar deitado ou sentado com as mãos e pés normalmente relaxados. Podem estar de olhos abertos ou fechados.	Lobão Cruz, 2009
Vigilância	Parado alerta	O animal move a cabeça, olhando atentamente o ambiente ao redor, sem apresentar nenhum outro tipo de comportamento. O indivíduo está alerta, não na posição de descanso, normalmente sentado em algum galho ou segurando nas grades.	Ferreira *et al*, 2016
	Parado alerta na caixa	O animal move a cabeça, olhando atentamente o ambiente ao redor, sem apresentar nenhum outro tipo de comportamento, entretanto ele está dentro da caixa. O indivíduo está dentro da caixa, com a cabeça para fora e alerta, não na posição de descanso	Esse estudo
	Olhando outros indivíduos	O animal olha ou encara algum indivíduo do grupo, mas sem realizar nenhum comportamento. O indivíduo está alerta, e não em posição de descanso.	Ferreira *et al*, 2016; Knox e Sade, 1991
	Olhando para a pesquisadora, ou alguém perto do recinto	O animal move a cabeça olhando ou encarando com curiosidade a pesquisadora ou alguma outra pessoa por perto do recinto	Esse estudo
	Olhando o ambiente	O indivíduo observa atentamente o chão do recinto, rotacionando a cabeça, mas sem exercer nenhum movimento de procura ativa.	Esse estudo

Alimentação	Forrageando	Os animais se movem através do recinto procurando ativamente por comida, sem estar manipulando ou comendo durante esse intervalo	Lobão Cruz, 2009; Fragaszy*et al*, 2004; Kitchen e Martin, 1996
	Caçando	Quando algum animal (inseto, lagartixa, morcego) entra no recinto e o indivíduo o caça para comer	Esse estudo
	Locomovendo e procurando alimento	Os animais se locomovem no chão do recinto em busca de alimento. Se diferencia do forrageamento, pois os animais não exercem uma busca ativa do alimento, somente andam e olham para o ambiente para conseguir comida (normalmente a que eles próprios derrubaram do trato).	Esse estudo
	Comendo	O animal está levando o alimento até a boca e ingerindo	Lobão Cruz, 2009; Fragaszy*et al*, 2004; Kitchen e Martin, 1996
	Bebendo água	Quando o indivíduo ingere água.	Fragaszy*et al*, 2004
	Manipulando o alimento	Manipulando o alimento com a aparente intenção de deixar o alimento mais fácil de ser ingerido	Fragaszy*et al*, 2004
	Olhando alimento	Quando o indivíduo olha o alimento que vai pegar antes de manipulá-lo e ingeri-lo.	Oliveira, 2016
	Cheirar o Alimento	Quando o indivíduo cheira o alimento seguido ou por ingestão ou por descarte do alimento	Esse estudo

Deslocamento	Andar	Locomoção lenta vertical ou horizontal sem manipulação ou forrageamento. O indivíduo não passa pelo mesmo caminho duas ou mais vezes, tendo sempre um ponto inicial e um final.	Kitchen e Martin, 1996; Ferreira *et al*, 2016
	Correr	Locomoção rápida vertical ou horizontal sem manipulação ou forrageamento. O indivíduo não passa pelo mesmo caminho duas ou mais vezes, tendo sempre um ponto inicial e um final.	Kitchen e Martin, 1996
	Saltar	Deslocar-se através de algum salto de um lugar para outro	Kitchen e Martin, 1996
	Escalar	Deslocar-se através de fios, cercas e telhados.	Kitchen e Martin, 1996

Comportamento Social positivo	Brincar	Interação entre um ou mais co-específicos sem agressão.	Lobão Cruz, 2009
	Comportamento sexual	Qualquer comportamento sexual apresentado	Lobão Cruz, 2009
	Catar (Grooming)	Comportamento social entre dois ou mais animais em que um indivíduo inspeciona o pelo de outro para remover sujeira ou ectoparasitas/ promover contato tátil, integração social do grupo	Lobão Cruz, 2009; Kitchen e Martin, 1996
	Ser catado	Manipulação atenta dos pelos por outro individuo	Kitchen e Martin, 1996
	Solicitar catação	Aproximar-se oferecendo o corpo para ser catado.	Stevenson and Poole, 1976
	Compartilhar comida	Transferência de alimento de um indivíduo para o outro de forma amistosa.	Lobão Cruz, 2009
	Abraçado	Quando os indivíduos estão parados abraçados ou muito próximos.	Esse estudo
	Contatar	Aproximar-se e entrar em contato corporal.	Kitchen e Martin, 1996

Comportamento Agonístico	Comportamento agonístico direcionado	Quando um animal direciona um comportamento agressivo à outro indivíduo (como mostrar os dentes, gritar, bater, morder e atacar)	Lobão Cruz, 2009; Kitchen e Martin, 1996
	Comportamento agonístico recebido	Quando um animal recebe um comportamento agressivo de outro indivíduo (como mostrar os dentes, gritar, bater, morder e atacar)	Lobão Cruz, 2009; Kitchen e Martin, 1996
	Andar arqueado	Quando o indivíduo anda lentamente com a coluna vertebral envergada e com os pelos eretos semelhante a um gato	Kitchen e Martin, 1996
	Susto	Quando um indivíduo ouve algum barulho ou vê algo fora do recinto e rapidamente ou fica em posição de alerta ou vai para dentro da caixa	Lobão Cruz, 2009
	Fugindo com comida	Quando um animal percebe que os outros indivíduos querem dividir a comida e ele foge para não dividir	Esse estudo
Marcação de território	Marcar	O indivíduo esfrega o tórax ou a genitália em algum substrato para liberar secreções glandulares ou urina	Lobão Cruz, 2009; Kitchen e Martin, 1996; Knox e Sade, 1991
	Rosto no tronco	Quando o indivíduo passa o rosto no tronco do recinto.	Esse estudo
	Esfregar a genitália	Esfregar a genitália repetidamente em algum lugar no recinto	Johnson, 1996

Comportamento de manutenção	Defecar	Ato de defecar	Oliveira, 2016
	Urinar	Ato de urinar	Oliveira, 2016
	Espreguiçando	Ato de espreguiçar	Esse estudo
	Bocejando	Ato de bocejar	Oliveira, 2016
	Espirrando	Ato de espirrar	Oliveira, 2016
	Tomando sol	Quando um indivíduo fica no sol para se aquecer (exclusivo para o inverno)	Esse estudo

Comportamento Auto-direcionado	Catar-se (auto-grooming)	Manipulação atenta dos pelos do próprio corpo.	Stevenson and Poole, 1976
	Investigar genitália	Quando um indivíduo manipula sua área genital	Barker *et al*, 1999
	Cheirar-se	Quando o indivíduo cheira ele mesmo	Barker *et al*, 1999
Comportamento investigativo direcionado a outro individuo	Investigação Ânus-genital de outro individuo	Movimentar o rosto contra ou através da área ano-genital do parceiro, usando as mãos, ou boca	Barker *et al*, 1999
	Cheirar	Colocar o rosto contra o parceiro excluindo a área ano-genital.	Barker *et al*, 1999

Exploração de ambiente	Explorando o recinto	Quando o indivíduo está mexendo em alguma parte do recinto sem função alimentar	Stevenson and Poole, 1976
	Cheirar o ambiente	Quando o indivíduo cheira alguma parte do recinto	Esse estudo
Tempo dentro do abrigo	Tempo despendido dentro do abrigo	Tempo despendido dentro da caixa	Kitchen e Martin, 1996
Fora de visão	Fora de visão	Quando o indivíduo está em um local fora da visão da pesquisadora, que não o abrigo	Oliveira, 2016

Estereotipias	Pacing	Andar ou correr repetidamente sobre a mesma rota ou circuito dentro do recinto sem objetivo aparente.	Kitchen e Martin, 1996
	Locomovendo estereotipicamente	Os indivíduos se locomovem como se estivessem procurando algo. Se diferencia do pacing pois não tem uma rota definida, eles somente andam pelo recinto	Esse estudo
	Circundando (circling)	Quando o indivíduo anda em círculos dentro do recinto	Prescott and Buchanan-Smith, 2004
	Entrar e sair da caixa ou sair e entrar na caixa	O indivíduo entra e sai repetidamente da caixa sem motivo aparente.	Esse estudo
	Andando para trás	O indivíduo se locomove com orientação caudal-crânial.	Esse estudo
	Cambalhotas	Quando o indivíduo faz cambalhotas para trás dentro do recinto de forma repetitiva ou não	Berkson*et al* 1996
	Giro de cabeça	Quando o indivíduo gira a cabeça para traz sem motivo aparente	Prescott and Buchanan-Smith, 2004
	Movendo o pote	Quando um indivíduo arrasta ou puxa o pote de água ou alimento dentro do recinto.	Esse estudo
	Mordendo ou lambendo recinto	Quando o indivíduo morde ou lambe troncos ou grades do recinto	Stevenson and Poole, 1976

Comportamentos anormais	Estimulação anal	Ocorre uma estimulação anal com os membros dianteiros com o intuito de estimular a defecação. Pode ser realizada pelo próprio indivíduo ou por outro indivíduo. Normalmente após esse comportamento o indivíduo que realizou a estimulação cheira as fezes defecadas, e ingerem (coprofagia) ou descartam as fezes	Esse estudo
	Cheirando fezes	Quando um indivíduo após o comportamento de estimulação anal, cheira as fezes.	Esse estudo
	Dança	Quando o macho solicita que a fêmea estimule o seu ânus se movendo ao redor dela	Esse estudo
	Ingestão de urina, fezes ou esperma	Lamber ou comer/beber urina, fezes ou esperma	Birket*et al*, 2011
	Comendo o próprio vomito	Quando um indivíduo ingere o próprio vomito.	Esse estudo
Vocalizar	Vocalizar	Animal parado emitindo algum som	Stevenson and Poole, 1976
Coçar	Coçar-se	Quando o indivíduo coça alguma parte do corpo com as mãos	Stevenson and Poole, 1976

Referências

Baker, J.V., Abbott, D.H., Saltzman, W. 1999. Social determinants of reproductive failure in male common marmosets housed with their natal family. **Animal Behaviour**, 58, 501–513

Ferreira, R.G., Mendl. M., Wagner, P.G.C., Araujo, T., Nunes, D., Mafra, A.L. 2016. Coping strategies in captive capuchin monkeys (Sapajus spp.). **Applied Animal Behavioral Science,** 176, 120-127.

Fragaszy, D., Visalberghi, E., Fedigan, L., 2004. **The Complete Capuchin: The Biology of the Genus Cebus.** Cambridge University Press, Cambridge.

Kitchen, A.M. and Martin, A.A. 1996. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive common marmosets, *Callithrix jacchusjacchus.* **Laboratory Animals**, 30, 317-326.

Knox, K.L. and Sade, D.S. 1991. Social Behavior of the Emperor Tamarin in Captivity: Components of Agonistic Display and the Agonistic Network . **International Journal of Primatology**, 12, 5.

Lobão-Cruz, E. L. Estrutura e uso do repertorio vocal de Leontopithecuschrysomelas (Primates: Callitrichinae) em cativeiro. **Dissertação (mestrado)** – Biologia animal – Universidade Federal de Pernambuco. PPGBA, CCB/UFPE, 2009.

Oliveira, M. F. Etograma de mico-leão-preto (Leontopithecuschrysopygus, Mikan, 1823) em cativeiro, com ênfase no comportamento reprodutivo. **Dissertação (Mestrado**) - Universidade Federal de São Carlos, 2016.

Stevenson, M.F. and Poole, T.B.. 1976. An ethogram of the common marmoset (calithrix jacchus jacchus): general behavioural repertoire. **Animal Behaviour**, 24, 428-451

Anexo 3 – Validação do protocolo experimental de extração e dosagem de metabólitos fecais de glicocorticóides para o mico-leão-preto

Introdução

Eventos estressantes provocam a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em vertebrados, que resulta na produção e liberação de hormônios glicocorticóides (GC- cortisol em primatas) pelo córtex da adrenal (SAPOLSKY *et al*, 2000). Após a circulação desses hormônios na corrente sanguínea, eles são metabolizados pelo fígado e rins (HEINSTERMANN *et al*, 2006; WHEELER *et al*, 2013) e então os metabólitos são eliminados pela urina e pelas fezes. Graças a essa metabolização promovida pelo fígado e rins, os metabólitos que são eliminados pela urina e pelas fezes, geralmente apresentam pouquíssima presença do hormônio em sua forma natural (HEINSTERMANN *et al*, 2006; BROWNIE, 1992). Além disso, devido à passagem desses GCs pelo sistema digestório, existe um atraso entre a liberação do hormônio na corrente sanguínea e o aparecimento dos metabólitos desse hormônio nas fezes. Assim, a produção, metabolização e excreção de GCs pode diferir em diversos aspectos entre espécies, e mesmo entre indivíduos da mesma espécie mas de sexos diferentes (TOUMA *et al*, 2003; HEINSTERMANN *et al*, 2006; WHEELER *et al*, 2013). Dessa forma, para que se possa utilizar dados obtidos através da dosagem de metabolitos fecais de glicocorticóides (MFGs) como biologicamente significativas e devidamente interpretadas, a validação desse protocolo experimental deve ser devidamente realizada (WHEELER *et al*, 2013).

Desafio de ACTH

Ensaios Imunoenzimáticos (EIA) são comumente utilizados para dosagem de MFGs,e se baseiam na ligação dos metabólitos hormonais à anticorpos policlonais. Dado que a afinidade dos MFGs de cada espécie ao anticorpo é desconhecida, a validação do protocolo experimental é de suma importância. A validação fisiológica do protocolo de dosagem dos MFGs consiste em uma injeção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sintético, que induz à liberação de GCs na corrente sanguínea (DESBOROUGH, 2000). O resultado esperado para que o método seja considerado validado, é um pico de MFGs após a injeção de ACTH. O tempo para o aparecimento deste pico nas fezes também é um dado importante a ser obtido deste experimento.

O objetivo desse trabalho foi validar o protocolo experimental de extração (PALME, 2005) e dosagem (PALME E MÖSTL, 1997) de metabólitos fecais de glicocorticóides para o mico-leão-preto.

Local e sujeitos do estudo

O experimento de validação foi realizado no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), localizado no município de Guapimirim, Rio de Janeiro.

Para o experimento de validação foram utilizados seis indivíduos (Tabela 1): quatro machos e duas fêmeas. Os indivíduos estavam separados em três diferentes recintos: um recinto com uma família (um casal e um filhote macho em idade adulta); um recinto com dois machos; e um recinto com uma família com filhotes juvenis dos quais somente a fêmea adulta foi utilizada. Antes do início do experimento, todos esses seis indivíduos foram habituados à presença da pesquisadora, tanto em frente ao recinto para a coleta de dados comportamentais, quanto dentro do recinto para a coleta de fezes.

Procedimentos

Tanto os dados comportamentais quanto as fezes foram coletadas durante os cinco dias de duração do experimento de validação (entre os dias 20 e 24 de junho de 2016): dois dias antes da injeção, o dia da injeção e dois dias subseqüentes à injeção. As fezes foram coletadas durante esses cinco dias para que se pudesse traçar um perfil de MFGs, com níveis mais basais nos dias anteriores e posteriores ao desafio, e com um pico após à injeção de ACTH.

No dia do desafio, com o auxílio dos tratadores do CPRJ e dos veterinários responsáveis (Prof. Dr. Alcides Pissinati e Dr. Silvia Bahadian Moreira), os animais foram capturados com um puçá e pesados. De acordo com essa informação, foi administrada então uma única dose de ~31 IU/kg de Synacthen (Acetato de Tetrocosactide) intramuscular em cada sujeito (HEINSTERMANN *et al*, 2006). Esse procedimento se iniciou as 11:00h e durou uma hora para todos os indivíduos, sendo que o tempo entre a captura e a injeção não passou de 10 minutos. Os animais vocalizaram muito durante o processo de captura e contenção e ficaram muito assustados o resto do dia após a injeção.

Tabela 1: Lista de indivíduos que participaram do experimento de validação, seus pesos, quantidade de ACTH administrado, e horário da injeção.

Individuo	Tratamento	Nº no studbook	Sexo	Peso	Quantidade de ACTH	Horário da injeção
M1	Família	#486	Macho	650g	0.18 ml	11:15
M2	Família	#312	Macho	700g	0.21 ml	11:00
F1	Família	#408	Fêmea	600g	0.18 ml	11:09
M3	Dupla de machos	#387	Macho	680g	0.18 ml	11:24
F6	Família com filhotes	#481	Fêmea	650g	0.18 ml	11:47

A coleta de fezes foi feita em rondas a cada uma hora e se deu das 7:00 às 17:00 h, período de atividade dos indivíduos. Todas as fezes encontradas foram acondicionadas em *eppendorf*s e identificadas em relação à data, horário, sujeito. Durante toda a semana da validação, eu estava presente desde o momento que os indivíduos saiam da caixa de manhã (6h) até eles entrarem na caixa novamente no período da tarde/noite (17h). Dessa forma, evitamos a perda de qualquer amostra no período da noite.

Extração e dosagem

Os processos de extração e dosagem seguem o protocolo já previamente descritos no capítulo 1 e 2 dessa dissertação.

Análise de dados

O método de extração e dosagem dos MFGs será considerado validado se, após a administração do ACTH, surgir um pico pronunciado nos níveis hormonais (RANGEL-NEGRÍN, 2014). Sendo assim, a análise qualitativa dos dados referentes à validação do método de extração e de dosagem dos glicocorticóides foi feita através dos cálculos das seguintes variáveis: 1) "basal" - a mediana dos valores de MFGs de todas as amostras coletadas 48h antes da injeção; 2) "pico" – valor mais alto de MFGs após a injeção para cada indivíduo. Serão considerados picos, os wild-outliers apontados pela função de gráfico de caixa a partir da estatística IBM SPSS 20; 3) "taxa de aumento"–divisão entre as variáveis "pico" e "basal"; 4) "Tempo até o pico" - intervalo de tempo entre a injeção e o "pico"; e 5) "tempo até a primeira amostra após a injeção" - intervalo de tempo entre a injeção e a próxima

amostra. Além disso, foi elaborado um gráfico demonstrando o perfil de MFGs para cada indivíduo durante o experimento.

Resultado

Foram coletadas no total 171 amostras, em média 34 amostras de cada individuo que foram enviadas para dosagem no Laboratório do Prof. Dr. Rupert Palme na Universidade de Medicina Veterinária em Viena na Áustria.

A taxa de aumento (valor calculados através da divisão do "pico" pelo "basal") foi em média 24 vezes (mediana 15x) os valores basais. O tempo médio da injeção até o pico foi de 22h. Os indivíduos demoraram em média 3 horas para defecar após a injeção (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores basais, picos (em nanogramas de metabolitos fecais de glicocorticóides por gramas de fezes frescas), taxa de aumento, tempo até o pico e tempo até a primeira amostra após a injeção de ACTH encontrados para o experimento de validação em micos-leões-pretos.

	Basal	Pico	Taxa de aumento	Tempo até o pico	Tempo para primeira amostra após a injeção
M1	53	2360	44	24h	1h
M2	90	2570	29	22h	4h
F1	390	8565	22	20h	4h
F1*	999	3616	4	20h	4h
M3	349	4532	13	30h	3h
M3*	1428	3947	3	19h	3h
F6	305	4620	15	23h	2h
Medianas**	349	3947	15	22h	3h

*dosagem feita com anticorpo EIA 11-oxoaetiocholanolone descrito por Möstl e colaboradores (2002)
**As medianas foram calculadas somente para o EIA cortisol descrito por Palme e Möstl, 1997. Dessa forma, os dois valores com (*) não foram incluídos nos cálculos.

Primeiramente foram testados dois anticorpos (11-oxoaetiocholanolone descrito por Möstl e colaboradores [2002] e cortisol descrito em Palme e Möstl [1997]) em dois indivíduos (F1 e M3). A escolha do anticorpo foi baseada no perfil hormonal desses indivíduos (Fig. 1 e 2) e validou-se o EIA de cortisol descrito em Palme e Möstl (1997). Foi então realizada a dosagem para os demais indivíduos com o EIA de cortisol.

O pico de MFGs pós injeção de ACTH se da por volta de 20h (mediana 22h). Além disso, pode-se notar nos dados hormonais, que a captura somada à injeção de ACTH em micos leões pretos parece ter um efeito prolongado nos indivíduos, já que picos são observados ao longo de todo o dia seguinte à aplicação da injeção (Fig. 1, 2, 3, e 4).

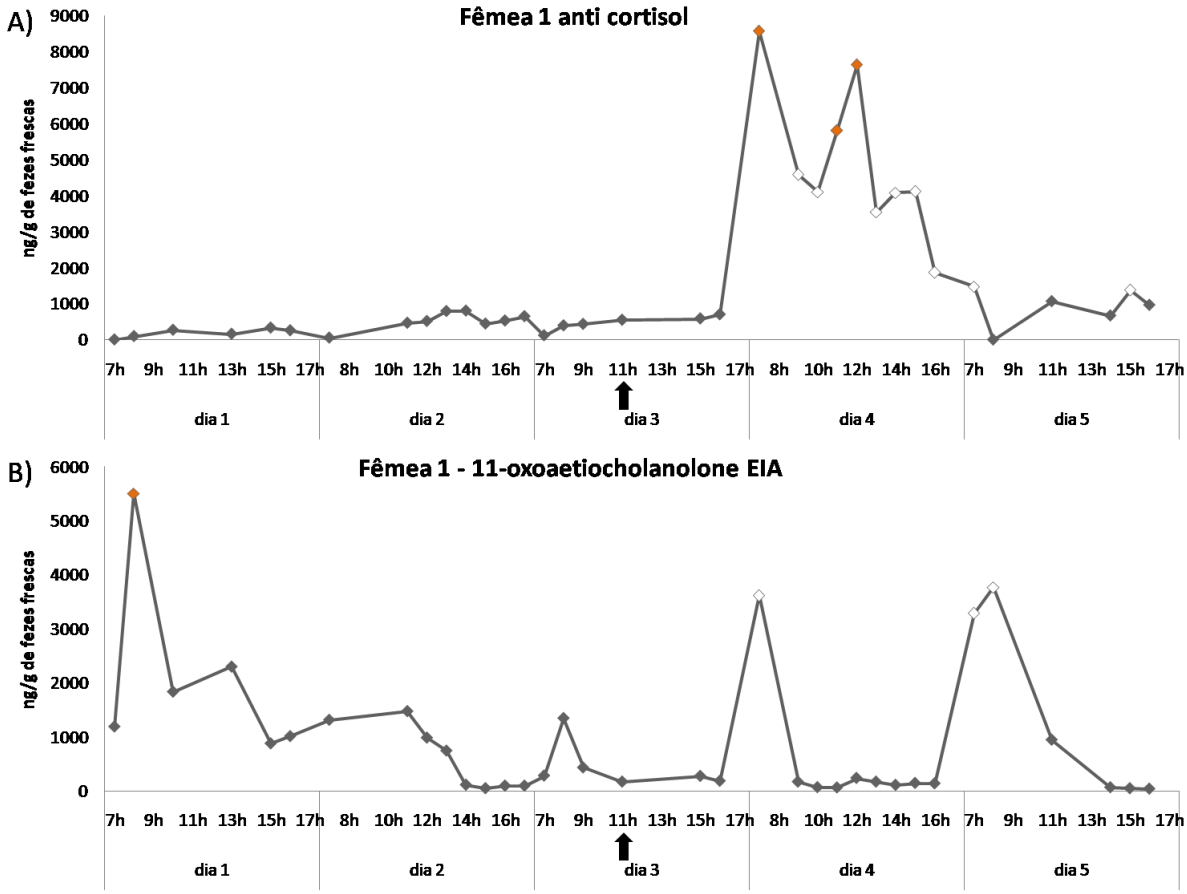

Figura 1 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes à A) Fêmea 1 dosado com EIA anti-cortisol descrito por Palme e Möstl (1997) e B) Fêmea 1 dosado com EIA 11-oxoaetiocholanolone descrito por Möstl e colaboradores (2002). A seta em preto representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por pontos laranjas e os outliers estão representados por pontos brancos

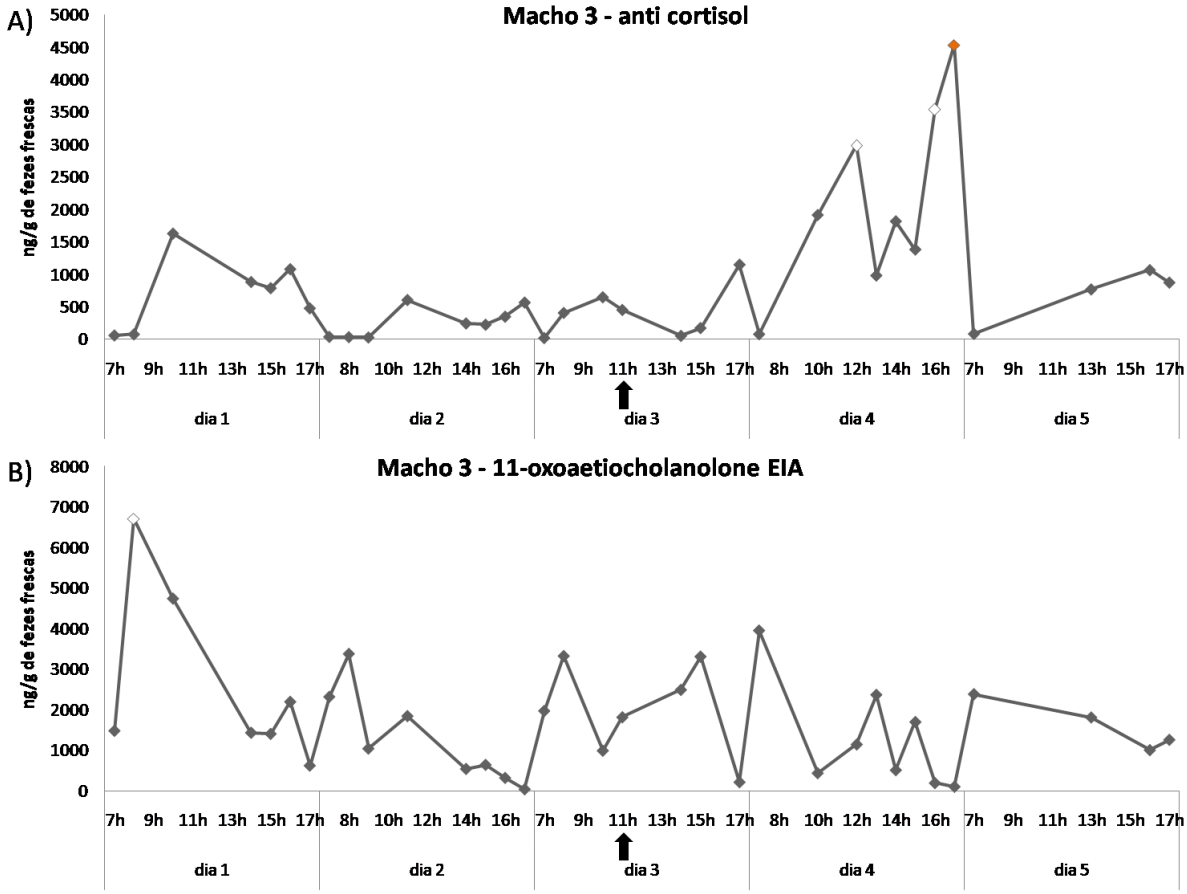

Figura 2 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes ao A) Macho 3 dosado com EIA anti-cortisol descrito por Palme andMöstl, 1997 e B) Macho 3 dosado com EIA 11-oxoaetiocholanolone descrito por Möstl e colaboradores (2002). A seta em preto representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por pontos laranjas e os outliers estão representados por pontos brancos

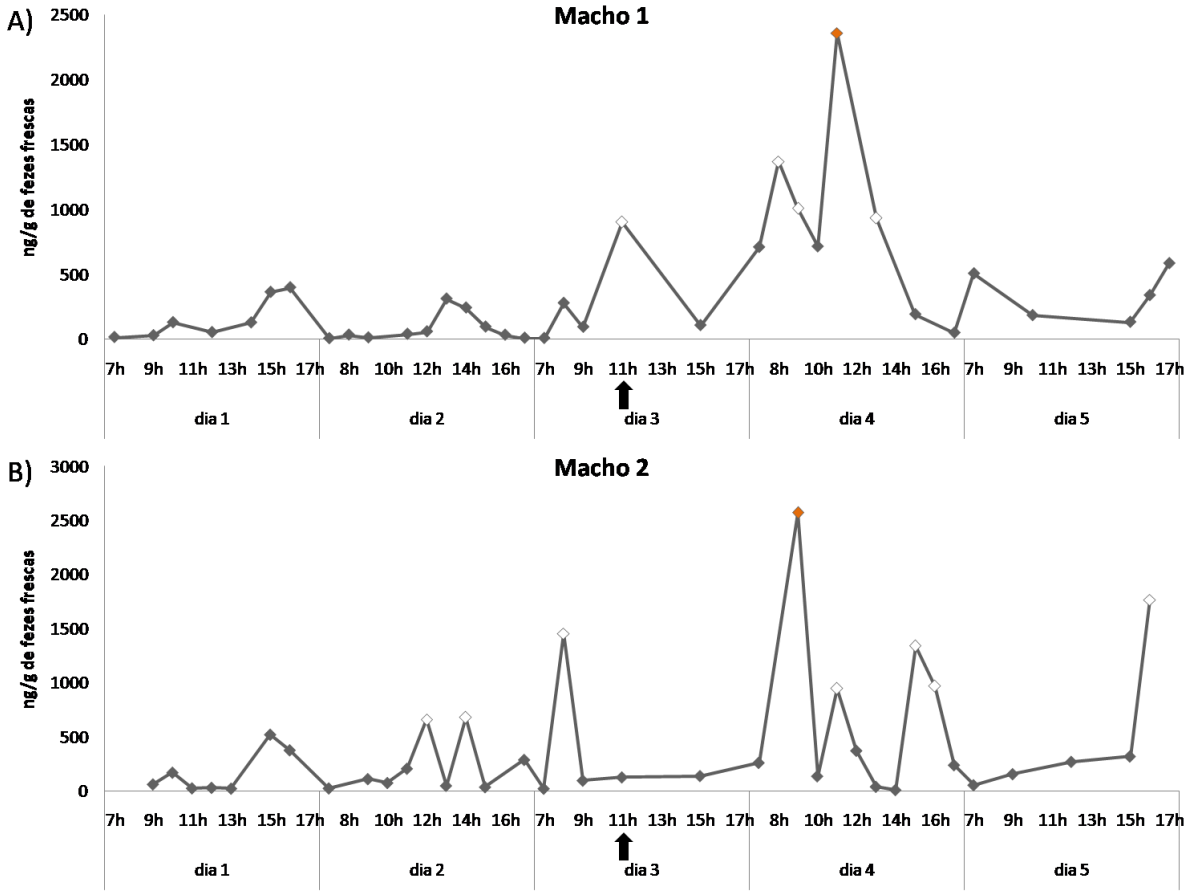

Figura 3 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóidesdurante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes ao A) Macho 1 e B) Macho 2. A seta em preto representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por pontos laranjas e os outliers estão representados por pontos brancos

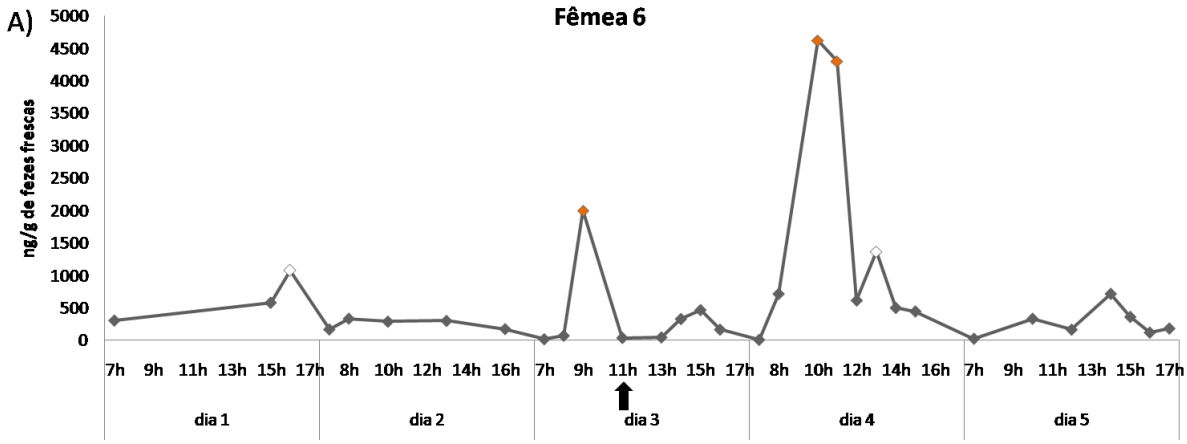

Figura 4 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi realizada a validação do protocolo experimental de dosagem referentes à Fêmea 6. A seta em preto representa o dia e horário da injeção de ACTH aplicada nesses indivíduos. Os wild outliers estão representados por pontos laranjas e os outliers estão representados por pontos brancos

Dessa forma, consideramos que o EIA de cortisol (Palme e Möstle, 1997) para dosagem de metabolitos fecais de glicocorticóides é válido para a espécie *L. chrysopygus*.

Bibliografia

Brownie, A. C. 1992. The metabolism of adrenal cortical steroids. In: W. H. T. James (Ed.), **The adrenal gland** (pp. 209–224). New York: Raven Press.

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

Heistermann, M.; Palme,R.; Ganswindt, A. 2006. Comparison of Different Enzymeimmunoassays for Assessment of Adrenocortical Activity in Primates Based on Fecal Analysis. **American Journal of Primatology**, 68, 257–273.

Palme, R. (2005). Measuring Fecal SteroidsGuidelines for Practical Application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1046, 75–80. 89

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

Rangel-Negrín, A.; Flores-Escobar, E.;Chavira, R.; Canales-Espinosa, D.; Dias, P.A.D. 2014. Physiological and analytical validations of fecal steroid hormone measures in black howler monkeys. **Primates**, 55, 459–465.

Sapolsky, R. M., Romero, M.L., e Munck, A.U. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. **Endocrine Reviews**, 21(1), 55–89

Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., e Palme, R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **General and Comparative Endocrinology**, 130, 267–278

Wheeler, B.C.; Tiddi, B., Kalbitzer, U.; Visalberghi, E.; Heistermann, M. 2012.Methodological Considerations in the Analysis of Fecal Glucocorticoid Metabolites in Tufted Capuchins (Cebusapella).**International Journal of Primatology**, 34, 879–898.

Anexo 4 - Variação dos níveis de cortisol ao longo do dia em micos-leões-pretos

Introdução

O uso de medidas não invasivas para avaliar o estresse, como hormônios glicocorticóides, tem sido largamente usado nos últimos anos (TOUMA *et al*, 2003). Hormônios glicocorticóides (GCs - mais especificamente cortisol, em primatas) (ROMERO, 2002), em níveis basais, promovem o equilíbrio energético, pois influenciam processos como forrageamento e mobilização de glicose e lipídios, o que permite que os indivíduos atendam suas necessidades energéticas diárias (MADLIGER e LOVE, 2012). Esses hormônios também são liberados no organismo em resposta a um estressor (agudo ou crônico), fazendo com que o organismo mobilize reservas de energia, promova comportamentos de escape e suprima atividades imunológicas e reprodutivas (SAPOLSKY, 1990). Desse modo, os níveis de GCs podem variar muito de acordo com a necessidade dos organismos, o que torna os seus níveis difíceis de serem interpretados (MADLIGER e LOVE, 2012). Esses níveis podem variar de acordo com múltiplos fatores (ROMERO, 2004; MADLIGER e LOVE, 2012), entre eles o sexo e a hora do dia (TOUMA *et al*, 2003; TOUMA e PALME, 2005). Assim, para consolidar o uso de materiais fecais para o estudo de hormônios GCs é necessário estabelecer quais fatores podem interferir com a excreção hormonal (RAMINELLI *et al*, 2001). Dessa forma, o objetivo desse trabalho é analisar a variação de GCs (através de coletas de fezes) ao longo do dia.

Procedimentos

A coleta de dados comportamentais e de fezes para determinar a variação dos níveis de glicocorticóides ao longo do dia (circadiana) em micos-leões-pretos foi realizada no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e teve a duração de cinco dias (29 de fevereiro a 4 de março de 2016).

Foram utilizados 11 indivíduos (8 machos e 3 fêmeas) habituados à presença da pesquisadora em frente ao recinto, e também dentro do recinto para a coleta de fezes. Esses indivíduos foram mantidos em diferentes tratamentos que diferiam em relação à composição de grupo, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 – Tratamento, sexo e número do studbook dos 11 indivíduos utilizados no experimento.

Indivíduo	Tratamento	Sexo	Número do studbook
M1	Família	Macho	486
M2	Família	Macho	312
F1	Família	Fêmea	408
F2	Família	Fêmea	487
M3	Dois machos	Macho	387
M4	Dois machos	Macho	488
M5	Casal	Macho	427
F3	Casal	Fêmea	366
M6	Gaiola individual	Macho	431
M7	Gaiola individual	Macho	437
M8	Gaiola individual	Macho	428

A coleta de fezes foi feita em rondas a cada uma hora durante o período de atividade dos micos (das 7:00 às 17:00 h). Todas as fezes encontradas foram acondicionadas em *eppendorf*s e identificadas em relação à data, horário, sujeito.

Análise de dados

Para determinar como os níveis de MFGs variam ao longo do dia foi realizado foi elaborado um gráfico demonstrando o perfil de MFGs para cada indivíduo durante o período de coleta de fezes para esse experimento. Foi realizada a retirada iterativa de outliers selvagens e outliers pela função de gráfico de caixa a partir da estatística IBM SPSS 20 para que fossem apontados outliers e outliers selvagens nos gráficos de cada individuo.

Resultados

Foram extraídas e dosadas no total 328 amostras de fezes para esse experimento, sendo que cada individuo apresenta uma média de 29 amostras.

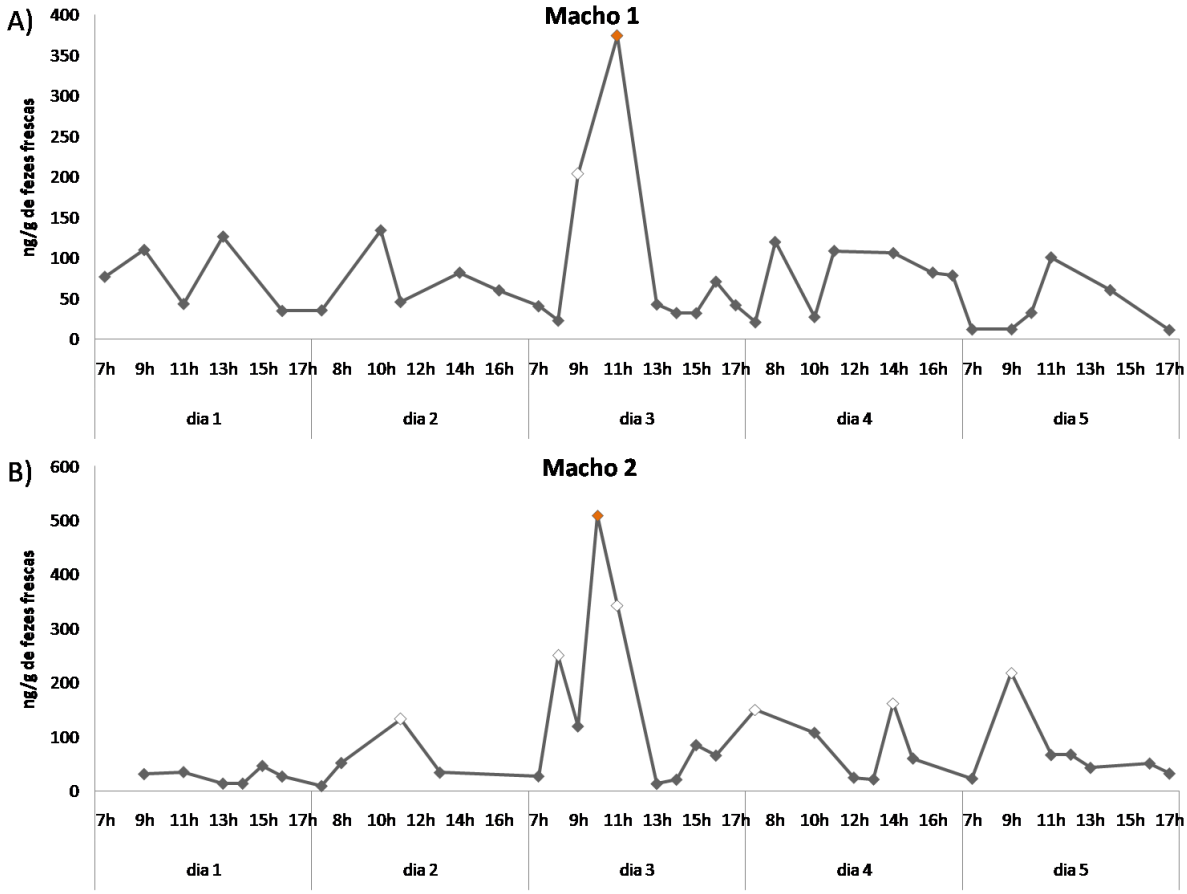

Figura 1 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 1 e B) Macho 2. Os wild outliers estão representados por pontos laranja e os outliers estão representados por pontos branco

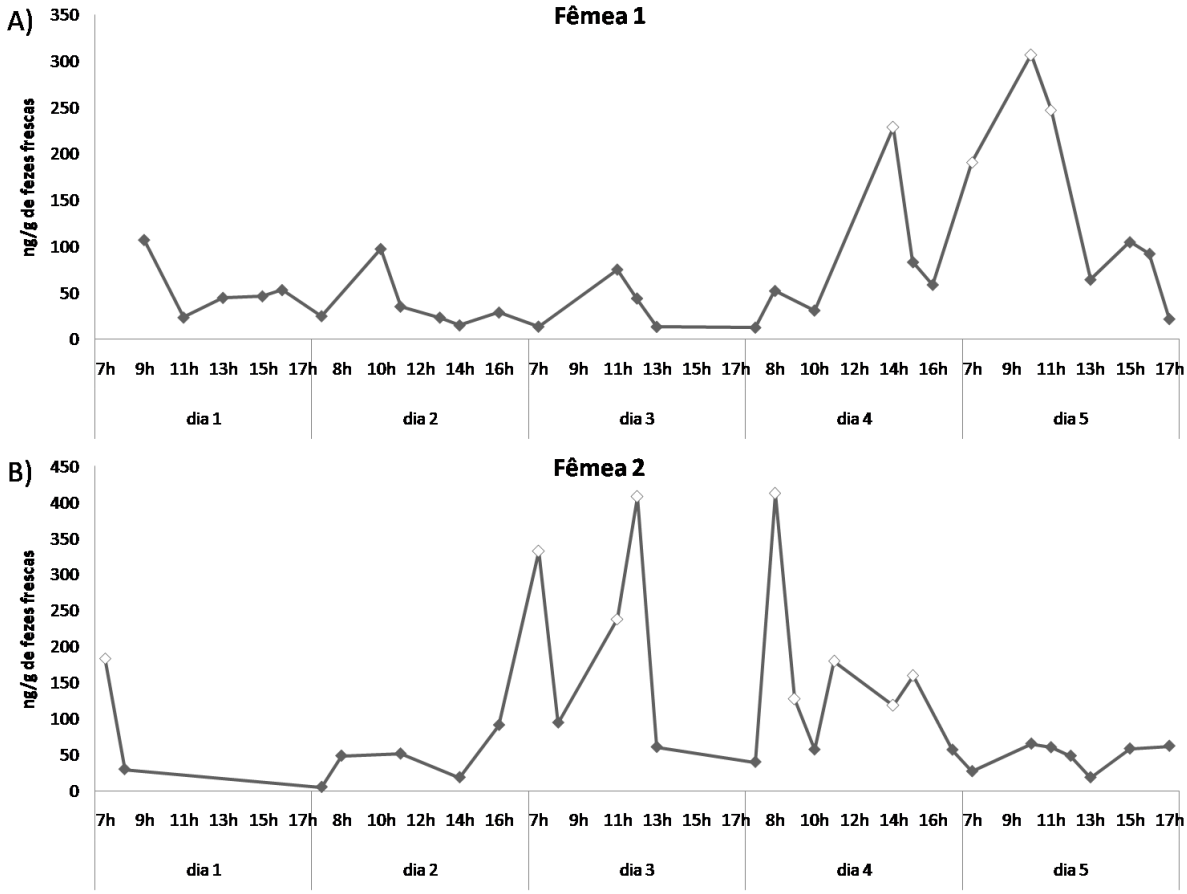

Figura 2 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Fêmea 1 e B) Fêmea 2. Os wild outliers estão representados por pontos laranja e os outliers estão representados por pontos branco

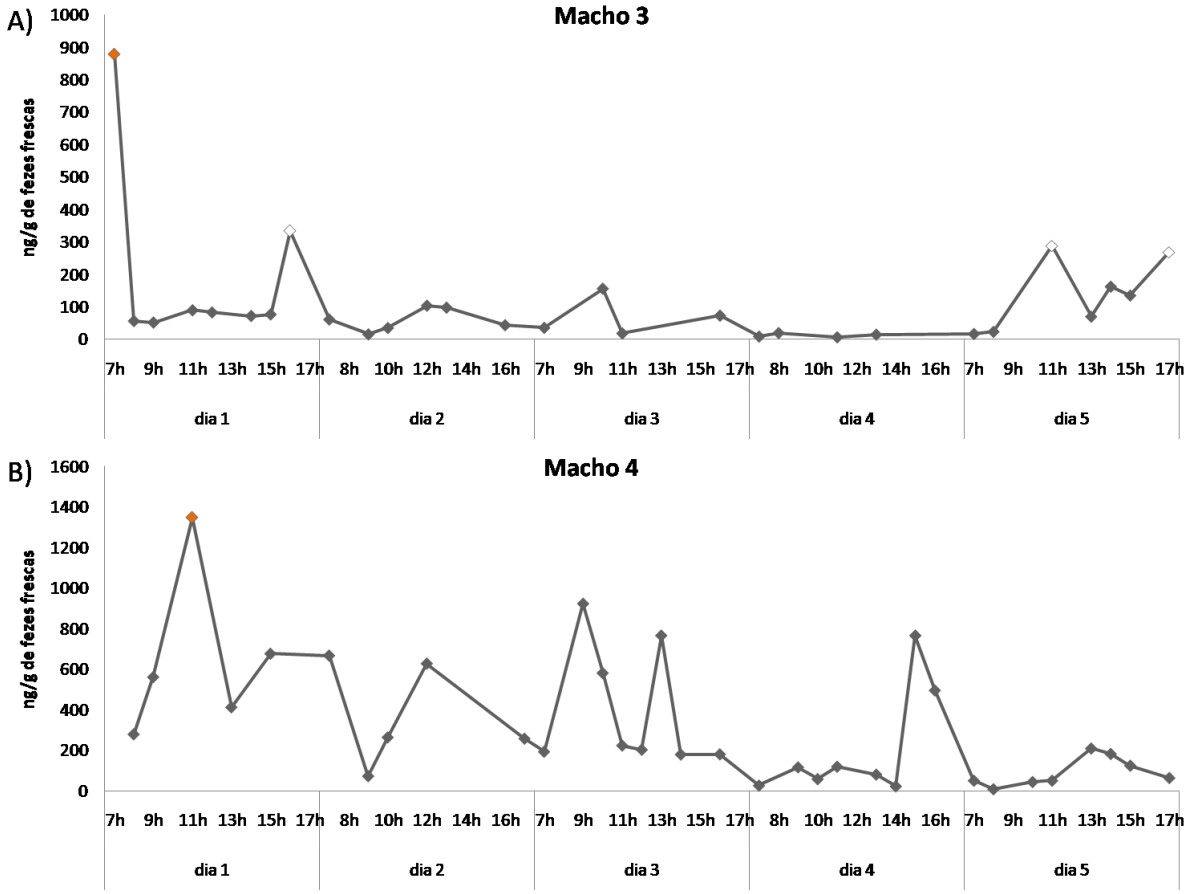

Figura 3 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 3 e B) Macho 4. Os wild outliers estão representados por pontos laranja e os outliers estão representados por pontos branco

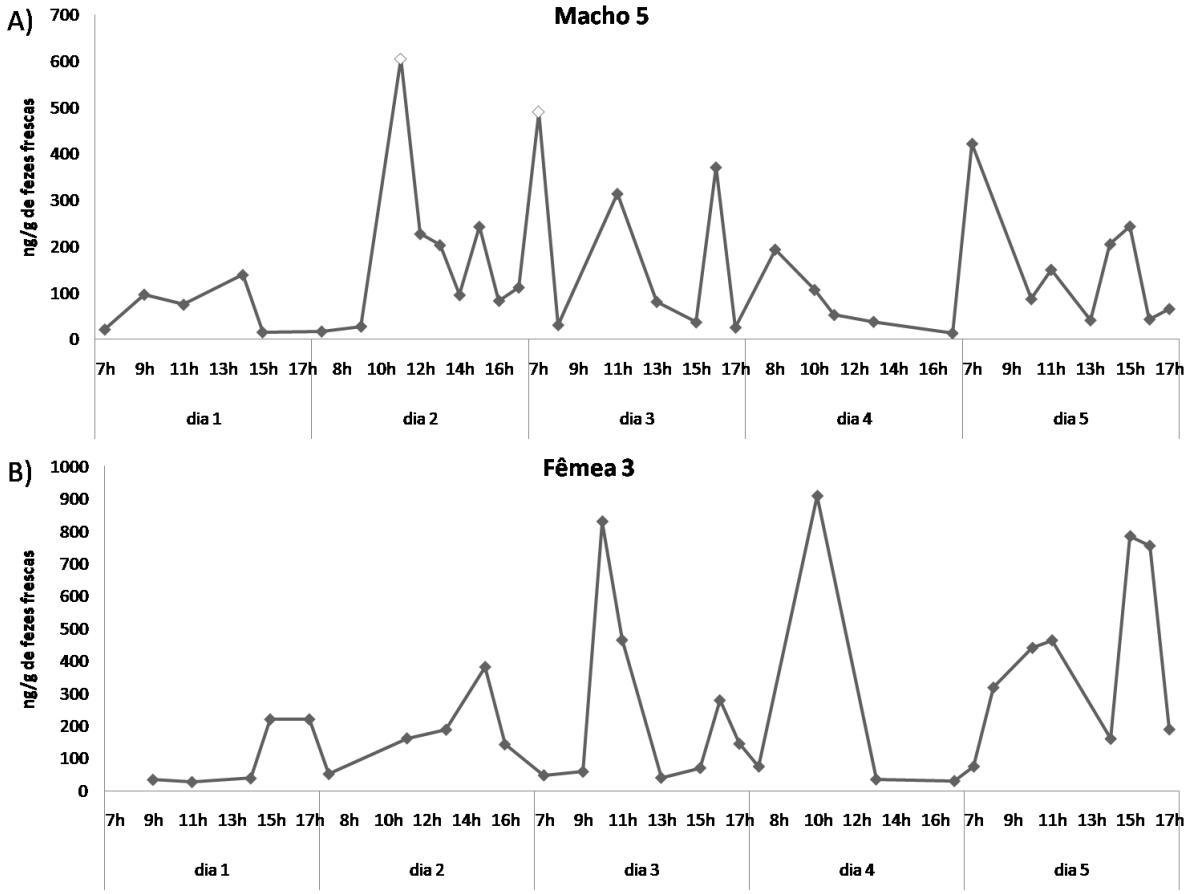

Figura 4 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 5 e B) Fêmea 3. Os wild outliers estão representados por pontos laranja e os outliers estão representados por pontos branco

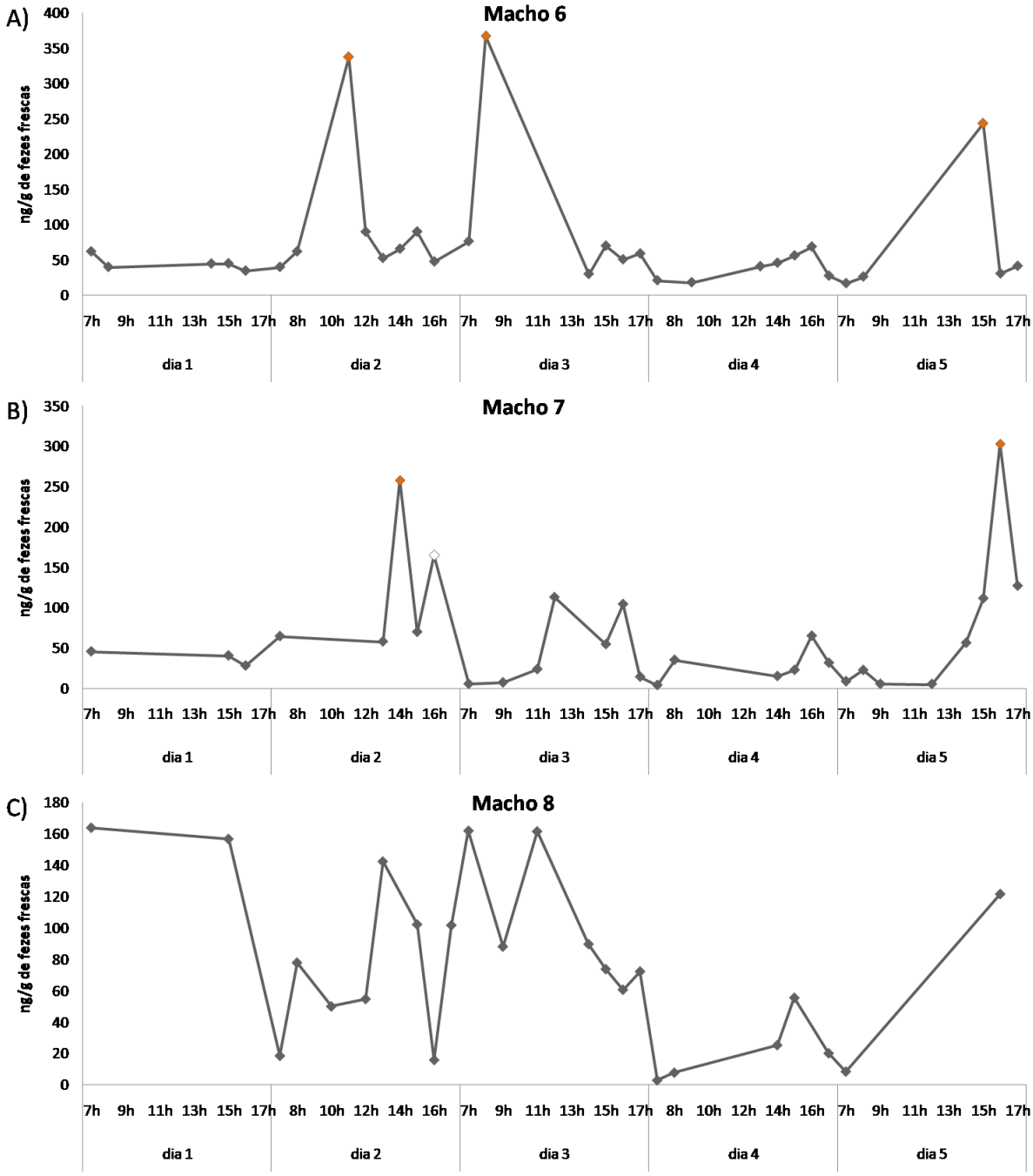

Figura 5 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes ao A) Macho 6, B) Macho 7 e C) Macho 8. Os wild outliers estão representados por pontos laranja e os outliers estão representados por pontos branco

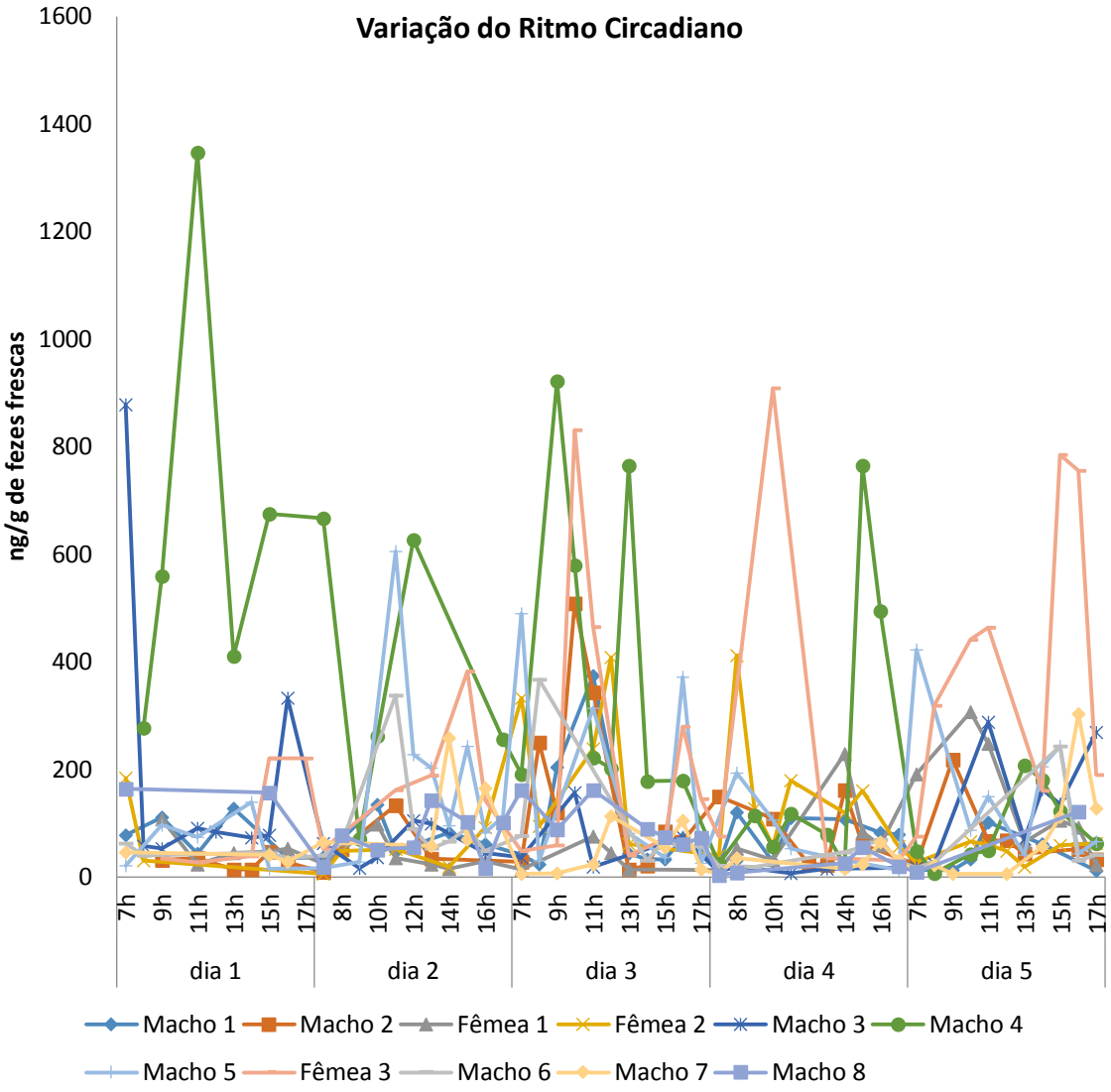

Figura 6 – Perfil temporal de concentrações de metabolitos fecais de glicocorticóides durante a semana em que foi a análise da variação de MFGs de acordo com o ritmo circadiano referentes a todos os indivíduos.

Não foi possível observar uma variação circadiana clara entre os indivíduos. Esses padrões parecem variar muito de individuo para individuo. Entretanto, em alguns indivíduos os picos parecem aparecer no período da manha (entre 9 e 11h) e alguns indivíduos parecem apresentar maiores picos no fim da tarde (entre 15 e 17h).

Bibliografia

Madliger, C.L.; Love, O.P. 2013.The Need for a Predictive, Context-DependentApproach to the Application of Stress Hormones in Conservation. **Conservation Biology**, 00, 1–5.

Raminelli, J.L.F., de Sousa, M.B.C., Cunha, M.S., and Barbosa, M.F.V. 2001. Morning and Afternoon Patterns of Fecal Cortisol Excretion among Reproductive and Non-Reproductive Male and Female Common Marmosets, *Callithrix jacchus.* **Biological Rhythm Research,** 32, 2, 159–167

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

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

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

Touma, C., Sachser, N., Mostl, E., and Palme, R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. **General and Comparative Endocrinology**, 130, 267–278.

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

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

Wheeler, B.C.; Tiddi, B., Kalbitzer, U.; Visalberghi, E.; Heistermann, M. 2012.Methodological Considerations in the Analysis of Fecal Glucocorticoid Metabolites in Tufted Capuchins (Cebusapella). **InternationalJournalofPrimatology**, 34, 879–898.

Anexo 5 – Efeito do isolamento social no comportamento e nos níveis de cortisol de uma fêmea de mico-leão-preto

Introdução

Para animais sociais como os primatas, o isolamento social pode ser interpretado como um possível estressor no ambiente de cativeiro, pois priva os indivíduos de estímulos sociais, o que pode ter efeito no comportamento e também na fisiologia dos indivíduos (MORGAN e TROMBORG, 2007; OLSSON e WESTLUND, 2007). Esse isolamento durante o período a infância pode afetar o comportamento, processos cognitivos e habilidades sociais (CRONEY e NEWBERRY, 2007; OLSSON e WESTLUND, 2007). Na idade adulta, comportamentos potencialmente indicadores de estresse são mais comuns em indivíduos em isolamento social do que em indivíduos em grupo (OLSSON e WESTLUND, 2007. PRICE e STOINSKI, 2007). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar quais foram as diferenças nos comportamentos e nos níveis de glicocorticóides (através de coletas de fezes) dessa fêmea em grupo e em isolamento social.

Procedimentos

Dados comportamentais e fisiológicos foram coletados para uma fêmea adulta (F2 – ver Tabela 1) que foi submetida a dois tratamentos: grupo social (tratamento família) em recinto grande (15 dias durante o verão - 25 de janeiro a 19 de fevereiro de 2016) e isolamento social em recinto grande (15 dias durante o inverno - 30 de maio à 17 de junho de 2016). A mudança de recinto foi feita devido à previsão da transferência do indivíduo para outro zoológico que devia acontecer durante a coleta de dados do inverno. Assim, para evitar que houvesse uma interferência nesse recinto com a remoção dessa fêmea, optamos por transferi-la para outro recinto, de mesmo tamanho, antes do início da coleta de dados (27 de maio de 2016). Entretanto, devido a problemas burocráticos relacionados à documentação de viagem dessa fêmea, ela acabou ficando no CPRJ durante toda a coleta de dados de inverno, em um recinto em isolamento social e visual, mas com contato auditivo com os indivíduos do seu antigo grupo.

Para a análise de dados, foram calculadas as frequências relativas de cada categoria comportamental desta fêmea por dia e por período do dia (manhã e tarde). Essas frequências foram calculadas pela divisão de todos os pontos de cada categoria (soma de pontos de todos os comportamentos dentro de cada categoria como observado no etograma) pelo total de ocorrências registradas durante toda a coleta de dados. Foi realizada então uma MANCOVA

para avaliar se as categorias comportamentais e níveis hormonais (MFGs) dessa fêmea diferiam em um recinto com sua família e um recinto onde ficou isolada, com temperatura e luminosidade como covariáveis.

Ambas as covariáveis ajustaram os valores do modelo (para temperatura $p<0.001$ e para luminosidade $p<0.01$). A composição do grupo influencia significativamente os comportamentos ($p<0.05$) de F2, quando luz e temperatura foram controladas. Somente a frequência dos comportamentos as estereotipados é afetada pela composição do grupo ($p<0.05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequências relativas médias e desvio padrão de cada categoria comportamental da fêmea que sofreu uma mudança de recinto durante os experimentos. Os valores significativos de p apresentam um (*).

	Fêmea 2 em Família	Fêmea 2 em Isolamento	Valores de p
Níveis deMFGs	224	422	.597
Inatividade	0.112	0.017	.597
Vigilância	0.388	0.440	.411
Alimentação	0.059	0.073	.857
Deslocamento	0.140	0.114	.587
Comportamento Agonistico	0.006	0.005	.367
Comportamento de Manutenção	0.003	0.010	.186
Comportamento Territorial	0.014	0.015	.054
Comportamento Auto-direcionado	0.002	0.003	.768
Exploração de ambiente	0.006	0.010	.923
Tempo despendido dentro do abrigo	0.033	0.001	.485
Coçar	0.030	0.058	.304
Vocalizar	0.011	0.015	.779
Comportamento Anormal	0.022	0.005	.336
Estereotipias	**0.053**	**0.231**	**.011***

Nota-se que houve um aumento significativo na frequência de estereotipias após a mudança da fêmea 2 para um recinto em isolamento. Também houve uma diminuição significativa de comportamentos sociais positivos, o que é justificado pela ausência de co-específicos no recinto em isolamento. Houve também um aumento nos níveis hormonais médios embora não tenha sido significativo (Tabela 1).

Bibliografia

Morgan, K.N.; Tromborg, C.T. 2007.Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, 102, 262–302

Olsson, I. A. S., Westlund, K. 2007. More than numbers matter: The effect of social factors on behaviour and welfare of laboratory rodents and non-human primates. **Applied Animal Behaviour Science**, 103, 229–254.

Price, E.E. and Stoinski, T.S. 2007. Group size: Determinants in the wild and implications for the captive housing of wild mammals in zôos. **Applied Animal Behaviour Science**, 103, 255–264