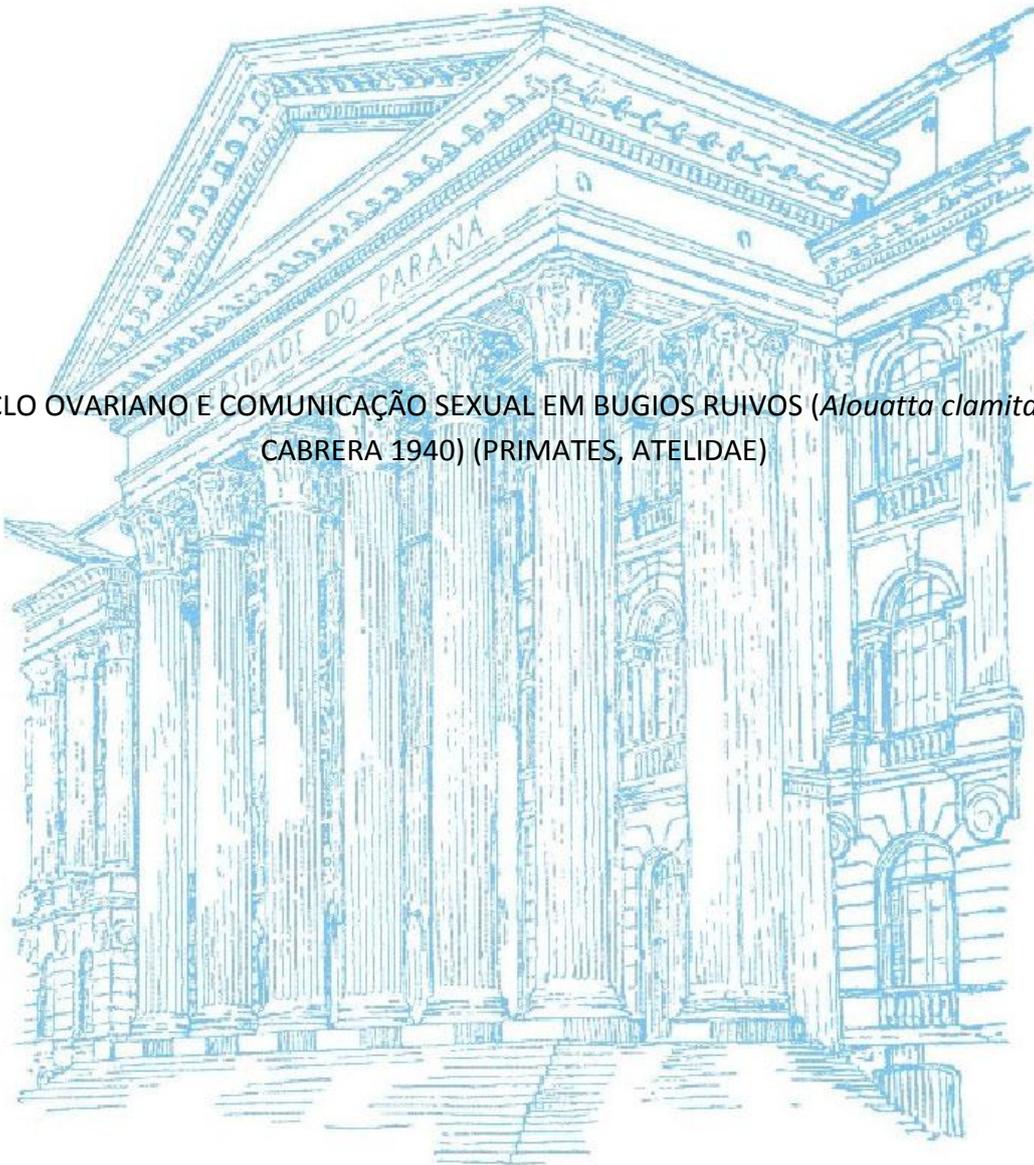


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO SILVESTRE

CICLO OVARIANO E COMUNICAÇÃO SEXUAL EM BUGIOS RUIVOS (*Alouatta clamitans*  
CABRERA 1940) (PRIMATES, ATELIDAE)



CURITIBA

2012

Ciclo Ovariano e Comunicação Sexual em Bugios Ruivos  
(*Alouatta clamitans* Cabrera 1940) (Primates, Atelidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia.

Orientador: Dr. Fernando de Camargo Passos

CURITIBA

2012



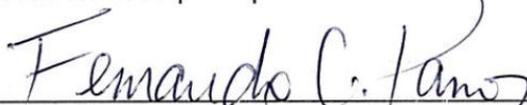
Termo de aprovação

Ciclo Ovariano e Comunicação Sexual em Bugios Ruivos  
(*Alouatta clamitans* Cabrera 1940) (Primates, Atelidae)

por

**Thiago Silvestre**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando de Camargo Passos - UFPR  
Presidente e Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Zelinda Maria Braga Hirano - FURB

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães – USP

Curitiba, 11 de maio de 2012.

*Para aqueles que formaram os alicerces de minha formação pessoal e profissional em todas as dimensões, e ainda continuam a fazê-lo: meus pais, Darci e Clariudes Silvestre.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares e amigos de longa data, que de algum modo tenham contribuído pessoal e profissionalmente na trajetória deste mestrado, me apoiando, aconselhando e incentivando a cada novo objetivo traçado, a cada novo passo lançado, a cada novo desafio aceito. Em especial agradeço aos meus pais, Darci e Clariudes e aos “*meus bons amigos*” Cleber “Mentira” Cunha, Thiago “Katraka” Romualdo e Daniel “Lester” Cobo.

Um dos agradecimentos mais especiais remonta à alguns anos antes do mestrado, àquele que considero meu primeiro orientador. Obrigado Lucas de Moraes Aguiar por me transmitir conhecimentos, ser extremamente crítico comigo, apresentar-me formalmente à primatologia, pela amizade e pelo incentivo acima de tudo.

Obrigado Fernando de Camargo Passos, meu orientador, por ter me aceito prontamente em seu laboratório e por compreender e respaldar as guinadas necessárias para a execução deste projeto.

Aos amigos de convívio acadêmico, obrigado pela troca de experiências, discussões e empatia. Em especial, Gabriela Ludwig, José “Zé” Eduardo da Silva Pereira, Fernando “Ferdí” G. Barriento, Andréas L. Schwarz Meyer, João Eduardo C. Brito, Lucas M. Aguiar, Luciana Zago, Arthur “Bauru” Prudente, Gabriel Magezi, Murilo Z. Marochi, Mariana “Mari” B. Lacerda, André “Gaúcho” Trevisan, Marcisnei Zimmerman, Eveline “Eve” S. Zanetti, Javier A. Sarria Perea.

Ao Nei Moreira, Rosana Morais, Carlos Efrain Stein, Katherinne M. Spercoski pelas críticas e sugestões ao projeto, ao professor Emygdio L. A. Monteiro-Filho pela atenção ao desenvolvimento do trabalho e ao Andréas pela tradução do resumo.

Aos inestimáveis amigos, Ferdí e Bauru. Obrigado pela presença literalmente familiar nesses anos e por todas as incontáveis e impagáveis horas de conversas e companhia durante nossa vida curitibana.

Aos funcionários, bolsistas, estagiários, voluntários, parceiros e amigos do CEPESBI/Projeto Bugio, tanto pela acolhida quanto pelo carinho e dedicação aos bugios. Em especial, agradeço aos responsáveis pelo Projeto Bugio, professores Júlio C. de Souza Júnior e Zelinda Maria Braga Hirano, pelo pronto aceite da parceria e viabilização ao desenvolvimento deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos pela acolhida a todos que integram a equipe do NUPECCE e de modo distinto, agradeço ao professor José Maurício Barbanti Duarte, por aceitar a parceria, abrir prontamente as portas de seu laboratório e contribuir valorosamente para esta pesquisa.

Agradeço também aos pesquisadores Jaqueline Tonetto e Amauri Junglos, pela intensa amizade erigida, pelas experiências vividas além de nossos projetos de pesquisa, pelo esforço em prol dos bugios, por partilharem alegrias e frustrações, e por concluirmos ao “fim”, que tudo valeu a pena.

Ferdi, de modo distinto agradeço por sua dedicação e profissionalismo em nossa parceria de trabalho. Como costumava brincar no departamento, nos momentos que não pude estar em Curitiba (que não foram poucos) você realmente foi como uma “filial” minha. Muito obrigado, foi um prazer trabalhar com você meu caro!

Professora Zelinda, nunca me esquecerei do seu entusiasmo contagiante, que posso afirmar sem vacilar, me abasteceu de confiança e otimismo em um momento crítico do mestrado. Também não esquecerei da acolhida pessoal, a amizade, as críticas e debates ferrenhos, as horas de conversa em sua casa, no CEPESBI ou em qualquer lugar que estivéssemos. Muito obrigado!

Eve, muito obrigado pela recepção em Jaboticabal, por todo o conhecimento transmitido, profissionalismo exemplar, atenção e paciência despendida (imprescindível em meio a tantos detalhes laboratoriais), por sua orientação precisa e impecável, pelo carinho, incentivo, e por contribuir de modo essencial e crítico a este trabalho.

Aos membros da banca, pelas pertinentes contribuições.

À CNPq pela bolsa concedida, e ao PPG-Zoologia pela estrutura e insumos fornecidos para o desenvolvimento do trabalho.

*“A vida é uma dança de parceiros...  
Para a grande maioria das espécies animais,  
a dança entre os sexos é essencial para a existência.  
Mas por mais vital que seja o sexo,  
ele ainda é um enigma brilhante e glorioso”*

Carl Zimmer

*“Só poderemos saber as respostas esperando,  
esperando pacientemente, observando e registrando.”*

Jane Goodall

## Sumário

<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1 Sobre o gênero <i>Alouatta</i> .....	16
1.2 Ciclo Ovariano, Comunicação Sexual e a Primatologia.....	22
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	31
2.1.1 Objetivos Específicos.....	31
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>32</b>
3.1 Local de Estudo e Condições de Cativeiro.....	32
3.2 Sobre o Ciclo Ovariano.....	33
3.2.1 Período de Estudo, Animais e Coleta de Fezes.....	33
3.3 Comunicação Sexual.....	35
3.3.1 Período de Estudo e Animais.....	35
3.3.2 Metabólitos de Andrógenos Fecais: Potencial Fisiológico dos Machos....	36
3.3.3 Interações Sócio-sexuais e Outras Atividades Motoras.....	36
3.4 Processamento das Amostras Fecais.....	40
3.4.1 Armazenamento e Extrações Hormonais.....	40
3.4.2 Dosagens das Progestinas e Metabólitos de Andrógenos Fecais.....	42
3.4.3 Biossegurança.....	44
3.5 Análise dos Dados.....	45
3.5.1 Interpretação das Concentrações Fecais dos Metabólitos de Andrógenos, Progestinas e dos Ciclos Ovarianos.....	45
3.5.2 Comportamento.....	47
3.6 Preceitos Legais e Éticos.....	49
<b>4. Resultados.....</b>	<b>50</b>
4.1 Ciclo Ovariano: Concentrações e Perfis de Progestinas Fecais.....	50
4.2 Comunicação Sexual.....	57
4.2.1 Potencial Fisiológico dos Machos.....	57
4.2.2 Comportamentos Sexuais, Afiliativos e Outras Atividades Motoras.....	57

4.2.3 Caracterização Comportamental do Ciclo Ovariano.....	60
4.2.4 Alerta Comportamental da Ovulação: Intensidade da Atividade Sexual...	63
4.2.5 Atividade Sexual e sua Influência Sobre os Comportamentos Sociais Afiliativos e Outras Atividades Motoras.....	67
<b>5. Discussão.....</b>	<b>69</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>87</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>88</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Divisão de tela de arame vazado entre os recintos permite contato físico entre os animais cativos do CEPESBI..... 33
- Figura 2:** Teste de paralelismo de ligação ao anticorpo CL425 entre progestinas fecais de fêmeas de *Alouatta clamitans* e hormônio padrão (progesterona) em diferentes concentrações..... 43
- Figura 3:** Teste de paralelismo de ligação ao anticorpo R156/7 entre metabólitos de andrógenos fecais de machos de *Alouatta clamitans* e hormônio padrão (testosterona) em diferentes concentrações..... 44
- Figura 4:** Exemplo de descrição das fases interluteais e luteais, períodos não-periovulatórios e periovulatórios e do cálculo dedutivo entre intervalos de coletas..... 47
- Figura 5:** Perfis de progestinas fecais de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans* (Fêmeas 1, 2, 3, e 4) ao longo do período de estudo. As linhas em pontilhado indicam dias onde não houve coletas. .... 53
- Figura 6:** Perfis de progestinas fecais de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans* (Fêmeas 5, 6, 7, e 8) ao longo do período de estudo. As linhas em pontilhado indicam dias onde não houve coletas..... 54
- Figura 7:** Representação gráfica da média do ciclo ovariano de *Alouatta clamitans* (média  $\pm$  erro padrão). Normalizado de acordo com o Dia 0, que representa o início da fase luteal..... 56
- Figura 8:** Distribuição e frequência/hora de ocorrências dos comportamentos sexuais (divididos em relação à atratividade e proceptividade) sobrepostos aos perfis de progestinas fecais em três fêmeas de *Alouatta clamitans* (fêmeas 1,2 e 3)..... 60
- Figura 9:** Distribuição e frequência/hora de ocorrências dos comportamentos sexuais (divididos em relação à atratividade e proceptividade) sobrepostos aos perfis de progestinas fecais em três fêmeas de *Alouatta clamitans* (fêmeas 4,6 e 7)..... 61
- Figura 10:** Diferenças ( $p < 0,05$ ) comportamentais encontradas entre os períodos periovulatórios e não-periovulatórios de cinco fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em frequência relativa por hora de amostragem..... 63
- Figura 11:** Diferenças ( $p < 0,05$ ) na proceptividade entre os períodos periovulatórios e não-periovulatórios de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em dias de ocorrência..... 64

- Figura 12:** Diferenças ( $p < 0,05$ ) na atratividade entre os períodos periovulatórios e não-periovulatórios de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans*.. Dados em dias de ocorrência  
\* sem diferença estatística ( $p > 0,05$ )..... 64
- Figura 13:** Diferenças ( $p < 0,05$ ) na atratividade das fêmeas encontradas entre os períodos de proceptividade não-intensa e proceptividade intensa. Dados em frequência relativa por hora de amostragem..... 65
- Figura 14:** Diferença ( $p < 0,05$ ) entre os dias de atratividade não-intensa e intensa amostrados de seis fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em dias de ocorrência..... 66
- Figura 15:** Diferença ( $p < 0,05$ ) entre os dias de proceptividade não-intensa e intensa amostrados de seis fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em frequência relativa por hora de amostragem..... 66
- Figura 16:** Diferenças ( $p < 0,05$ ) encontradas entre os períodos de atividade sexual e inatividade sexual. Dados em frequência relativa por hora de amostragem..... 68

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Horário e composição das refeições ofertadas aos indivíduos de <i>Alouatta clamitans</i> mantidos no CEPESBI.....	32
<b>Tabela 2:</b> Dados de registro e histórico reprodutivo das oito fêmeas adultas de <i>Alouatta clamitans</i> que integram o grupo experimental.....	34
<b>Tabela 3:</b> Dados de registro e histórico dos sete machos adultos de <i>Alouatta clamitans</i> que integram o grupo experimental.....	35
<b>Tabela 4:</b> Composição dos grupos artificiais de <i>Alouatta clamitans</i> utilizados neste estudo.....	36
<b>Tabela 5:</b> Comportamentos sexuais emitidos por indivíduos de <i>Alouatta clamitans</i> integrantes do grupo experimental mantidos no CEPESBI.....	38
<b>Tabela 6:</b> Comportamentos afiliativos não-sexuais emitidos por indivíduos de <i>Alouatta clamitans</i> integrantes do grupo experimental mantidos no CEPESBI.....	39
<b>Tabela 7:</b> Outras atividades motoras apresentadas por indivíduos de <i>Alouatta clamitans</i> integrantes do grupo experimental mantidos no CEPESBI. ....	40
<b>Tabela 8:</b> Estatística descritiva das concentrações (ng/g de fezes secas) de progestinas fecais das oito fêmeas de <i>Alouatta clamitans</i> integrantes do grupo experimental.....	50
<b>Tabela 9:</b> Descrição dos ciclos ovarianos observados nas sete fêmeas de <i>Alouatta clamitans</i> integrantes do grupo experimental que apresentaram ciclicidade ovariana... 55	55
<b>Tabela 10:</b> Comprimento e concentrações de progestinas fecais de 35 ciclos ovarianos de sete fêmeas de <i>Alouatta clamitans</i> (média $\pm$ erro padrão).....	56
<b>Tabela 11:</b> Concentrações de metabólitos de andrógenos fecais (média $\pm$ erro padrão de ng/g de fezes secas) dos sete machos adultos e do macho juvenil de <i>Alouatta clamitans</i> utilizados neste estudo.....	58
<b>Tabela 12:</b> Números de ocorrências de cada categoria comportamental de “outras atividades motoras” emitidas pelos machos de <i>Alouatta clamitans</i> em cada grupo.....	58
<b>Tabela 13:</b> Números de ocorrências referentes a cada categoria comportamental de interações e outras atividades motoras realizadas por seis fêmeas de <i>Alouatta clamitans</i> .....	59

**Tabela 14:** Atividade sexual e a relação entre a atratividade e a proceptividade (dias de amostragem) nas seis fêmeas de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental..... 59

**Tabela 15:** Esforço amostral do comportamento de cinco fêmeas de *Alouatta clamitans* durante os ciclos ovarianos (n=21) utilizados para a análise comportamental entre as fases luteais e interluteais e entre os períodos periovulatórios e não-periovulatórios.... 62

**Tabela 16:** Correlações encontradas entre os comportamentos atrativos e proceptivos em relação a outras categorias comportamentais e entre eles próprios para as seis fêmeas de *Alouatta clamitans*..... 67

Ciclo Ovariano e Comunicação Sexual em Bugios Ruivos (*Alouatta clamitans* Cabrera 1940) (Primates, Atelidae)

Resumo

Os hormônios sexuais são metabolizados e excretados nas fezes, o que permite acessar com confiabilidade a atividade ovariana através de seus metabólitos. Em primatas, a atividade sexual pode ser influenciada por alterações nos níveis destes hormônios e por fatores sócio-ambientais. Este estudo investigou em fêmeas cativas de *Alouatta clamitans*: (1) a descrição do ciclo ovariano por meio dos perfis de concentrações de progesterona fecais, (2) a influência do ciclo ovariano no comportamento sócio-sexual e noutras atividades motoras e (3) se a atividade sexual influencia outros comportamentos. Para descrição do ciclo ovariano foram coletadas amostras fecais de oito fêmeas adultas de *A. clamitans*. As coletas ocorreram ao amanhecer, cinco dias por semana, durante 20 semanas (entre fevereiro e junho de 2011). As amostras foram secas, pulverizadas, extraídas e em seguida foram dosadas as progesteronas (enzimoimunoensaio). Para o estudo da comunicação sexual, seis fêmeas (duas sozinhas em seus recintos e quatro em duas díades) e sete machos de recintos vizinhos (todos adultos, sozinhos), foram acompanhados durante quinze semanas (entre março e julho de 2011; 240 horas; 74 dias). Foram registradas interações sócio-sexuais e outras atividades motoras (todas as ocorrências). O comportamento sexual foi definido quanto à sua natureza (atrativo ou proceptivo) e quanto sua intensidade (atratividade não-intensa: ANI; atratividade intensa: AI; proceptividade não-intensa: PNI; proceptividade intensa: PI). De acordo com o perfil das progesteronas fecais os ciclos ovarianos foram divididos em fases interluteal e luteal, e períodos periovulatórios (PPO) e não-periovulatórios (PNPO). Foram observados 35 ciclos que apresentaram duração média de  $16 \pm 0,52$  dias (mínimo: 10; máximo: 22). A fase interluteal durou em média  $4 \pm 0,37$  dias (mínimo: 1; máximo: 10) com concentração média de progesterona fecais de  $467,98 \pm 29,12$  ng/g de fezes secas. Já a fase luteal durou  $11 \pm 0,50$  dias (mínimo: 7; máximo: 17) com concentrações médias de  $4283,27 \pm 193,31$  ng/g de fezes secas. A proceptividade dominou a atividade sexual e o comportamento sexual não se restringiu a nenhuma fase/período do ciclo ovariano, contudo o PPO se caracterizou por atividade sexual intensa (AI e PI), recepção de comportamentos afiliativos dos machos e masturbação feminina. Os machos morderam/lamberam o substrato e as fêmeas realizaram mais autocatenação durante os dias de ANI e PNI respectivamente. Os períodos com presença de atividade sexual se associaram aos comportamentos de esfregação hiomandibular e emissão de comportamentos afiliativos não-sexuais para o sexo oposto em machos e fêmeas. O método não-invasivo de dosagem de progesterona fecais através do ensaio imunoenzimático demonstrou ser eficaz para acessar o ciclo ovariano em fêmeas de *Alouatta clamitans*. Durante o período de maior fertilidade houve aumento na intensidade da atividade sexual, e a masturbação esteve ligada à libido sexual. As fêmeas foram atrativas em todas as fases de seu ciclo ovariano e alertaram comportamentalmente os machos em relação ao seu estado reprodutivo, contudo a atratividade só é intensificada em associação ao aumento da proceptividade, que por sua vez esteve associada ao estado reprodutivo das fêmeas. A atividade sexual esteve associada à maior interação social.

**Palavras-chave:** Progesterona Fecais, Proceptividade, Atratividade

Ovarian Cycle and Sexual Communication in Southern Brown Howler Monkey  
(*Alouatta clamitans* Cabrera 1940) (Primates, Atelidae)

Abstract

Sexual hormones are metabolized and excreted in feces, allowing a reliable assessment of the ovarian activity by these metabolites. In primates, sexual activity could be influenced by changes in the levels of these hormones as well by social-environmental factors. This study investigated in captive females of *Alouatta clamitans*: (1) the description of the ovarian cycle by fecal progesterone concentration profiles, (2) the influence of the ovarian cycle over social-sexual behaviors and other motor activities and (3) whether the sexual activity could influence others behaviors. For the description of the ovarian cycle fecal samples were collected from eight adult *A. clamitans* females. Sampling occurred at dawn, five days a week throughout 20 weeks (between February and June 2011). The samples were dried, pulverized, extracted and then the progesterone were dosed (enzymeimmunoassay). For the sexual communication study six females (two alone in their enclosure and four slip in two dyads) and seven males from neighbor enclosures (all of them alone adults) were watched over fifteen weeks (between March and July 2011; 240 hours; 74 days). Socio-sexual interactions and other motor activities were registered (all occurrences sampling). Sexual behaviors were defined as to its nature (receptive or proceptive) and intensity (non-intense attractivity: ANI; intense attractivity: AI; non-intense proceptivity: PNI; intense proceptivity: PI). According to the fecal progesterone profile the ovarian cycles were classified in luteal and interluteal phases, and in periovulatory period (PPO) and non-periovulatory period (PNPO). 35 cycles were observed and the mean cycle length was  $16 \pm 0.52$  days (minimum: 10; maximum: 22). The interluteal phase lasted on average  $4 \pm 0.37$  days (minimum: 1; maximum: 10) with fecal progesterone average concentration of  $467.98 \pm 29.12$  ng/g of dry feces. On the other hand, the luteal phase lasted  $11 \pm 0.50$  days (minimum: 7; maximum: 17) with average concentration of  $4283.27 \pm 193.31$  ng/g of dry feces. Proceptivity dominated sexual activity and the sexual behavior was not restricted to any phase/period of the ovarian cycle, although PPO was characterized by intense sexual activity (AI and PI), receipt of affiliative behaviors from males and female masturbation. Males bite/licked the substrate and females performed more self-grooming during ANI and PNI day, respectively. Periods with sexual activity were associated with hyomandibular rubbing behaviors and the emission of non-sexual affiliative behaviors to the opposite sex in males and females. The non-invasive method for measurement of fecal progesterone through enzymeimmunoassay proved being efficient to assess the ovarian cycle in females of *Alouatta clamitans*. During the period of high fertility there was an increment on the intensity of sexual activity, and the masturbation was linked to sexual libido. The females were attractive in all phases of their ovarian cycle and warned males behaviorally about their reproductive status, but the attractivity only enhanced in association with increased proceptivity, which in turn was associated with the reproductive status of females. The sexual activity is associated to increased social interaction.

Keywords: Fecal Progesterone, Proceptivity, Attractivity

# 1. Introdução

## 1.1 Sobre o gênero *Alouatta*:

Dentre os primatas do Novo Mundo (Primates, Platyrrhini), os do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (popularmente conhecidos como bugios) juntamente com os gêneros *Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix* e *Oreonax* compõe a família Atelidae. Esta está organizada em duas sub famílias, Atelinae e Alouattinae, sendo a última restrita ao seu gênero tipo (Rylands & Mittermeier 2009).

Os bugios são os primatas neotropicais de maior distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina, ocupando ampla gama de habitats com conformidades vegetais diversas (Crockett e Eisenberg 1987, Crockett 1998). No Brasil, Gregorin (2006) assume a ocorrência de dez espécies do gênero: *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), *A. fusca* (Geoffroy Saint-Hilarie, 1812), *A. clamitans* Cabrera 1940, *A. belzebul* (Linnaeus, 1766), *A. discolor* (Spix, 1823), *A. ululata* Elliot 1912, *A. juara* (Linnaeus, 1766), *A. macconelli* (Humboldt, 1912), *A. puruensis* Lönnberg, 1941 e *A. nigerrima* Lönnberg, 1941.

Tanto machos como fêmeas são tricromatas visuais (Jacobs *et al.* 1996). Em sua dieta, os itens mais representativos são folhas e frutos, sendo que na família Moraceae, especificamente o gênero *Ficus*, parece ser um recurso chave (Aguiar *et al.* 2003, Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez 2007, Estrada *et al.* 1999b, Mendes 1989, Silver *et al.* 2008). Os bugios atuam também como dispersores das sementes dos frutos predados (Estrada & Coates-Estrada 1984, Estrada *et al.* 1999a, Julliot 1996, Muñoz *et al.* 2006).

As folhas jovens são preferidas a despeito das maduras devido ao seu teor, mais rico em proteínas, com menos fibras, menor teor de tanino e maior digestibilidade (Milton 1979). Mesmo de maneira involuntária, os bugios podem ter acesso à proteína de origem animal através da ingestão de larvas de artrópodes presentes em sementes, folhas e frutos consumidos (Bravo & Zunino 1998, Bravo & Sallenave 2003).

As folhas jovens e os frutos maduros são itens prediletos, ligados diretamente à alterações no padrão de atividades dos bugios em épocas de abundância. Nestes períodos maior tempo é alocado em atividades de alimentação e deslocamento em busca por estes itens (Aguiar *et al.* 2003, Estrada *et al.* 1999b, Miranda e Passos 2004, Palacios & Rodriguez 2001, Silver *et al.* 1998).

Os bugios apresentam padrão de atividades dominado pelo descanso/inatividade, e dedicam parte ínfima de seu tempo (geralmente menos de 5%) aos comportamentos sociais, sejam eles de qualquer natureza. (Altmann 1959, Bravo & Sallenave 2003, Chiarello 1993, Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez 2007, Estrada *et al.* 1999b, Mendes 1989, Mittermeier 1973).

Os bugios não apresentam sazonalidade reprodutiva, apenas períodos em que há maior concentração de nascimentos, sendo estes períodos reportados em diversos momentos ao longo do ano. A gestação, com duração em torno dos 180 dias, finda normalmente com o nascimento de apenas um filhote (Crockett & Sekulic 1982, Glander 1980, Strier *et al.* 2001). Contudo, Chapman & Chapman (1986), relataram o nascimento de gêmeos em *Alouatta palliata*, ressaltando que ficou evidente as dificuldades para a mãe lidar com dois recém nascidos.

Habitualmente passam-se em torno de 22 meses entre um nascimento e outro (Arroyo-Rodriguez *et al.* 2008, Glander 1980, Strier *et al.* 2001) e o desmame ocorre por volta do segundo ano de vida (Arroyo-Rodriguez *et al.* 2008a).

A razão sexual dos nascimentos é de 1:1, entretanto a experiência prévia da mãe é fator relevante na sobrevivência de seus descendentes. Independente disto, a taxa de sobrevivência nos primeiro ano de vida é maior nas fêmeas, as quais atingem a maturidade sexual mais cedo do que os machos (por volta dos 36 e 42 meses respectivamente) e acabam por experimentar vários ciclos inférteis antes de conceberem (Glander 1980).

O tamanho dos grupos não está primariamente limitado ou potencializado devido à competição por recursos alimentares, mas sim parece ser moldado por estratégias sociais (Knopff & Pavelka 2006), onde a composição do grupo pode ter maior influência no seu tamanho. Grupos com maior razão de machos adultos apresentam maior taxa de sobrevivência dos indivíduos imaturos, e suas fêmeas apresentam melhor sucesso reprodutivo. Isto pode ser explicado por uma maior capacidade de proteção contra ameaça conspecífica (e.g. infanticídio) (Treves 2001).

Da mesma maneira, as variações demográficas observadas em populações de *Alouatta* são melhores explicadas por fatores históricos (como pressão de caça, doenças, alterações dos habitats) do que pela produtividade das florestas nos diversos habitats que ocupam (Chapman & Balcomb 1998).

As migrações entre grupos ocorrem em ambos os sexos. Apesar de também ocorrer com indivíduos adultos, é frequente que ocorra nos juvenis por volta dos dois anos e meio de idade (Arroyo-Rodriguez *et al.* 2008, Clarke & Glander 2008; Clarke & Glander 2010, Glander 1980). Todavia os indivíduos podem até mesmo retornar aos

grupos natais após anos de migração. Entre os fatores que estão relacionados à migração, a permanência da mãe no grupo parece ser um evento relevante para que os filhos a realizem (Clarke & Glander 2008, Clarke & Glander 2010).

O amadurecimento sexual pode ser um evento decisivo para um indivíduo ser forçado a migrar. A idade em que ocorre a maior parte das migrações é a época de desenvolvimento das genitálias (Clarke & Glander 2008). Em contrapartida, o monomorfismo comportamental e hormonal verificado entre juvenis pode retardar sua saída do grupo natal. Desta maneira eles poderiam assegurar um maior tempo de aprendizado e desenvolvimento de habilidades sociais que lhe serão úteis para a vida adulta (Clarke *et al.* 2007).

Contudo a razão sexual dos grupos possui mais evidências para explicar as migrações, sendo que os grupos parecem se acomodar em uma razão sexual ótima. Machos saem de grupos com baixa razão de fêmeas/machos e se fixam em grupos com maior número de fêmeas, o padrão inverso também é observado com relação às próprias fêmeas (Clarke & Glander 2010). Miranda *et al.* (2006b) sugerem ainda que um desarranjo na razão sexual e um número exacerbado de indivíduos pode levar a fissão de grupos.

Em ambos os sexos, evitar o infanticídio também é uma hipótese considerável para explicar as migrações (Clarke & Glander 2008). O infanticídio pode estar ligado à seleção sexual, competição por recursos e patologia social (Aguiar *et al.* 2005, Knopff *et al.* 2004).

O risco de infanticídio também se reflete na resposta do macho alfa residente à vocalização de machos de outro grupo. Na presença de indivíduos imaturos em seu

grupo, o alfa tende a responder apenas vocalizando, sem se afastar de seu grupo, o que é menos observado em outros contextos de encontros (Kitchen 2003).

De fato, a potente vocalização dos bugios, característica do gênero - possível devido a uma hipertrofia do osso hióide (Gregorin 2006, Schon 1971) - pode ser utilizada na defesa do território/recursos, onde os machos residentes são capazes de avaliar e contestar seus rivais através dos rugidos. (Chiarello 1995, Cunha & Jalles-Filho 2007, Kitchen 2003).

O rugido do bugio também pode denunciar sua posição a predadores (Miranda *et al.* 2006a). Mesmo figurando entre os maiores primatas neotropicais, os bugios são susceptíveis à predação por iraras, jaguatiricas, pumas, onças pintadas e gaviões (Asensio e Gómez-Marín 2002, Bianchi & Mendes 2007, Camargo & Ferrari 2007, Ludwig *et al.* 2007, Miranda *et al.* 2005, Miranda *et al.* 2006a, Peetz *et al.* 1992).

São fatalmente sensíveis à febre amarela e sofrem severamente devido à infestação por bernes (Bicca-Marques 2009, Crockett 1998). A pressão de caça pode ser destacada como problema para sua conservação em locais desprotegidos (Crockett 1998).

Todavia, a maior ameaça aos bugios não foge a regra dos principais problemas de conservação da fauna em geral: a severa perda de habitats (Crockett 1998). A fragmentação das matas também podem confinar espécies congêneres e potencializar a geração de híbridos e formação de grupos mistos em *Alouatta* (Aguiar *et al.* 2008). Ademais, as fragmentações prejudicam as migrações e, por conseguinte a formação de novos grupos (Arroyo-Rodríguez *et al.* 2008b, Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez 2007, Zunino *et al.* 2007).

Mesmo assim, devido a sua capacidade de sobreviver em pequenas áreas de vida e o fato de possuírem uma dieta essencialmente folívora, os bugios parecem conseguir persistir em áreas degradadas, e/ou de alto risco (Crockett 1998, Silver *et al.* 1998), matas fragmentadas, áreas com corte seletivo controlado de árvores (Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez 2007, Zunino *et al.* 2007) e em agrossistemas que preservam espécies arbóreas (Muñoz *et al.* 2006).

Onde os plantios sombreados são executados, os bugios podem contribuir com estes por promover o efeito de poda das árvores nativas utilizadas para sombreamento, dispersar suas sementes e acelerar o fluxo de nutrientes ao derrubar ramos, folhas e frutos no solo (Muñoz *et al.* 2006).

Contudo, a viabilidade das populações resistentes em localidades de fragmentação acentuada pode ser questionada, devido sua influência na organização social, potencial de migração, formação de novos grupos e menor densidade absoluta (Zunino *et al.* 2007). A vulnerabilidade destes ambientes pode atuar negativamente de forma direta no bem estar dos animais que ali vivem (Estrada *et al.* 1999a).

A espécie foco de estudo, *Alouatta clamitans* Cabrera 1940, tem ocorrência desde a região nordeste da Argentina, seguindo pelo Rio Grande do Sul através das vertentes de Mata Atlântica até mais ao norte na região do rio Jequitinhonha, em Minas Gerais (Gregorin 2006).

Seus grupos possuem em média seis indivíduos, geralmente com um ou dois machos adultos, duas a três fêmeas adultas e indivíduos imaturos (Miranda & Passos 2005). Contudo há extremos onde o grupo é formado apenas pelo casal e seu filhote (observação pessoal), ou então grupos maiores, como o estudado por Junglos (2011) que continha 15 indivíduos (sendo cinco machos adultos).

Possuem dicromatismo sexual evidente na fase adulta, onde os machos tendem à coloração ruiva intensa, enquanto as fêmeas geralmente apresentam padrão castanho escuro ou avermelhado (Gregorin 2006). Em especial, os machos desta espécie se autocoram através de pigmentos liberados por glândulas sudoríparas modificadas denominadas glândulas produtoras de pigmento (GPP's) (Hirano *et al.* 2003, Hirano 2004).

Tal pigmento pode estar associado à manutenção das relações hierárquicas e atuar na comunicação entre os indivíduos, através da própria manutenção da coloração e também por meio do comportamento de esfregação. Este mecanismo é utilizado entre os indivíduos do mesmo grupo e também na comunicação intergrupar (Hirano *et al.* 2003, Hirano 2004, Hirano *et al.* 2008, Junglos 2011).

## **1.2 Ciclo Ovariano, Comunicação Sexual e a Primatologia**

Há algumas décadas, hormônios eram interpretados como agentes moduladores de estados fisiológicos e comportamentais, sendo que estas relações eram entendidas como uma via de mão única. Com a aparição de novas técnicas e estudos realizados em outras áreas de conhecimento como a psicologia, ecologia comportamental e primatologia, foram obtidos resultados que permitiram análises comparativas aos dados endocrinológicos e foi possível detectar que o ambiente externo pode também atuar ativamente no estado endócrino dos animais (Worthman 1990).

Assim sendo, os perfis hormonais de animais passaram a ser compreendidos como integrantes de uma rede intrincada de relações onde o ambiente social (demografia, ecologia, estrutura social), comportamentos sociais e sexuais, e

mecanismos neuroendócrinos se relacionam entre si afetando uns aos outros mutuamente (Worthman 1990, Bercovitch & Ziegler 2002).

Tendo em vista uma interpretação evolutiva dos mecanismos biológicos estas interações devem ter evoluído de modo a favorecer o valor adaptativo dos animais afetando diretamente seu sucesso reprodutivo (Bercovitch & Ziegler 2002).

No âmbito da reprodução, pode-se dizer que o hipotálamo é a interface de comunicação entre o meio externo e o interior do organismo (Brown 2008, Nelson 1995, Norris 2007). Através de sinais externos e por estímulos de diversas outras regiões do cérebro, ele se comunica quimicamente através de neuro-hormônios com a hipófise, ou glândula pituitária, que por sua vez atua sobre as gônadas. Estes três componentes formam o eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG) (Asa 1996; Nelson 1995, Norris 2007).

Os três componentes do HHG atuam um sobre o outro complexamente. De forma geral o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que chega diretamente à adenohipófise pelo sistema porta hipofisário. Por sua vez, o GnRH como seu nome propõe, estimulará a liberação de gonadotrofinas, tais como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Ambos atuarão na síntese dos hormônios sexuais esteroidais nas gônadas (progestágenos, andrógenos e estrógenos). Os três componentes do HHG são regulados negativamente pelo excesso dos seus próprios hormônios e dos hormônios liberados devido a sua estimulação (e.g. GnRH em excesso inibe o hipotálamo a liberar mais GnRH, assim como gonadotrofinas e esteróides sexuais também o fazem) (Nelson 1995; Norris 2007).

Todos os esteróides sexuais são derivados do colesterol, onde os primeiros hormônios a serem formados na clivagem do colesterol são progestágenos

(pregnenolona e progesterona), sendo precursores de todos os outros hormônios sexuais. No entanto, a formação de estrógenos se dá através da aromatização de alguns tipos de andrógenos, o que significa que estes são precursores diretos dos estrógenos (Nelson 1995).

Durante o ciclo ovariano, os folículos primordiais iniciam seu processo de amadurecimento sob influência das gonadotrofinas. Em seu primeiro estágio, as células da granulosa que recobrem o oócito se multiplicam e desenvolvem receptores para o FSH, responsável pela produção de uma enzima aromatizante. Acima das células da granulosa, além da membrana basal, surgem células da teca. As células da teca interna são estimuladas e desenvolvem receptores para LH. Sob sua influência, estas células produzem andrógenos, que são convertidos em estrógenos rapidamente pelas células da granulosa (Asa 1996, Nelson 1995, Norris 2007).

A fase de desenvolvimento do folículo primordial se denomina fase folicular do ciclo ovariano, e se caracteriza pelo baixo nível de progestinas, alta produção de estrógenos e aumento do folículo através do surgimento e crescimento de uma cavidade entre o oócito e as camadas celulares que o recobrem (Nelson 1995, Norris 2007).

Ao final do desenvolvimento do folículo, com aumento notável de estrógenos resultantes da maturação folicular, há um pico de LH e ocorre a ovulação, momento associado a um aumento na atividade sexual da fêmea. Este é o momento onde se inicia a fase luteal do ciclo. Após a extrusão do óvulo e sob influência do LH, as células da granulosa e da teca interna se degradam formando o corpo lúteo. Considerado uma glândula endócrina de duração efêmera, o corpo lúteo é responsável por liberação de estrógenos e intensa liberação de progestágenos, que caracteriza esta fase do ciclo ovariano (Asa 1996, Nelson 1995, Norris 2007).

O evento da ovulação pode ser inferido por meio de diferentes sinais e métodos. A menstruação marca a senescência do corpo lúteo, sendo sinal de que o óvulo não foi fecundado, ocorrendo em momentos de baixos níveis de hormônios sexuais. Destarte, o ciclo menstrual pode ser observado com intuito de estudar o ciclo ovariano (Asa 1996, Nagle 2000). O sangramento pode ser evidente, como observado em antropóides do velho mundo, ou discreto, sendo verificado através da citologia vaginal como no caso dos bugios (Dixson 1998, Kugelmeier *et al.* 2011, Miyamoto *et al.* 2001)

Registrando sinais exclusivamente comportamentais, o ciclo estral pode ser investigado com intuito de compreender o ciclo ovariano. O período no qual a fêmea aceita ser copulada se denomina período de estro, e tem relação direta ovulação. O ciclo estral é definido como intervalo de tempo entre dois períodos de estro. Entretanto, excetuando-se os prosímios, o conceito de estro perde o sentido nos antropóides, haja vista que neste grupo não se observa um período estrito de receptividade feminina (revisado por Dixson 1998).

Utilizando perfis de progesterinas e estrógenos estudos vêm sendo desenvolvidos envolvendo o ciclo ovariano tanto em prosímios (Blanco & Meyer 2009, Shideler & Lasley 1982), como em antropóides do velho mundo (Atsalis *et al.* 2004, Fujita *et al.* 2001, Heistermann *et al.* 1995, Lu *et al.* 2010, Miyamoto *et al.* 2001, O'neill *et al.* 2004, Shideler & Lasley 1982) e do novo mundo (Carnegie *et al.* 2005, De Vleeschouwer *et al.* 2000, French *et al.* 1996, Hearn 1983, Savage *et al.* 1997, Vallengia *et al.* 1999, Ziegler *et al.* 1996).

Em prosímios e antropóides do velho mundo o ciclo ovariano é típico, onde um pico de estrógenos ocorre e decai rapidamente precedendo uma elevação prolongada nos níveis dos progesterinas (indicando as fases folicular e luteal respectivamente)

(Atsalis *et al.* 2004, Blanco & Meyer 2009, Fujita *et al.* 2001, Heistermann *et al.* 1995, Lu *et al.* 2010, Miyamoto *et al.* 2001, O'Neill *et al.* 2004, Shideler & Lasley 1982).

Em contraposição, o ciclo descrito em primatas neotropicais utilizando metabólitos urinários e fecais dos esteroides sexuais exibem um padrão incomum, onde a fase folicular não apresenta um pico de estrógenos isolado, mas sim um pico que acompanha simultaneamente a elevação de progestinas na fase luteal (Carnegie *et al.* 2005, De Vleeschouwer *et al.* 2000, French *et al.* 1996, Savage *et al.* 1997, Ziegler *et al.* 1996).

Kendrick & Dixson (1983) e Valeggia *et al.* (1999). encontraram padrão semelhante em dosagem sanguínea (*Callithrix jacchus*), e de metabólitos urinários (*Callicebus moloch*) respectivamente. Entretanto a controvérsia persiste, sendo que outras pesquisas com dosagens hormonais sanguíneas demonstram o ciclo ovariano em padrão convergente com os dos demais primatas (Nagle & Denari 1983: *Cebus apella*).

De qualquer maneira o método não-invasivo de coleta de fezes permite a realização de dosagens hormonais utilizando metabólitos fecais dos esteroides sexuais e abordagem eficiente de questões envolvendo a função reprodutiva tanto em primatas cativos, (Campbell *et al.* 2001, Carosi *et al.* 1999, Kugelmeier *et al.* 2011, Miyamoto *et al.* 2001) como de vida livre (Blanco & Meyer 2009, Brockman & Whitten 1996, Fujita *et al.* 2004, Strier & Ziegler 1997).

Tal eficácia já foi testada de várias formas dentro da Ordem Primates, onde dados de metabólicos fecais foram comparados a dados hormonais oriundos de outras fontes biológicas, características morfológicas e citológicas. Blanco & Meyer (2009) obtiveram resultados satisfatórios ao comparar os perfis de metabólitos fecais com alterações citológicas e morfológicas da vagina de *Microcebus rufus*. Outras pesquisas

com primatas *in situ* e *ex situ*, compararam os perfis de metabólitos fecais com os de metabólitos urinários (Campbell *et al.* 2001, Carosi *et al.* 1999) e níveis hormonais plasmáticos (Fujita *et al.* 2001, Ziegler *et al.* 1996). Os resultados obtidos evidenciam a eficácia e potencial das amostras fecais como forma de monitoramento endócrino reprodutivo de animais selvagens. Método que também pode fornecer dados acerca de abortamentos em vida livre, os quais, na maioria das vezes, passam despercebidos (Campbell *et al.* 2001).

Além disso, o próprio monitoramento hormonal através de metabólitos fecais exhibe padrões de atividade ovariana corroborados pela ciclicidade, magnitude e relação entre alterações de perfis de estrógenos e progestinas, sustentados ainda por dados comportamentais (Atsalis *et al.* 2004, Brockman & Whitten 1996, Carnegie *et al.* 2005, Carosi *et al.* 1999, De Vleeschouwer *et al.* 2000, O’neill *et al.* 2004, Savage *et al.* 1997, Valeggia *et al.* 1999).

Justamente por seu caráter não-invasivo, pela confiabilidade e potencialidade dos dados e por sua relação com outros parâmetros (e.g. o comportamental), a dosagem hormonal através de metabólitos fecais é uma ferramenta eficaz para o monitoramento e compreensão da função reprodutiva de animais silvestres (Brown 2008, Heistermann *et al.* 1995).

Além da função reprodutiva, estrógenos e progestinas são hormônios que respondem pelo desenvolvimento de caracteres sexuais femininos, tanto anatômicos como comportamentais, (Abbott & Hearn 1978, Fujita *et al.* 2004, Nelson 1995, Shideler & Lasley 1982).

Alterações morfológicas cíclicas podem ocorrer em resposta às alterações hormonais durante o ciclo ovariano. Em *Lemur variegatus* a vagina, que é fusionada, só

se abre no restrito período de cópulas, e em *Macaca silenus* as fêmeas apresentam inchaço na região genital relacionada ao aumento de estrógenos (Shideler & Lasley 1982).

Apesar de não ser restrito ao período ovulatório, o comportamento sexual em primatas exhibe alterações relacionadas ao ciclo ovariano. Sua frequência aumenta nas fases consideradas peri e/ou pré-ovulatórias, e folicular. A fase luteal é distinta da folicular, exibindo menor atividade sexual (Atsalis *et al.* 2004, Campbell *et al.* 2001, Carnegie *et al.* 2005 , De Vleeschouwer *et al.* 2000, O’neill *et al.* 2004, Shideler & Lasley 1982).

O comportamento sexual da fêmea pode ser dividido em três estados distintos: atratividade, proceptividade e receptividade. A atratividade refere-se à pistas não comportamentais emitidas pela fêmea (e.g. sinais químicos) e percebidos pelos machos de sua espécie. Desta forma a atratividade pode ser abordada por meio do registro de comportamentos emitidos pelos machos às fêmeas Já a proceptividade, diz respeito a comportamentos emitidos pelas fêmeas com finalidade de iniciar ou manter relacionamento sexual com os machos, e a receptividade se caracteriza na fase em que a fêmea de fato permite a cópula (Beach 1976, Dixson 1998, Nelson 1995).

A aliança destes conceitos com parâmetros hormonais permite compreender melhor a comunicação sexual e a estratégia reprodutiva adotada por fêmeas de diversas espécies primatas (Atsalis *et al.* 2004: *Gorilla gorilla*, Campbell *et al.* 2001: *Ateles geoffroyi*, Carnegie *et al.* 2005: *Cebus capucinus*, De Vleeschouwer *et al.* 2000: *Leontopithecus chrysomelas*, O’neill *et al.* 2004: *Macaca fuscata*, Shideler & Lasley 1982: *Gorilla gorilla*, *Lemur variegatus* e *Macaca silenus*).

Poucos estudos utilizando esteróides sexuais foram realizados para compreender os padrões e processos envolvidos na reprodução de *Alouatta*, tanto *in situ* quanto *ex situ*. Conquanto, há evidências de que a atividade sexual e a manutenção de laços íntimos entre as díades reprodutivas sejam compartilhados, onde machos concorram de forma pacífica, estabelecendo e mantendo vínculos com fêmeas em ciclicidade ovariana. Em contrapartida, as fêmeas podem ser as principais responsáveis por iniciar as cópulas durante seu período periovulatório (Belle *et al.* 2009, Van Belle *et al.* 2009).

O ciclo ovariano de *Alouatta*, estimado por meio de metabólitos fecais, pode variar entre médias de 18 a 20 dias (*A. caraya*: 19,6 dias, Kugelmeier *et al.* 2011, *A. pigra*: 18,3 dias, Van Belle *et al.* 2009). Para *A. pigra*, os estudos foram realizados em vida livre enquanto para *A. caraya*, foram utilizadas fêmeas cativas. Desta maneira, verifica-se que foram encontrados resultados convergentes entre estudos *ex situ* e *in situ*, sendo os dados de Van Belle *et al.* (2009) corroborados por eventos comportamentais.

Através de dados sobre a fisiologia reprodutiva de machos cativos de *A. caraya* (qualidade, volume e motilidade espermática, níveis de testosterona sérica e metabólitos fecais de andrógenos), Moreland *et al.* (2001) sugeriram tendência à sazonalidade reprodutiva destes animais em cativeiros norte americanos com aumentos de andrógenos no meio do ano (meses quentes). Kugelmeier *et al.* (2011) verificaram atividade ovariana em fêmeas cativas no Brasil durante meses quentes, entretanto seu estudo não foi sazonal e a possibilidade das fêmeas ciclarem durante o ano todo não pode ser descartada. Em vida livre, não foi encontrado padrão de sazonalidade reprodutiva em *A. fusca clamitans* através da observação de nascimentos em 10 grupos (Strier *et al.* 2001).

A abordagem aliando padrões endócrinos e comportamentais permite melhor compreensão sobre a comunicação sexual, além disso, informações sobre o sistema reprodutivo podem permitir projeções futuras de viabilidade das populações de primatas (Kleiman & Rylands 2008). Tais dados são relevantes diante de propostas conservacionistas e manejo tanto *in situ* quanto *ex situ* (e.g. estudos de fertilidade, reprodução assistida, demografia e estratégias reprodutivas).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Avaliar os perfis das concentrações de metabólitos fecais de progesterona em fêmeas de *Alouatta clamitans*, assim como suas relações com a comunicação sexual.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

a) Descrever o ciclo ovariano por meio dos perfis de concentrações de progestinas fecais;

b) Investigar a influência do ciclo ovariano na emissão de comportamentos sexuais, outros comportamentos afiliativos e outras atividade motoras em ambos os sexos;

c) Verificar se a atividade sexual influencia sobre outros comportamentos afiliativos e outras atividade motoras nas interações entre machos e fêmeas.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Local de Estudo e Condições de Cativeiro

A pesquisa foi realizada no estado de Santa Catarina, no município de Indaial, especificamente no Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial – CEPESBI (Lei Municipal n°2099, de 20 de março de 1992), onde há 20 anos existe o Projeto Bugio. O local conta com um criadouro científico de animais silvestre (registro IBAMA n°. 1/42/98/000708-90), onde se encontravam 41 espécimes de *Alouatta clamitans*.

A alimentação era distribuída em seis refeições diárias, compostas por frutas e legumes de cultivares domésticos, ração canina de manutenção, folhas de *Cecropia glaziovii* (embaúba) e *Sechium edule* (chuchu) retiradas da mata nativa, a água é fornecida *ad libitum* (Tabela 1).

Tabela 1: Horário e composição das refeições ofertadas aos indivíduos de *Alouatta clamitans* mantidos no CEPESBI.

Horário	Composição
08:00	Frutas e legumes
10:00	Folhas
13:00	Frutas, legumes e ração
15:30	Folhas
16:00	Frutas e legumes
17:00	Folhas

Os animais eram mantidos em recintos com 3,0 X 5,0 X 2,6 m (largura X comprimento X altura), enriquecidos com mangueiras, troncos e plataformas alimentares. Os recintos possuíam área de contenção/isolamento, estavam dispostos em linhas e entre eles havia apenas uma tela de arame vazado que permitiu o contato físico entre os animais (Figura 1). A limpeza dos recintos foi realizada diariamente e as pessoas envolvidas no manejo utilizaram equipamentos de proteção individual.



Figura 1: Divisão de tela de arame vazado entre os recintos permite contato físico entre

## 3.2 Sobre o Ciclo Ovariano

### 3.2.1 Período de Estudo, Animais e Coleta de Fezes

Anteriormente ao início das coletas sistematizadas foi realizada uma fase piloto entre 01/11/2010 à 15/11/2010 com intuito de testar a logística de coleta dentro das possibilidades de manejo dos animais no CEPESBI.

O estudo ocorreu entre 08/02/2011 e 25/06/2011, totalizando 20 semanas durante as quais foram coletadas amostras fecais de oito fêmeas adultas (Fêmeas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8; Tabela 2). As fêmeas 6 e 7 estavam em outro cativeiro vinculado ao Projeto Bugio e foram translocadas para o CEPESBI no início de Março, quando passaram a fazer parte do experimento, totalizando 15 semanas de coletas para estas.

Tabela 2: Dados de registro e histórico reprodutivo das oito fêmeas adultas de *Alouatta clamitans* que integram o grupo experimental.

Animal	Sigla	Nº Registro	Nome	Condição de Recinto	Idade Estimada (anos)	Classe Sexotária Quando foi Recebida	Histórico Reprodutivo	Tempo no Recinto Atual
Fêmea 1	F1	98	Vitória	Díade com fêmea 2	4,5	Fêmea Infante	Nulípara	3 meses
Fêmea 2	F2	119	Teka	Díade com fêmea 1	> 6	Fêmea Adulta	*Desconhecido	3 meses
Fêmea 3	F3	73	Panduva	Sozinha	> 7	Fêmea Juvenil	Nulípara	3 meses
Fêmea 4	F4	43	Cacau	Sozinha	> 11	Fêmea Juvenil	Nulípara	1 mês
Fêmea 5	F5	56	Rodi	Díade com macho juvenil	> 13	Fêmea Adulta	*Desconhecido	1 mês
Fêmea 6	F6	106	Cris	Díade com fêmea 7	> 5	Fêmea Juvenil	Nulípara	0
Fêmea 7	F7	71	Laguna	Díade com fêmea 6	> 11	Fêmea Adulta	*Desconhecido	0
Fêmea 8	F8	121	Joana	Sozinha	> 6	Fêmea Adulta	*Desconhecido	0

\*Em cativeiro nunca pariram.

As coletas ocorreram uma vez ao dia, cinco dias por semana logo ao amanhecer. Com intuito de evitar o risco de coletar amostras do dia anterior e/ou de o animal defecar sobre as mesmas, periodicamente o coletor retirou dos recintos todas as fezes acumuladas durante o período vespertino, ao entardecer do dia precedente às coletas. No caso das díades, os animais eram separados (conduzidos por estímulo alimentar) ao final do dia para garantir a individualização das amostras no ato da coleta.

Amostras não foram coletadas quando o dia amanhecia sob intensa chuva (devido ao fato de os recintos serem abertos), quando possuíam aspecto diarréico, quando eventualmente algum animal esteve separado no ambulatório para intervenções clínicas ou se o animal deixou de defecar.

### 3.3 Comunicação Sexual: Sobre o Comportamento

#### 3.3.1 Período de Estudo e Animais

Anteriormente ao início das coletas sistematizadas foi realizada uma fase piloto entre 01/2/2011 à 28/02/2011, totalizando 60 horas de coleta, com os objetivos de habituar os animais ao observador, elaborar um etograma e testar previamente as planilhas de coleta.

O estudo ocorreu entre 01/03/2011 à 20/06/2011, totalizando 15 semanas de coleta de dados comportamentais de 13 animais, sendo seis fêmeas adultas (F1, F2, F3, F4, F6 e F7; Tabela 2) e sete machos adultos (Tabela 3). Como os recintos estão dispostos em linhas, e fazem divisas no máximo com um recinto de cada lado, os animais foram dispostos de maneira a formar quatro grupos artificiais (Tabela 4), compostos por um recinto com fêmea(s) no centro e um vizinho (macho) de cada lado.

Tabela 3: Dados de registro e histórico dos sete machos adultos de *Alouatta clamitans* que integram o grupo experimental.

Animal	Sigla	Nº Registro	Nome	Condição de Recinto	Idade Estimada (anos)	Classe Sexo-etária Quando foi Recebido
Macho 1	MA1	59	Nicky	Sozinho	> 10	Macho Juvenil
Macho 2	MA2	68	Bimbo	Sozinho	> 9	Macho Juvenil
Macho 3	MA3	85	Kalvin	Sozinho	> 5	Macho Infante
Macho 4	MA4	70	Coquinho	Sozinho	> 9	Macho Juvenil
Macho 5	MA5	69	Sharon	Sozinho	>13	Macho Adulto
Macho 6	MA6	61	Madu	Sozinho	> 9	Macho Infante
Macho7	MA7	48	Gucky	Sozinho	> 10	Macho Infante

Tabela 4: Composição dos grupos artificiais de *Alouatta clamitans* utilizados neste estudo.

	Recinto Fêmea(s)	Recinto Vizinho 1	Recinto Vizinho 2
Grupo 1	Díade (FA1 e FA2)	MA 1	MA 2
Grupo 2	Solitária (FA3)	MA 2	MA 3
Grupo 3	Solitária (FA4)	MA 4	MA 5
Grupo 5	Díade (FA6 e FA7)	MA 6	MA 7

### 3.3.2 Metabólitos Fecais de Andrógenos: Potencial Fisiológico dos Machos

Com intuito de averiguar se os machos adultos se encontravam em situação fisiológica adequada para desempenhar sua atividade sexual foram coletadas amostras fecais de cada macho (a cada  $25 \pm 2$  dias) para dosagem de metabólitos fecais de testosterona. Também foram coletadas amostras de um macho juvenil (MJ; idade mínima estimada de  $>2,5$  anos) para comparação dos seus níveis hormonais com os dos machos adultos.

### 3.3.3 Interações Sócio-sexuais e Outras Atividades Motoras

Os etogramas elaborados (Tabelas de 5 a 7), foram adaptados de Dada *et al.* (2011), elaborados também com os animais do CEPESBI. Como confirmado durante a fase piloto, os comportamentos sociais (sexuais e afiliativos não-sexuais) e demais atividades motoras alvos deste estudo, não configuram *estados* comportamentais, mas sim *eventos*, normalmente de curta duração (em geral questão de segundos) e na sua grande maioria de baixa frequência.

Desta maneira optou-se pela utilização do método de registro de todas as ocorrências (Martin & Bateson 1983; Altmann 1974) dos comportamentos previamente definidos (Tabelas 5, 6 e 7).

Como os comportamentos de interesse poderiam variar muito em sua duração (de 3 ou 4 segundos até alguns minutos - e.g. esfregações, autocatações, inspeção de genitália), e frente à facilidade de observação precisa que os recintos permitem, foi adotado o critério padrão de registro de nova ocorrência a cada 10 segundos em que a mesma atividade persistiu.

Em exceção aos métodos descritos previamente, a masturbação (Tabela 5) foi registrada quanto a sua presença/ausência e a categoria “Tempo em Proximidade” (Tabela 6) entre dois indivíduos foi registrado através do Animal Focal com registro contínuo (Martin & Bateson 1983; Altmann 1974).

O final de um registro comportamental se dava quando o animal cessava a atividade de interesse para ficar inativo, para executar outros comportamentos que não os de interesse para este estudo, ou então quando alternava entre as categorias comportamentais de interesse.

As sessões de amostragem tiveram duração de 20 minutos e foram realizadas três vezes ao dia com os quatro grupos, totalizando 60 minutos por grupo ao dia, cinco vezes por semana. A ordem dos grupos amostrados foi sempre definida em sorteio prévio, sendo que o mesmo grupo nunca foi amostrado dentro um intervalo menor do que 40 minutos entre as sessões.

Os horários das amostragens foram adequados ao manejo alimentar dos animais. Como a alimentação sempre é ofertada nos mesmos horários do dia (Tabela 1), as amostragens sempre terminaram no máximo 20 minutos antes das alimentações e se iniciaram no mínimo 20 minutos após. A primeira amostragem nunca ocorreu antes da primeira refeição do dia (em torno de 8:00 da manhã).

Durante as sessões de amostragem a higienização dos recintos não foi executada próximo aos grupos de estudo. As sessões não ocorreram quando choveu e/ou houve imprevistos como visitantes ou obras.

Tabela 5: Comportamentos sexuais emitidos por indivíduos de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental mantidos no CEPESBI.

---

<i>Exibir Genital</i>	O animal direciona a genitália ao outro e a expõe abrindo os membros posteriores e/ou colocando a cauda para cima ou de lado. A exibição pode ser realizada assumindo a postura de lordose, neste caso erguendo ou deixando a cauda de lado, ou então abrindo os membros posteriores enquanto se apoia pelos quatro membros e cauda na grade de divisa do recinto. A exibição geralmente é antecedida por uma busca visual ao receptor. Enquanto este não se aproxima do emissor, ele com frequência procura o receptor com o olhar durante a exibição dos genitais, podendo mostrar a língua concomitantemente.
<i>Farejar Genital</i>	O animal aproxima sua face às genitais do outro em distância curta, igual ou menor que a de suas mãos. Pode ser acompanhada de manipulação.
<i>Inspecionar Genital</i>	O animal manipula de qualquer forma a genitália de outro, sempre com a própria face distante da mesma.
<i>Lamber Genital</i>	O animal aproxima sua face às genitais do outro em distância curta, suficiente para que sua língua possa tocar no parceiro. A lambida pode ser acompanhada de manipulação dos genitais e com frequência pode ser escutada pelo observador nas condições de cativeiro.
<i>Masturbação (somente fêmeas)</i>	Pode ocorrer com o animal utilizando os próprios membros anteriores, o substrato ou outro animal. Utilizando os próprios membros o animal pode manipular e/ou dedilhar os genitais repetidamente. Quanto ao substrato, o animal sentado, esfrega os genitais em movimentos de vai e vem rápidos e curtos. Outra forma é esfregar a região do clítoris contra a grade, enquanto está pendurada pelos quatro membros nela com o mesmo padrão de movimentos. A masturbação utilizando outro animal é quando uma fêmea executa um movimento de monta em outro, com movimentos de vai e vem rápidos e curtos. A masturbação é acompanhada de movimentos de protração e retração da língua.

---

---

<i>Mostrar a Língua</i>	Quando o animal, em contato visual com outro do mesmo grupo artificial expõe e retrai a língua rapidamente (excluindo-se quando este padrão ocorre em concomitância com qualquer outra categoria aqui descritas). Pode ocorrer repetidamente e também ser escutada nas condições de cativeiro.
<i>Puxar</i>	O animal, podendo ser macho ou fêmea puxa o outro através dos pelos ou por qualquer parte do corpo. Este comportamento sempre ocorre antes ou após outro comportamento sexual, como o “mostrar a língua”. Excetua-se desta categoria quando os machos puxam as fêmeas juntamente com movimentos pélvicos de vai e vem.
<i>Tentativa de Cópula</i>	Quando o macho, com ereção, puxa a fêmea através das grades e tenta a penetração com movimentos de vai e vem da região pélvica. Geralmente a fêmea está em posição de lordose ou de costas para o macho.

---

Tabela 6: Comportamentos afiliativos não-sexuais emitidos por indivíduos de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental mantidos no CEPESBI.

<i>Catção</i>	Um animal manipula e/ou dedilha os pêlos ou qualquer parte do corpo de outro animal (com excessão da genitália). Pode ser acompanhada por lambidas ou mordiscadas na região catada.
<i>Descansar Junto</i>	Quando o animal interrompe atividade de locomoção a uma distância igual ou menor que a de seus membros anteriores de outro indivíduo, ou quando deixa de emitir comportamento social ou sexual e permanece sem deslocamento por no mínimo 10 segundos próximo ao parceiro.
<i>Tempo em Proximidade</i>	Tempo (em minutos) que dois indivíduos permaneceram em distância igual ou menor que a de seus membros anteriores.

---

Os comportamentos listados como sexuais, foram tratados como atrativos, ou relativos à atratividade quando emitidos dos machos para as fêmeas. Já os comportamentos sexuais emitidos das fêmeas em direção aos machos foram considerados como relativos à proceptividade (Beach 1976, Dixson 1998, Nelson 1995).

Foi gerado um índice de dominância entre as fêmeas pareadas, onde o total de eventos de catação emitidos por cada fêmea foi dividido pelo total de eventos de catação entre a díade

Tabela 7: Outras atividades motoras apresentadas por indivíduos de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental mantidos no CEPESBI.

---

<i>Autocatação</i>	O animal manipula e/ou dedilha os pêlos ou qualquer parte do seu próprio corpo (com excessão da genitália). Pode ser acompanhada por lambidas ou mordiscadas na região catada. Geralmente ocorre nos membros posteriores e é acompanhada por inspeção visual da região catada.
<i>Coceira</i>	O animal utiliza qualquer um de seus membros para atritar as pontas dos dedos contra qualquer parte de seu corpo (com excessão da genitália) repetidamente, nunca dedilhando ou manuseando os pêlos ou qualquer outra parte do corpo.
<i>Esfregação de Anogenital</i>	O animal esfrega a região anogenital no substrato com movimentos vai e vem em qualquer direção. Pode acontecer ininterruptamente.
<i>Esfregação de Costas</i>	O animal esfrega a região dorso-lateral do corpo no substrato com movimentos vai e vem em qualquer direção. Pode ocorrer com o animal sentado ou deitado com o ventre para cima, de qualquer forma produzindo contrações em forma de "S" no eixo da coluna vertebral. Também pode ocorrer quando o animal deitado rola de um lado para o outro repetidamente.
<i>Esfregação Hiomandibular</i>	O animal esfrega a região de hióide e/ou mandíbula no substrato com movimentos vai e vem em qualquer direção. Pode ocorrer ininterruptamente.
<i>Morder/Lamber o Substrato</i>	O animal morde ou lambe o substrato sem causa aparente, sem considerar os casos em que o substrato contenha gotículas de águas.

---

### 3.4 Processamento das Amostras Fecais

#### 3.4.1 Armazenamento e Extrações Hormonais:

Após a coleta as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos do tipo ziploc e imediatamente acondicionados em freezer (-20°C) no próprio CEPESBI. Os

códigos eram registrados em planilhas com informações como data, animal e condições anormais de coleta. Mensalmente as amostras foram transportadas à cidade de Curitiba, estado do Paraná, em isopor com gelo e novamente acondicionadas em (-20°C) no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As amostras foram retiradas do freezer e colocadas em estufa à 80° C durante 72 horas para secagem. Depois de secas foram pulverizadas dentro de sacos plásticos utilizando-se um martelo de borracha e pistilo, sendo homogeneizadas manualmente em seguida. O pó resultante foi acondicionado em flasconetes plásticos (12x75 mm, devidamente identificados) até preenchê-lo por completo, o excesso foi descartado. Até a extração, os flasconetes novamente foram estocados à -20° C.

As extrações foram realizadas no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Para a extração dos metabólitos hormonais, 0,5 g de cada amostra foram diluídos em 5 mL Metanol p.a. (80%). Em seguida foram agitadas por turbilhonamento durante 30 segundos em agitador de tubos (Marconi MA-162), e deixadas em homogeneizador (Evlab EV-020) por 12 horas. Posteriormente foram agitadas por turbilhonamento novamente por 10 segundos e centrifugadas (Centrífuga Excelsa II 206 MP, 1500 rpm por 20 min) (ver Graham *et al.* 2001). Adiante o extrato sobrenadante foi separado da fase sólida e acondicionado em tubos plásticos de 12 x 75 mm, novamente preservados à -20 °C até o momento das dosagens.

### 3.4.2 Dosagens das Progestinas e Metabólitos de Andrógenos Fecais

Ambos os metabólitos foram dosados através do ensaio imunoenzimático (EIA), técnica que basicamente consiste na competição entre um antígeno marcado e o antígeno da amostra (desconhecido) pela ligação com pequena quantidade de anticorpo (Brown 2008).

Para a dosagem das progestinas foi utilizado o anticorpo CL425 (C. Munro, Universidade da Califórnia – Davis – CA – USA). A reatividade cruzada do anticorpo CL425 foi descrita por Graham *et al.* (2001) como: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona) 100,0%; 4-pregnen-3 $\alpha$ -ol-20-ona 188,0%; 4-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona 172,0%; 4-pregnen-11 $\alpha$ -ol-3,20-diona 147,0%; 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-ona 94,0%; 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-ona 64,0%; 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-diona 55,0%; 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-ona 12,5%; 5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona 8,0%; 4-pregnen-11 $\beta$ -ol-3,20-diona 2,7%; 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-ona 2,5%; 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol (pregnenediol) <0,1%; outros metabólitos <0,1%.

A validação técnica das dosagens hormonais foi obtida através de: (1) pela observação de disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pelo pool de extratos fecais preparados por diluição seriada em tampão de diluição ( $R^2=0,97$ ; diluição de trabalho 1:000; Figura 2); (2) significativa recuperação dos hormônios exógenos adicionados às amostras fecais devidamente diluídas ( $y=1,010x + 0,571$ ,  $R^2=0,98$ ); e (3) pela relevância fisiológica dos resultados obtidos quando as diferentes fases do ciclo reprodutivo foram comparadas.

Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaio foram avaliados para dois controles internos, com alta (C1, com ~35% de ligação) e com baixa (C2, com ~70% de ligação) concentração hormonal (diluição de 1:500 e 1:2000 respectivamente; CV intra-

ensaio: C1=20,76 e C2=18,28; CV interensaio: C1=19,99 e C2=20,46; CV da curva padrão interensaio <6,5; total de 50 placas).

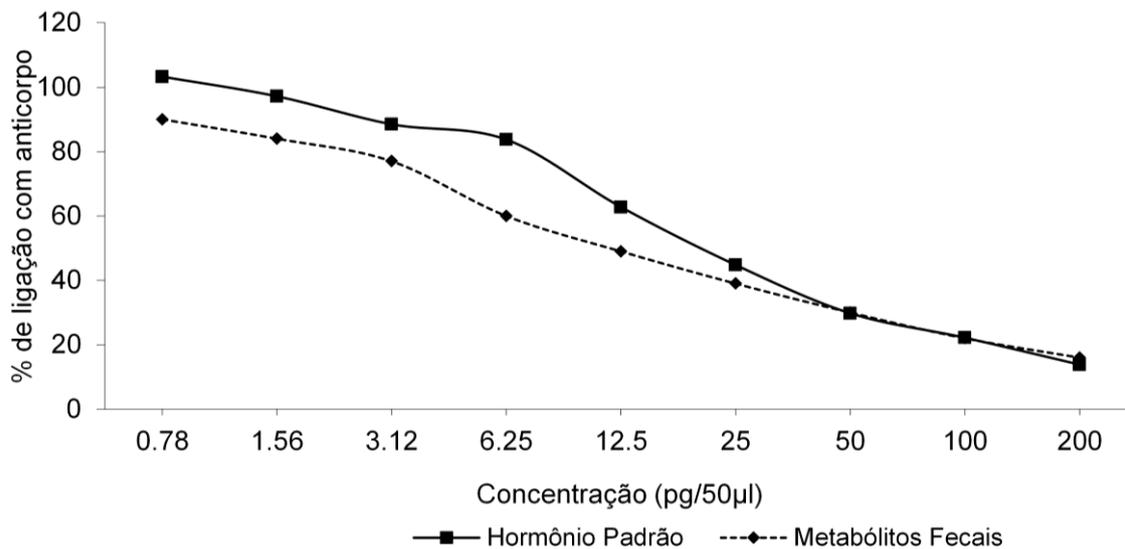


Figura 2: Teste de paralelismo de ligação ao anticorpo CL425 entre progestinas fecais de fêmeas de *Alouatta clamitans* e hormônio padrão (progesterona) em diferentes concentrações.

Para os metabólitos de andrógenos foi utilizado o anticorpo monoclonal R156/7 (C. Munro, Universidade da Califórnia – Davis – CA – USA) com reatividade cruzada para 100% com testosterona; 57,3% com 5 $\alpha$ -dihydrotestosterona; 0,2% com androstenediona, 0,4% com androsterona e 0,04% com todos os outros metabólitos testados (Versiani *et al.* 2009).

Quanto à validação: (1) apresentou disposição paralela entre a curva padrão e a curva formada pelo pool de extratos fecais preparados por diluição seriada em tampão de diluição ( $R^2=0,99$ ; diluição de trabalho 1:100; Figura 3); (2) significativa recuperação dos hormônios exógenos adicionados às amostras fecais devidamente diluídas ( $y=1,626x + 3,5992$ ,  $R^2=0,99$ ); e (3) pela relevância fisiológica dos resultados obtidos quando as diferentes valores encontrados entre o macho juvenil e os machos adultos.

Os CV's intra- e interensaio também foram avaliados para dois controles internos, com alta (C1, com ~30% de ligação) e com baixa (C2, com ~70% de ligação) concentração hormonal (diluição de 1:32 e 1:512 respectivamente; CV intra-ensaio: C1=20,76 e C2=18,28; CV interensaio: C1=12,60 e C2=12,61; CV da curva padrão interensaio <7,9; total de 3 placas).

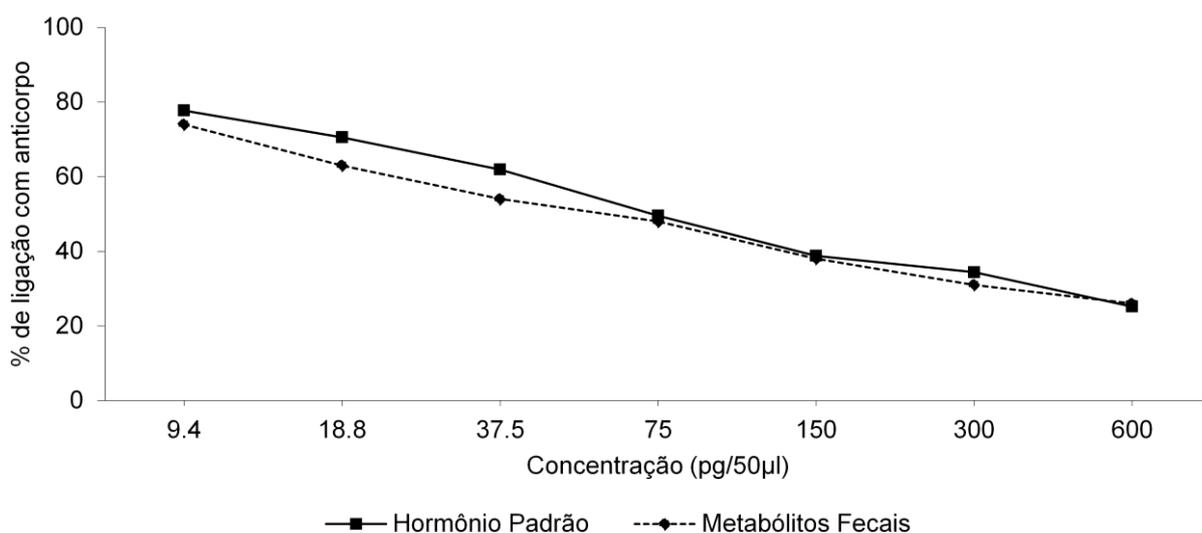


Figura 3: Teste de paralelismo de ligação ao anticorpo R156/7 entre metabólitos de andrógenos fecais de machos de *Alouatta clamitans* e hormônio padrão (testosterona) em diferentes concentrações.

### 3.4.3 Biossegurança

Durante a coleta das amostras fecais e manejo dos animais sempre foram utilizados equipamentos de proteção individual, como luvas de procedimento, jaleco e máscara.

Todo rejeito resultante de qualquer procedimento durante a realização da pesquisa, tanto no cativeiro quanto no laboratório, foi encaminhado para destinação de material biológico/hospitalar do Campus Centro Politécnico da UFPR (fase de pulverização) e do Campus da UNESP de Jaboticabal (extração e dosagens).

### **3.5 Análises dos Dados**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou que apenas os dados referentes aos níveis de metabólitos de andrógenos fecais dos machos apresentaram distribuição normal. Desta forma, com exceção destes, a todos os outros conjuntos de dados foram aplicados testes estatísticos não-paramétricos.

Foram considerados significantes resultados com  $p < 0,05$ . Todos os testes foram realizados com o software BioEstat 5.0.

#### **3.5.1 Interpretação das Concentrações Fecais dos Metabólitos de Andrógenos, Progestinas e Ciclos Ovarianos**

As concentrações dos metabólitos fecais de ambos hormônios foi expressa em ng/g de fezes secas. As concentrações de metabólitos de andrógenos fecais foram submetidos à análise de variância e pós-teste de Tukey, para verificar se os níveis hormonais entre os machos adultos divergiam entre si e com os do macho juvenil.

Em relação aos níveis de progestinas, foi realizada a estatística descritiva dos dados, que foram expostos sempre no formato de “média  $\pm$  erro padrão”. Como este trabalho contempla somente dados sobre metabólitos de progesterona, suas fases foram denominadas como fases interluteal e luteal. Isto porque não se pode afirmar com certeza que a fase interluteal teria comprimento idêntico ao que chamamos de folicular (com seu aumento pronunciado de estrógenos).

Para interpretação das concentrações hormonais e descrição dos ciclos ovarianos foi realizado o cálculo proposto por Heistermann *et al.* (1997). Para cada indivíduo

foram selecionados os pontos considerados basais de cada ciclo. Então foram obtidos os valores da média e do desvio padrão (DP) deste conjunto de dados.

Os pontos que ficaram acima do valor da média + 2 DP foram considerados indicativos de fase luteal, e os que ficaram abaixo deste limite foram considerados de fase interluteal. O cálculo foi realizado individualmente para cada fêmea.

Como as coletas de fezes ocorreram cinco vezes por semana, nos dias em que não houve coletas, o nível de progesterina assumido foi obtido graficamente, ligando com uma linha reta os dois pontos entre o intervalo de coleta. Estes níveis deduzidos foram assumidos para todos os intervalos de coleta e fizeram parte dos cálculos dos ciclos ovarianos e suas divisões (Figura 4).

Somente ciclos completos foram considerados. O comprimento dos ciclos (dias) foi definido através do intervalo entre o primeiro dia da fase interluteal e o último da fase luteal.

Outra divisão analisada foi entre períodos não-periovulatórios (PNPO) e periovulatórios (PPO). Esta divisão deve-se ao fato de que o evento da ovulação pode se mostrar comportamentalmente distinto dos outros dias em relação à atratividade e proceptividade (ver Beach 1976, De Vleeschouwer *et al.* 2000, Dixson 1998, Van Belle *et al.* 2009).

Estudos com primatas não-humanos demonstraram que os níveis de progesterona plasmática se elevam logo em seguida ao pico de LH (hormônio luteinizante, responsável pela ovulação), fato que também é refletido tardiamente nos metabólitos fecais da progesterona (Shideler *et al.* 1993; Ziegler *et al.* 1996).

Como as amostras fecais acumulam os metabólitos que foram sintetizados a partir dos hormônios circulantes na corrente sanguínea, há um atraso na sua excreção e

eles devem representar o estado fisiológico do animal referente ao dia anterior da coleta (Campbell *et al.* 2001; Shideler *et al.* 1993; Ziegler *et al.* 1996; Ziegler *et al.* 1997). Desta maneira o dia provável de ovulação (dia 0) foi considerado o dia anterior ao primeiro dia de elevação dos níveis de progesterona (início da fase luteal).

Em consequência do maior intervalo entre coletas ter sido de dois dias, o PPO foi definido como o dia  $0 \pm 2$  dias. Consequentemente o PNPO é a soma dos dias anteriores e posteriores ao PPO do respectivo ciclo ovariano (Figura 4).

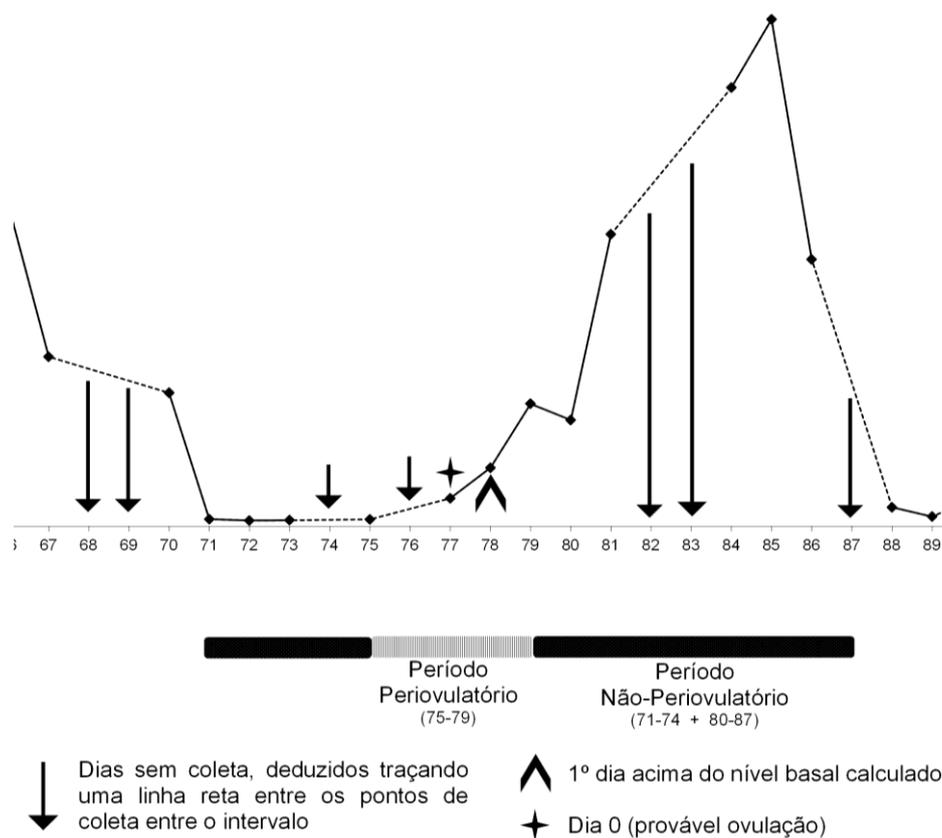


Figura 4: Exemplo de descrição das fases interluteais e luteais, períodos não-periovulatórios e periovulatórios e do cálculo dedutivo entre intervalos de coletas.

### 3.5.2 Comportamento

Para todas as análises os comportamentos foram transformados em frequências de ocorrência por hora de amostragem. Na sobreposição dos dados comportamentais aos

hormonais, os de comportamento foram alinhados com as dosagens hormonais referentes ao dia seguinte de sua coleta, devido ao atraso na excreção dos metabólitos fecais referentes aos hormônios circulantes (Campbell *et al.* 2001; Shideler *et al.* 1993; Ziegler *et al.* 1996; Ziegler *et al.* 1997).

Para averiguar se alguma fase do ciclo ovariano se distingue comportamentalmente, os dias foram agrupados de acordo com suas divisões (interluteal e luteal, não-periovulatório e periovulatório).

Posteriormente, a análise da atividade sexual foi refinada, dividindo os períodos de atratividade e proceptividade de acordo com sua intensidade. *Atratividade intensa* (AI) foi definida como sendo os dias em que a frequência de emissão de tais comportamentos foram iguais ou maiores que o terceiro quartil do mesmo. Os dias em que a atratividade intensa não ocorreu foram agrupados na categoria *atratividade não-intensa* (ANI), contemplando os dias de ausência de atividade atrativa e os dias em que esta atividade foi inferior ao terceiro quartil de sua frequência. Os mesmos critérios foram aplicados para definir a *proceptividade intensa* (PI), *proceptividade não-intensa* (PNI). Todos estes parâmetros foram calculados individualmente.

A atividade sexual geral foi agrupada em relação à sua presença, onde os foram agrupados os dias de *inatividade sexual* (ISX) e *atividade sexual* (ASX).

O teste de correlação de Spearman foi realizado entre os comportamentos sexuais atrativos e proceptivos (separadamente) com relação aos outros comportamentos e entre eles próprios.

Como estes dados sempre se referiram à amostras pareadas, foram analisados com o teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

### **3.6 Preceitos Legais e Éticos**

Todas as atividades foram realizadas dentro das normas legais vigentes no país (licença Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade nº26674-1) e em conformidade com a ética em experimentos com animais (Comissão de Ética no Uso de Animais – Universidade Regional de Blumenau, protocolo nº 013/10).

## 4. Resultados

### 4.1 Ciclo ovariano: Concentrações e Perfis de Progestinas Fecais

Ao final do experimento 764 amostras foram obtidas para as oito fêmeas, das quais foram dosadas 758. As dosagens revelaram grande amplitude nos níveis de progestinas intra e inter-individualmente e também em relação ao nível basal obtido para cada indivíduo (Tabela 8).

Tabela 8: Estatística descritiva das concentrações (ng/g de fezes secas) de progestinas fecais das oito fêmeas de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental.

Indivíduos	Número de Amostras	Média	Erro Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo	Nível Basal
F1	103	3.812,16	470,03	20.859,81	139,91	1155,11
F2	102	666,13	89,56	4.412,12	92,72	193,54
F3	100	3.622,33	428,30	19.579,19	173,45	942,99
F4	100	3.713,96	276,97	12.251,48	243,70	1471,30
F5	98	3.806,79	371,14	14.390,80	113,78	399,99
F6	81	744,29	58,71	2.684,44	121,59	-
F7	81	2.348,64	191,92	9.539,77	192,65	701,59
F8	93	3.816,26	335,76	14.621,14	159,45	836,80
Geral	758	2.866,40	123,74	20.859,81	92,72	-

Os perfis exibidos demonstraram com clareza padrões de elevação e queda dos progestinas, os quais permitem inferir sobre a ciclicidade ovariana em sete das oito fêmeas estudadas (Figuras 5 e 6). Nota-se que a escala das Figuras 5 e 6 vão até o valor de 15.000ng/g de fezes secas. Isto deve-se ao fato de que somente seis amostras atingiram valores superiores. Três delas são dos três últimos dias de coleta da F1 (amostras dos dias 136, 137 e 138) e as outras três em F3 (amostras dos dias 7, 8 e 59).

Ao que se observa, F1 iniciou o período de amostragem provavelmente no início de uma fase luteal. Após o término desta, houve uma queda e elevação iniciada a partir

do 20º dia de coleta. No entanto esta elevação não apresentou o padrão demonstrado posteriormente pela mesma e foi desconsiderada.

Desta forma o primeiro ciclo ovariano foi contado a partir do dia 25. Após o encerramento deste, houve uma fase interluteal mais prolongada que as demais. Desde então se verificaram mais quatro ciclos completos, somando cinco ao total, com a amostragem se encerrando no início de mais uma possível fase luteal.

Já F2 foi a fêmea que apresentou a amostra de menor valor absoluto (dia 1, 92,72 ng/g) e também a menor média (666,13 ng/g), mesmo assim pode-se observar cinco ciclos ovarianos completos. Iniciou a amostragem com clara aciclia que perdurou até o dia 49. A partir daí foi observada uma elevação que corrobora as demais fases luteais observadas. Todavia ela não foi considerada por não ser possível identificar o comprimento da prévia fase interluteal.

Em seguida iniciou-se desde o dia 58 uma nova fase interluteal de um ciclo completo, seguido no mesmo padrão por mais quatro ciclos. Pelo observado, ela também terminou a amostragem no início de nova elevação.

O perfil de F3 demonstra que ela iniciou em meio a uma presumível fase interluteal de ciclo. Na sequência houve mais duas elevações precedidas por valores baixos. Contudo, estes dois possíveis ciclos (do dia 17 ao dia 46) foram desconsiderados por não apresentarem elevações de mesmo padrão às que se seguiram. Assim sendo, desde o dia 47 até o 130 foram constatados cinco ciclos ovarianos completos, onde o primeiro apresentou pico acima dos 19.000 ng/g.

A F4 foi quem apresentou maior número de ciclos, oito ao total. O primeiro ciclo observado foi desconsiderado, pois não houve possibilidade de acompanhar o final

da fase luteal do ciclo anterior, de modo que não há como ter certeza se a aparente fase interluteal do início está completa.

A segunda elevação que se observa (entre os dias 17 e 25) também não foi contabilizada, pois sua possível fase interluteal não atingiu os níveis basais calculados para esta fêmea (abaixo de 1471,30 ng/g), como fora observado posteriormente nos demais ciclos. Desde o dia 26 observou-se subsequentemente os oito ciclos completos, com o encerramento no início de nova elevação.

No gráfico de F5, a primeira provável fase luteal (entre os dias 10 e 21) foi descartada por não haver certeza se o ciclo apresentado estava completo. Então a partir do dia 22 observam-se seis ciclos completos, encerrando-se também em nova elevação, possivelmente uma fase luteal.

O perfil apresentado por F6 não foi utilizado na descrição de comprimento de ciclos ou de suas fases. Notam-se dois ou três períodos de aciclia com algumas possíveis tentativas de ciclo. Contudo em nenhum momento pode-se definir com clareza padrões de quedas e elevações como nas demais fêmeas.

O padrão de excreção das progestinas fecais em F7 também foi irregular. Entretanto é possível destacar o período entre os dias 17 e 45 como fase de possível atividade ovariana regular, somando dois ciclos. De restante parece haver insurgências mal definidas de tentativas de ciclagem com quedas abruptas sem padrão definido.

A última fêmea, F8, apresenta cinco ciclos discerníveis. Após o primeiro ciclo ovariano completo (entre os dias 23 e 41) registrou-se um período instável com duas pequenas elevações permeadas por uma queda abrupta de apenas um ponto (dia 49). Em seguida seguiram-se mais quatro ciclos completos, entre os dias 55 e 119.

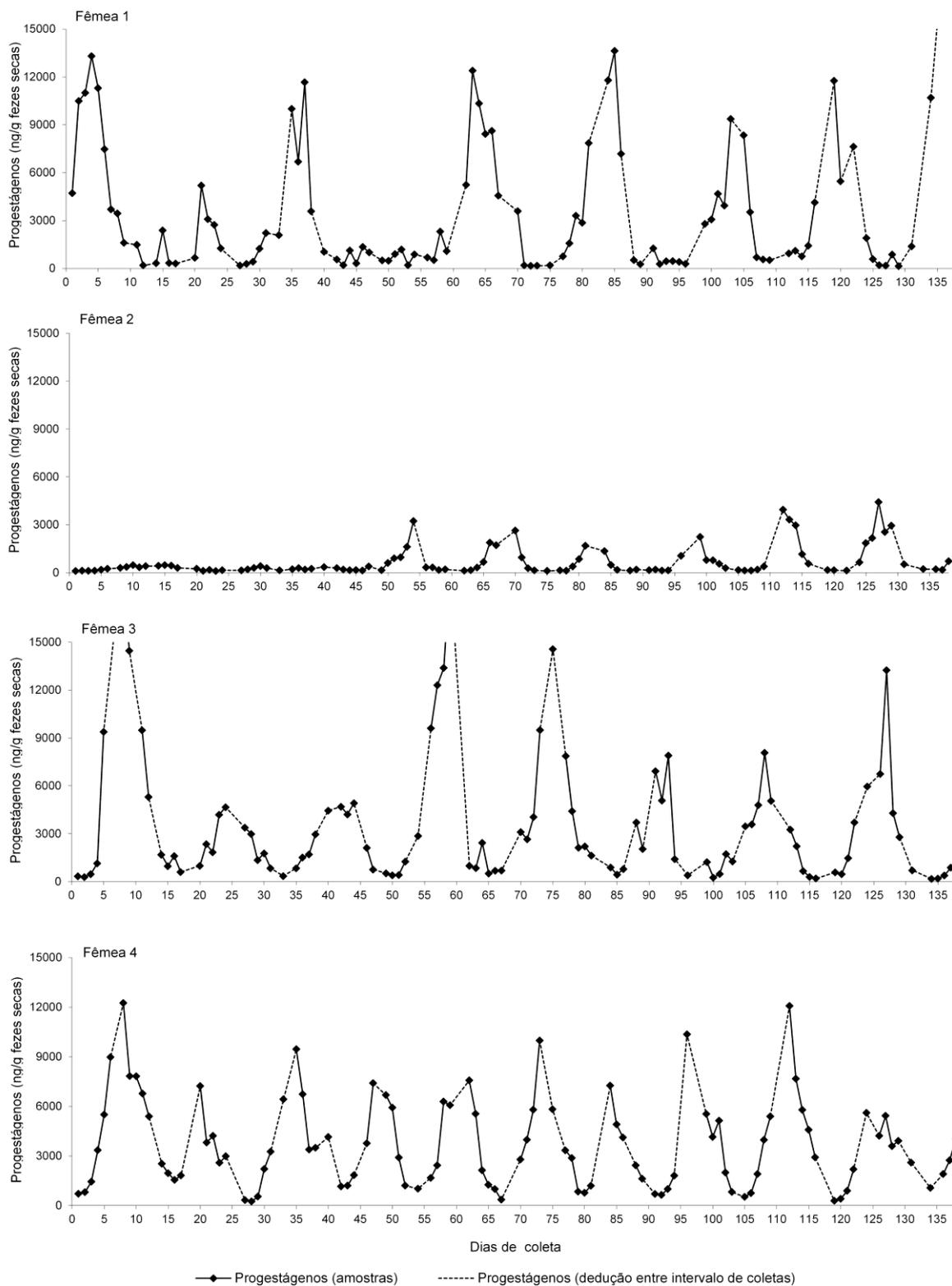


Figura 5: Perfis de progestinas fecais de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans* (Fêmeas 1, 2, 3, e 4) ao longo do período de estudo. As linhas em pontilhado indicam dias onde não houve coletas.

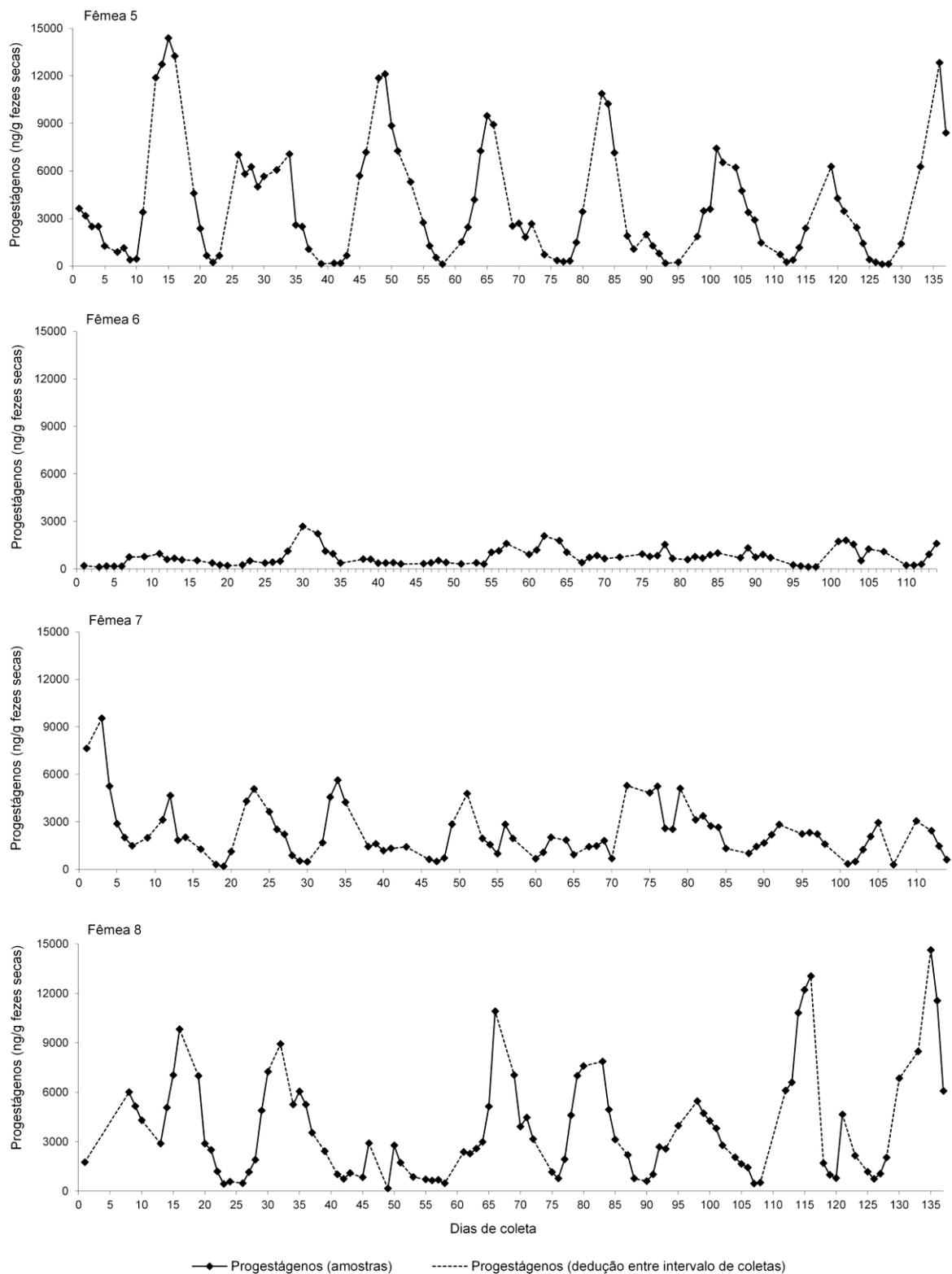


Figura 6: Perfis de progestinas fecais de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans* (Fêmeas 5, 6, 7, e 8) ao longo do período de estudo. As linhas em pontilhado indicam dias onde não houve coletas.

Considerando todas as fêmeas, foram observados 36 ciclos ao total. No entanto, o segundo ciclo de F1 apresentou fase interluteal de 20 dias, podendo ter englobado um pequeno período de aciclia (Tabela 9). Assim sendo este ciclo foi desconsiderado das análises.

Tabela 9: Descrição dos ciclos ovarianos observados nas sete fêmeas de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental que apresentaram ciclicidade ovariana.

Indivíduo	Número do Ciclo	Fase Interluteal	Fase Luteal	Duração do Ciclo Ovariano	Indivíduo	Número do Ciclo	Fase Interluteal	Fase Luteal	Duração do Ciclo Ovariano
F1	1	5	10	15	F4	4	4	10	14
	2*	20	11	31		5	3	8	11
	3	7	10	17		6	4	9	13
	4	10	9	19		7	4	11	15
	5	8	10	18		8	4	12	16
F2	1	6	9	15	F5	1	1	16	17
	2	6	7	13		2	4	15	19
	3	9	10	19		3	1	17	18
	4	4	10	14		4	4	14	18
	5	4	14	18		5	3	16	19
F3	1	5	11	16	F7	6	2	11	13
	2	5	16	21		1	2	9	12
	3	3	8	11		2	2	15	17
	4	7	12	19		1	4	15	19
	5	7	10	17		2	5	17	22
F4	1	4	12	16	F8	3	1	11	12
	2	2	8	10		4	3	16	19
	3	4	9	13		5	2	11	13

\* Ciclo em que a fase interluteal pode ter englobado período de aciclia.

Os 35 ciclos apresentaram duração média de  $16 \pm 0,52$  dias (mínimo: 10 dias; máximo: 22 dias; Figura 7). A fase interluteal durou em média  $4 \pm 0,37$  dias (mínimo: 1 dia; máximo: 10 dias) com valor médio de  $467,98 \pm 29,12$  ng/g de fezes secas. A fase luteal durou  $11 \pm 0,50$  dias (mínimo: 7 dias; máximo: 17 dias) com concentrações

médias de progestinas de  $4283,27 \pm 193,31$  ng/g de fezes secas. Os dados de cada fêmea estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Comprimento e concentrações de progestinas fecais de 35 ciclos ovarianos de sete fêmeas de *Alouatta clamitans* (média  $\pm$  erro padrão).

Indivíduo	Ciclos (n)	Duração das Fases do Ciclo Ovariano (dias)			Progestinas Fecais (ng/g de fezes secas)	
		Fase Interluteal	Fase Luteal	Ciclo Ovariano Completo	Fase Interluteal	Fase Luteal
F1	4	$7,5 \pm 1,04$	$10 \pm 0,25$	$17,5 \pm 0,85$	$490,34 \pm 66,47$	$5687,80 \pm 718,93$
F2	5	$6 \pm 0,92$	$10 \pm 1,14$	$15 \pm 1,16$	$147,58 \pm 5,71$	$1448,53 \pm 204,85$
F3	5	$5 \pm 0,75$	$11 \pm 1,33$	$17 \pm 1,69$	$539,58 \pm 45,69$	$5404,68 \pm 696,98$
F4	8	$4 \pm 0,26$	$9,5 \pm 0,58$	$13,5 \pm 0,78$	$778,03 \pm 70,26$	$4722,95 \pm 324,58$
F5	6	$2,5 \pm 0,56$	$15,5 \pm 0,87$	$18 \pm 0,92$	$233,91 \pm 24,05$	$4283,69 \pm 394,03$
F7	2	2	$12 \pm 3$	$14 \pm 3$	$376,65 \pm 77,08$	$2680,39 \pm 404,19$
F8	5	$3 \pm 0,71$	$15 \pm 1,26$	$19 \pm 1,92$	$597,06 \pm 35,27$	$4506,35 \pm 427,97$
Média	35	$4 \pm 0,37$	$11 \pm 0,50$	$16 \pm 0,52$	$467,98 \pm 29,12$	$4283,27 \pm 193,31$

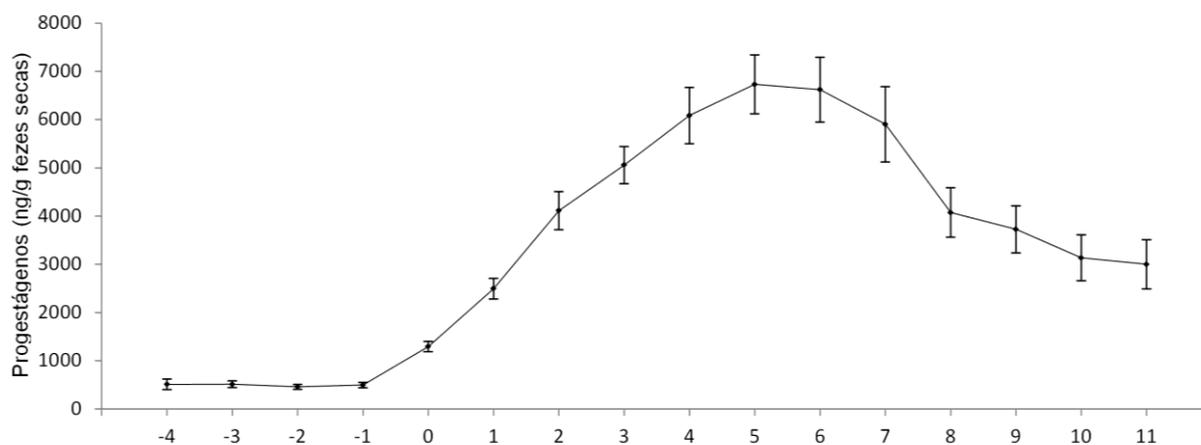


Figura 7: Representação gráfica da média do ciclo ovariano de *Alouatta clamitans* (média  $\pm$  erro padrão). Normalizado de acordo com o Dia 0, que representa o início da fase luteal.

## **4.2 Comunicação Sexual**

### **4.2.1 Potencial Fisiológico dos Machos:**

Foram analisadas sete amostras de cada um dos sete machos adultos integrantes do estudo e também do MJ. Apesar de se observar uma média mínima dos machos adultos com valores absolutos que quase dobram a média do juvenil, próximas de 2000 ng/g (Tabela 11), a análise de variância revelou que as amostras do MJ somente diferiram das amostras de MA1 e MA2 (MJ e MA1:  $Q=4,49$ ,  $p<0,05$ ; MJ e MA2:  $Q=6,27$ ,  $p<0,01$ ). Entre os adultos somente MA2 teve níveis significativamente maiores que os de MA5 e MA6 ( $F=3,68$ ,  $p<0,01$ ; MA2 e MA5:  $Q=4,54$ ,  $p<0,05$ ; MA2 e MA6:  $Q=4,57$ ,  $p<0,05$ ).

Contudo, o macho adulto com a segunda menor média de concentrações de metabólitos de andrógenos (MA5) foi um dos mais ativos sexualmente. Além disso, o juvenil apresentou estar em fase de transição, sendo que ao final do estudo aparentava o início do desenvolvimento de características subadulto, como o aumento da barba, início do desenvolvimento da cor rubra e a exibição de comportamentos sexuais.

Assim sendo, os dados comportamentais de todos os machos adultos foram considerados válidos.

### **4.2.2 Comportamentos Sexuais, Afiliativos e Outras Atividades Motoras:**

Cada grupo foi observado por 60 horas, totalizando 240 horas de registro para todas as ocorrências. O número de eventos obtidos em cada categoria comportamental para machos e fêmeas se encontra nas tabelas 12 e 13 respectivamente.

Tabela 11: Concentrações de metabólitos de andrógenos fecais (média  $\pm$  erro padrão de ng/g de fezes secas) dos sete machos adultos e do macho juvenil de *Alouatta clamitans* utilizados neste estudo.

	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7	MJ
Amostra 01	1144,61	6684,45	1981,96	1004,35	2589,51	2130,51	1396,02	1271,42
Amostra 02	1100,59	7991,95	1792,96	1380,48	1724,59	1642,49	473,50	871,20
Amostra 03	2464,42	3492,23	3777,16	807,73	1696,78	1583,49	1235,75	580,21
Amostra 04	5496,08	3569,28	4423,53	5470,37	2246,11	1539,07	2423,67	624,25
Amostra 05	4437,96	3962,61	2551,84	5191,69	2012,65	1390,36	4791,67	881,88
Amostra 06	4615,46	2870,43	2608,04	1539,07	1442,16	2348,82	2738,19	1351,35
Amostra 07	5148,34	2486,81	2507,75	4574,68	2273,67	3251,43	3119,67	1940,35
Média Individual	3486,78	4436,82	2806,18	2852,62	1997,93	1983,74	2311,21	1074,38
Erro Padrão	710,49	784,02	360,48	798,50	151,35	181,96	248,25	392,16
Média dos adultos 2839,33 $\pm$ 233,30								

Tabela 12: Números de ocorrências de cada categoria comportamental de “outras atividades motoras” emitidas pelos machos de *Alouatta clamitans* em cada grupo.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 5	Total
Esfregação Hiomandibular	217	202	22	3	444
Esfregação de Anogenital	30	12	78	30	150
Esfregação de Costas	16	26	54	20	116
Outras Esfregações	0	2	0	0	2
Morder/Lamber Substrato	2	18	8	5	33
Total	265	260	162	58	745

A proceptividade dominou a atividade sexual das fêmeas. Entre os dias com atividade sexual (ASX) todas as fêmeas (exceto F1) apresentaram mais dias com exclusividade de atividade proceptiva em relação à atrativa. Considerando os dias onde ambos os tipos de atividades foram observados o predomínio da proceptividade também ocorreu na maioria dos dias, excetuando-se F1 novamente (Tabela 14).

Tabela 13: Números de ocorrências referentes a cada categoria comportamental de interações e outras atividades motoras realizadas por seis fêmeas de *Alouatta clamitans*.

	F1	F2	F3	F4	F6	F7	Total
Comportamentos de Atratividade	13	77	88	66	3	19	266
Comportamentos de Proceptividade	15	140	186	51	14	103	509
Afliativos recebidos de machos	7	8	40	7	8	1	71
Afliativos emitidos para machos	16	27	31	24	12	2	112
Tempo próximo à machos*	0,3	0,2	3,1	0,2	0,2	0,1	0
Sexuais recebidos de fêmeas	23	12	-	-	10	12	57
Sexuais emitidos para fêmeas	12	23	-	-	12	10	57
Afliativos recebidos de fêmeas	331	233	-	-	729	1632	2925
Afliativos emitidos para fêmeas	233	311	-	-	1632	729	2905
Tempo próximo à fêmeas	36,3	36,3	-	-	25,2	25,2	0
Autocatação	164	17	182	243	488	237	1331
Coceira	1160	1615	1557	1089	1101	1301	7823
Esfregação Hiomandibular	1	4	3	15	0	7	30
Esfregação de Anogenital	73	84	102	165	111	48	583
Esfregação de Costas	19	18	72	32	40	38	219
Outras Esfregações	0	0	0	0	0	0	0
Morder/Lamber Substrato	9	9	4	6	77	77	182
Masturbação**	4	3	1	3	0	1	12

\*Tempo em horas; \*\* Dias com ocorrência

Tabela 14: Atividade sexual e a relação entre a atratividade e a proceptividade (dias de amostragem) nas seis fêmeas de *Alouatta clamitans* integrantes do grupo experimental.

	Dias de Amostragem	Atividade sexual	Exclusividade de atratividade	Exclusividade de proceptividade	Predomínio de atratividade	Predomínio de proceptividade
F1	71	8	5	0	5	2
F2	71	26	5	9	6	20
F3	70	26	3	4	7	17
F4	72	14	2	3	5	9
F6	72	3	0	1	0	2
F7	72	15	0	10	0	15

Apesar da diferença entre o número de eventos de catação entre as díades, observou-se resultados semelhantes entre as díades. A F2 foi dominante sobre F1, que emitiu 62% das catações, e F7 foi dominante sobre F6, que foi responsável por emitir 68% das catações.

### 4.2.3 Caracterização Comportamental do Ciclo Ovariano:

O comportamento sexual ocorreu em ambas as fases, luteal e interluteal, e também em ambos os períodos, periovulatório (PPO) e não-periovulatórios (PNPO) dos ciclos ovarianos. É possível observar que entre as fêmeas com ciclicidade contínua (fêmeas 1,2,3 e 4) a atividade sexual em F1 foi a menor, e somente em F2 e F3 foi observada atividade sexual em todos os ciclos (Figuras 8 e 9).

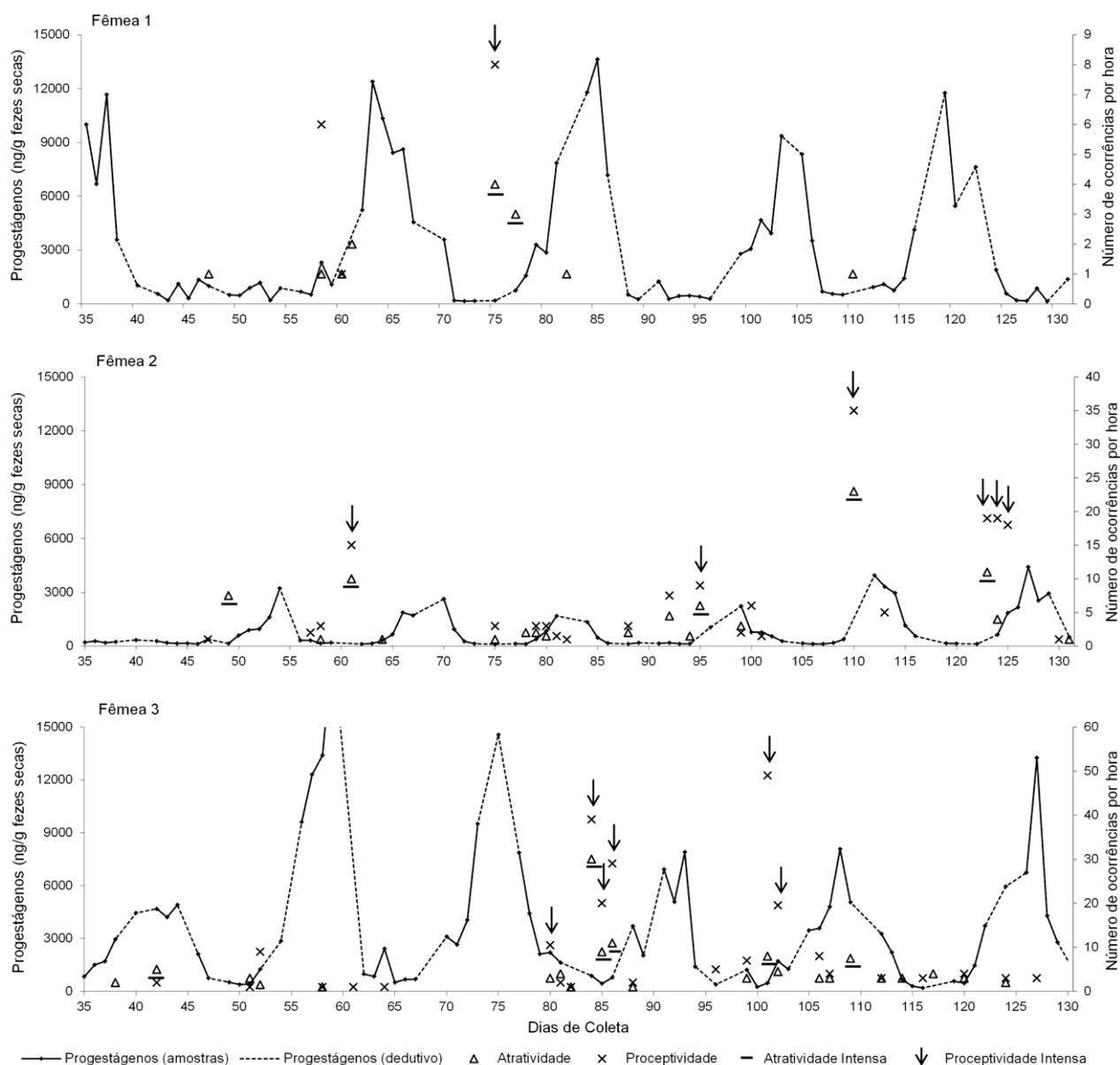


Figura 8: Distribuição e frequência/hora de ocorrências dos comportamentos sexuais (divididos em relação à atratividade e proceptividade) sobrepostos aos perfis de progesterinas fecais em três fêmeas de *Alouatta clamitans* (fêmeas 1,2 e 3).

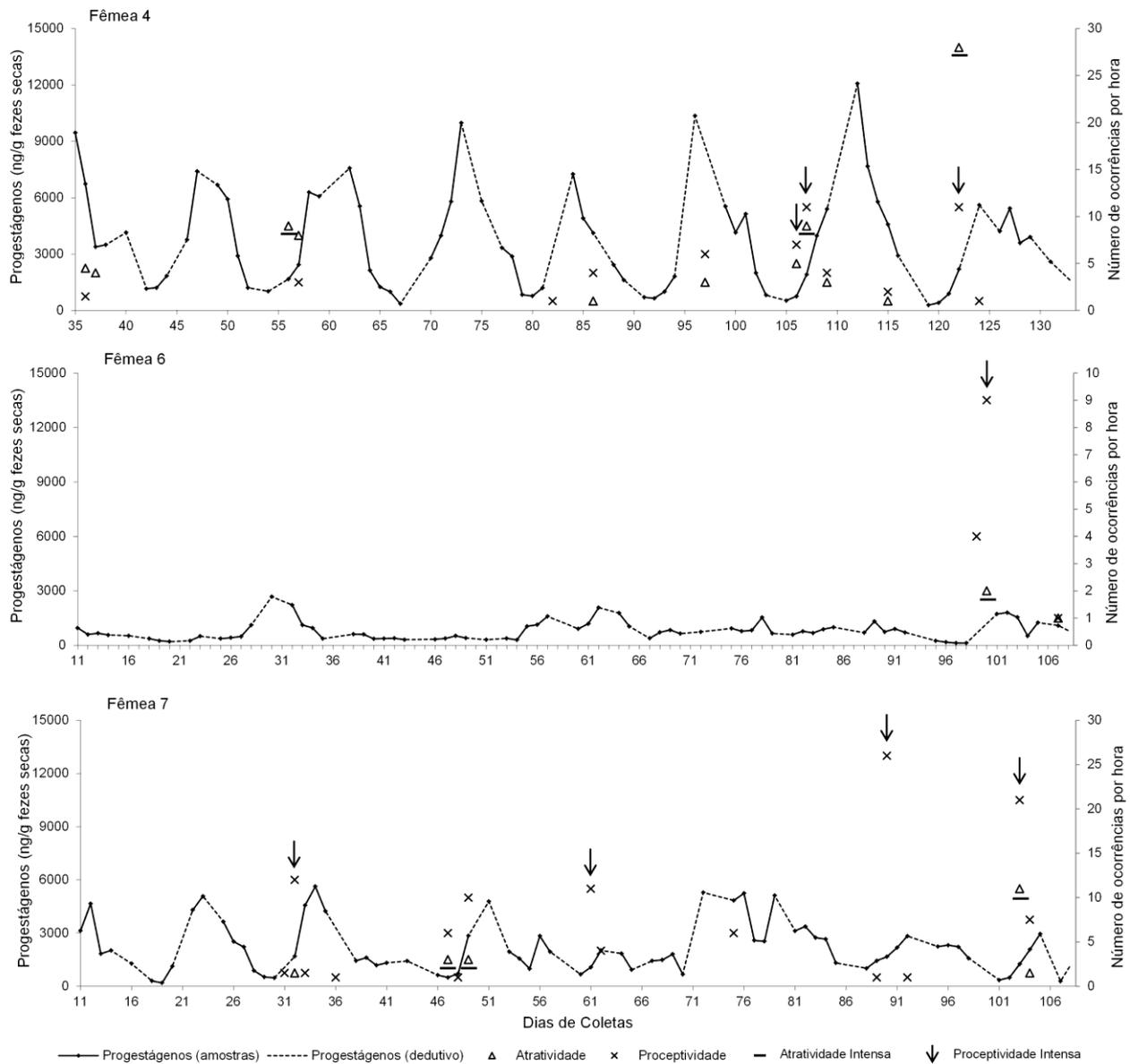


Figura 9: Distribuição e frequência/hora de ocorrências dos comportamentos sexuais (divididos em relação à atratividade e proceptividade) sobrepostos aos perfis de progestinas fecais em três fêmeas de *Alouatta clamitans* (fêmeas 4,6 e 7).

O perfil hormonal de F2, de baixos níveis de progestinas fecais, pareceu não ser um fator limitante para a manifestação de atividade sexual, já que juntamente com F3, foram as fêmeas que apresentaram maior frequência deste tipo de comportamento. Por outro lado, F6 que também apresentou concentrações hormonais baixas, assim como

ausência de ciclicidade bem definida, apresentou a menor atividade sexual e somente manifestada durante o final do estudo.

Para a comparação dos dados comportamentais com os perfis de progesterona foram utilizados todos os ciclos completos compreendidos dentro do período de amostragem comportamental (n=21 de cinco fêmeas: F1, F2, F3, F4 e F7; Tabela 15).

As fases luteais e interluteais não se diferenciaram em relação à atividade sexual. Em relação à PPO e PNPO, o primeiro se distinguiu pelas ocorrências mais frequentes de comportamentos sexuais, (tanto os relativos à atratividade como os relacionados à proceptividade;  $Z=3$ ,  $p<0,01$  para ambos), a recepção de comportamentos sociais emitidos pelos machos e a masturbação realizada pelas fêmeas ( $Z=2$ ,  $p<0,05$ ;  $Z=2,37$ ,  $p<0,02$  respectivamente; Figura 10).

A despeito da ocorrência de atividade sexual apresentar distribuição esparsa ao longo dos ciclos, a diferença entre os PPO e PNPO, é que os dias de atividade sexual considerada “intensa”, atratividade intensa (AI) e proceptividade intensa (PI), se concentraram nos PPO's, fato que não é observado com a atividade sexual “não intensa”, como evidenciam as Figuras 8 e 9.

Tabela 15: Esforço amostral do comportamento de cinco fêmeas de *Alouatta clamitans* durante os ciclos ovarianos (n=21) utilizados para a análise comportamental entre as fases luteais e interluteais e entre os períodos periovulatórios e não-periovulatórios.

	Ciclos (n)	Fase Interluteal e Luteal		Período Periovulatório e Não-periovulatório	
		Dias	Horas	Dias	Horas
F1	4	59	50,6	59	50,6
F2	5	48	48	48	48
F3	4	51	43	51	43
F4	6	61	50,3	60	50
F7	2	18	13,3	19	14,3

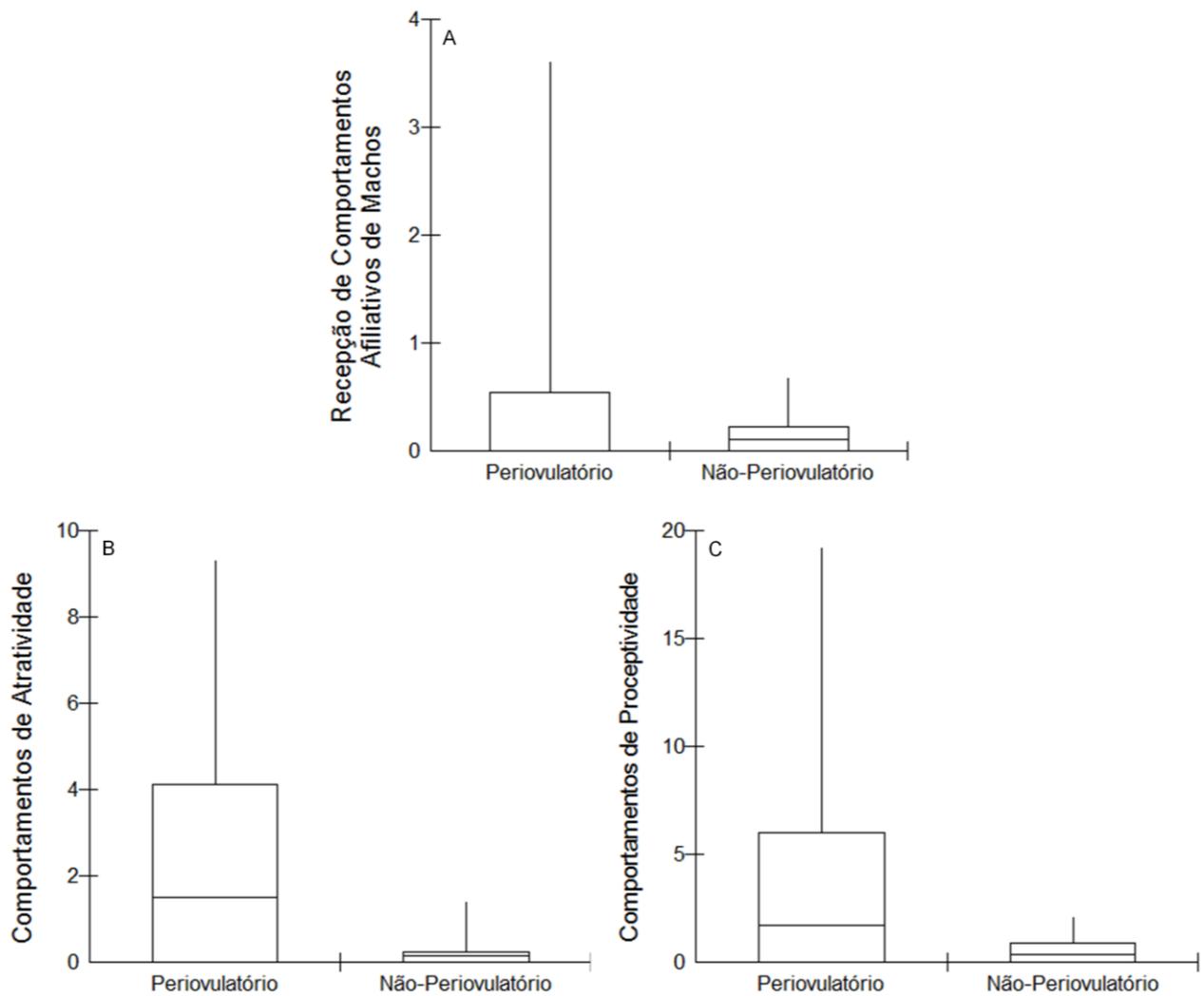


Figura 10: Diferenças ( $p < 0,05$ ) comportamentais encontradas entre os períodos periovatórios e não-periovatórios de cinco fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em frequência relativa por hora de amostragem.

#### 4.2.4 Alerta Comportamental da Ovulação: Intensidade da Atividade Sexual

Quanto aos comportamentos proceptivos, há uma diferenciação clara onde a proceptividade não-intensa (PNI) ocorreu mais durante os PNPO's ( $Z=2,40$ ,  $p < 0,02$ ) e a PI nos PPO's ( $Z=2,40$ ,  $p < 0,02$ ; Figura 11).

Esta mesma divisão não ocorreu em relação aos comportamentos de atratividade, onde somente AI se concentrou nos PPO's ( $Z=2,67$ ,  $p<0,01$ ) enquanto a atratividade não-intensa (ANI) ocorreu de maneira indistinta ( $Z=0,91$ ,  $p=0,36$ ; Figura 12).

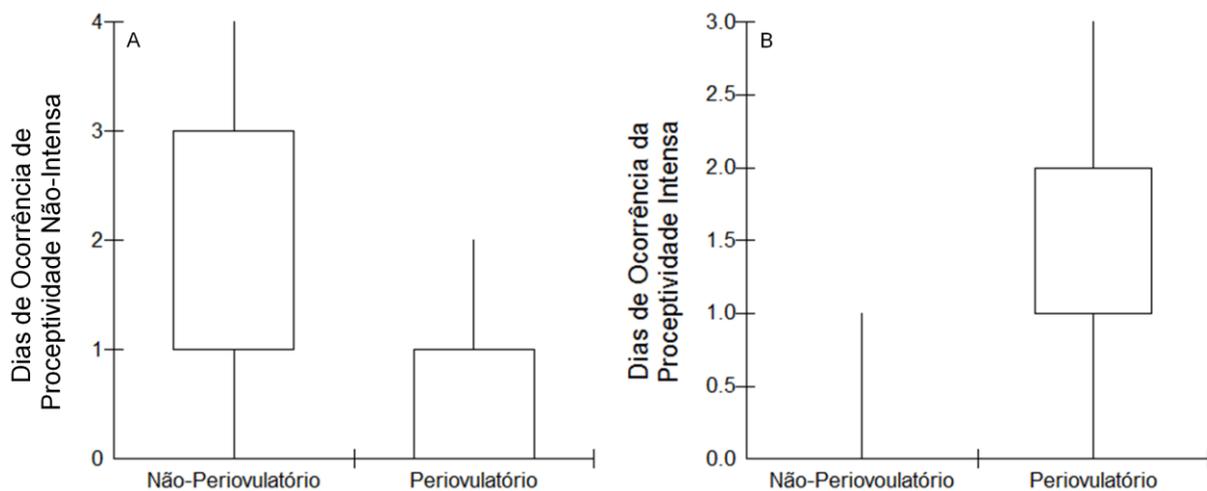


Figura 11: Diferenças ( $p<0,05$ ) na proceptividade entre os períodos perioovulatórios e não-perioovulatórios de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em dias de ocorrência.

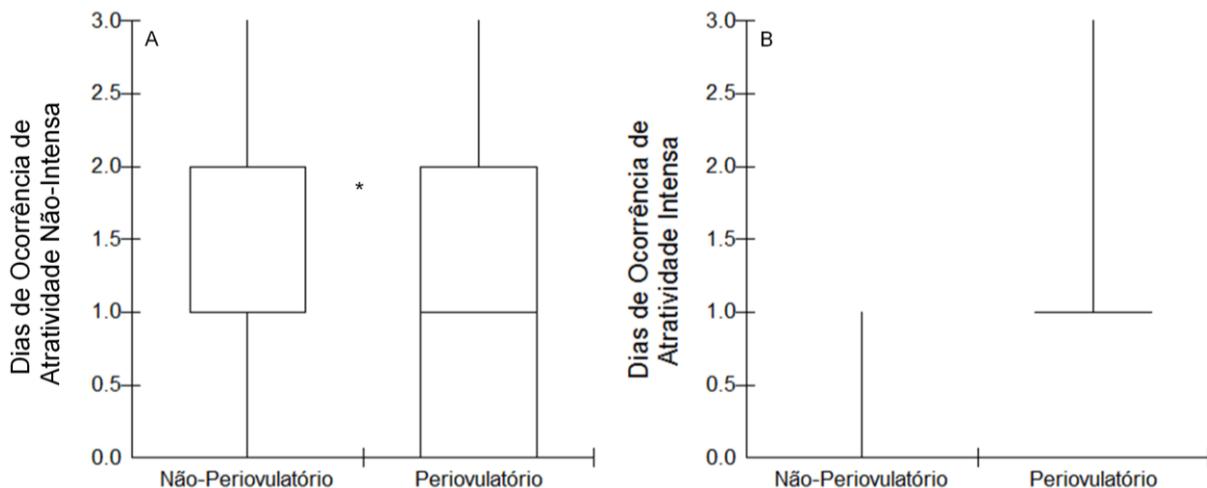


Figura 12: Diferenças ( $p<0,05$ ) na atratividade entre os períodos perioovulatórios e não-perioovulatórios de quatro fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em dias de ocorrência

\* sem diferença estatística ( $p>0,05$ ).

Esta ocorrência praticamente exclusiva de atividade sexual intensa nos PPO's corrobora comportamentalmente o evento fisiológico ligado ao período, o que não ocorreu com a atividade sexual não-intensa (F6 e F7 foram excluídas desta análise por não apresentarem o perfil de ciclicidade contínua bem definida).

Entre os períodos de ANI e AI nenhum comportamento apresentou diferença, inclusive os comportamentos proceptivos. Já nos períodos de PI, somente os comportamentos referentes à atratividade das fêmeas foram mais frequentes do que no período de PNI ( $Z=2,20$ ,  $p<0,03$ ) (Figura 13).

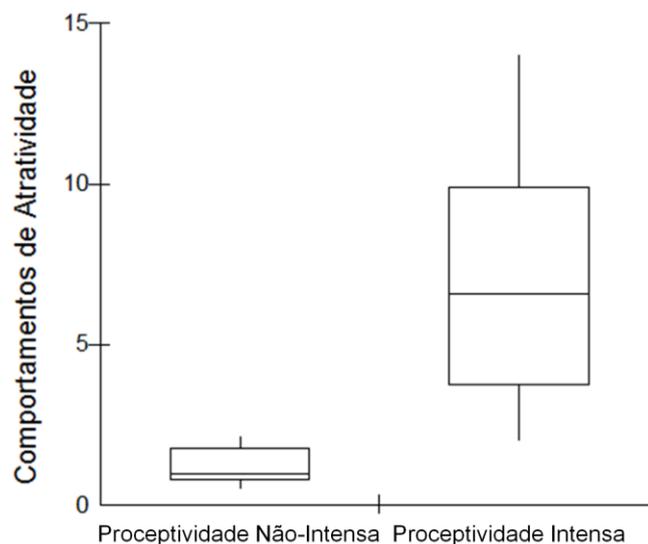


Figura 13: Diferenças ( $p<0,05$ ) na atratividade das fêmeas encontradas entre os períodos de proceptividade não-intensa e proceptividade intensa. Dados em frequência relativa por hora de amostragem.

Os dias de AI demonstraram maior ocorrência de comportamentos sexuais proceptivos ( $Z=2,20$ ,  $p<0,03$ ) enquanto que o comportamento de morder/lamber o substrato foi emitido pelos machos apenas nos dias de ANI ( $Z=2,20$ ,  $p<0,03$ ; Figura 14).

Os dias com PI também apresentaram maior ocorrência de comportamentos atrativos ( $Z=2$ ,  $p<0,03$ ), porém a autocatção ocorreu maior frequência nos dias de PNI ( $Z=2$ ,  $p<0,03$ ; Figura 15).

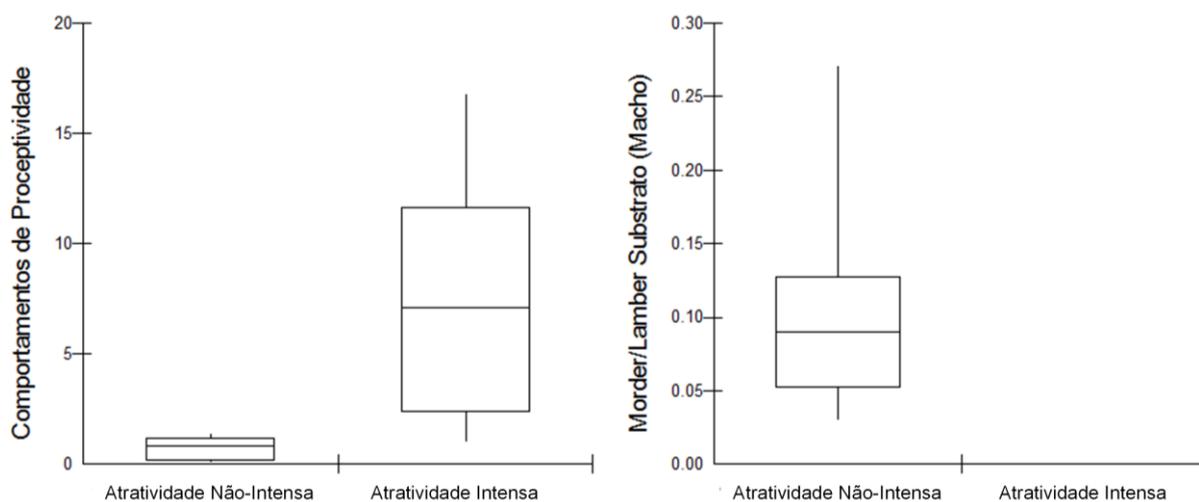


Figura 14: Diferença ( $p<0,05$ ) entre os dias de atratividade não-intensa e intensa amostrados de de seis fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em dias de ocorrência.

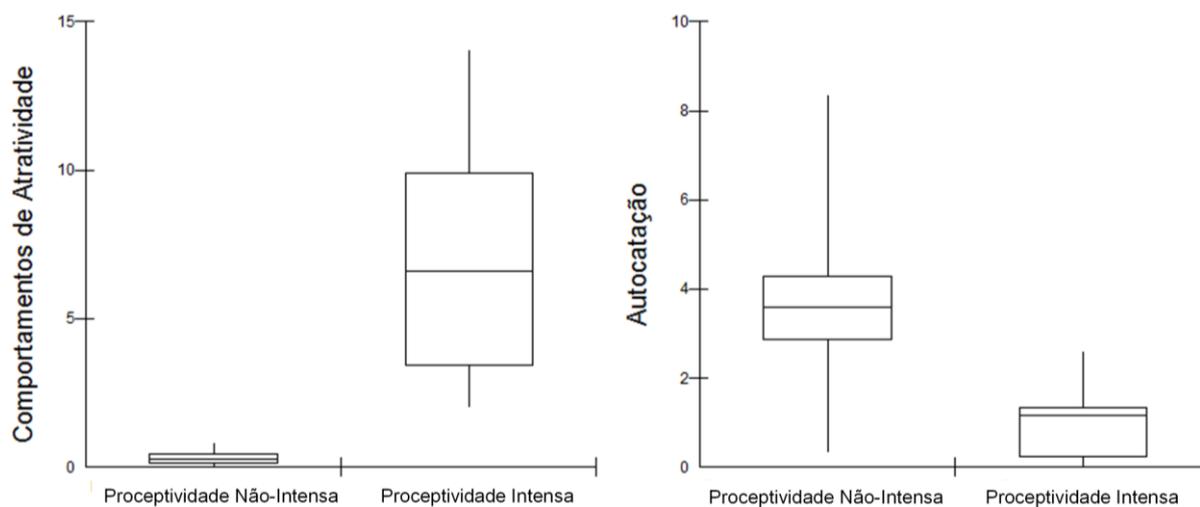


Figura 15: Diferença ( $p<0,05$ ) entre os dias de proceptividade não-intensa e intensa os outros dias amostrados de seis fêmeas de *Alouatta clamitans*. Dados em frequência relativa por hora de amostragem.

#### 4.2.5 Atividade Sexual e sua Influência Sobre os Comportamentos Sociais Afiliativos e Outras Atividades Motoras:

Entre os dias de atividade sexual (ASX) e inatividade sexual (ISX), os comportamentos que mais ocorreram nos períodos de ASX foram os afiliativos emitidos para machos e recebidos deles ( $Z=1,99$ ,  $p<0,05$  para ambos) e esfregação da região hiomandibular, tanto de fêmeas ( $Z=2,02$ ,  $p<0,05$ ) como de machos ( $Z=1,99$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 16). O único padrão de correlação observado para todas as fêmeas com valores acima de 58% foi entre os próprios comportamentos de atratividade e proceptividade (Tabela 16).

Tabela 16: Correlações encontradas entre os comportamentos atrativos e proceptivos em relação a outras categorias comportamentais e entre eles próprios para as seis fêmeas de *Alouatta clamitans*.

	Atratividade											
	F1		F2		F3		F4		F6		F7	
	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p
Recepção de comportamentos afiliativos (machos)	0,06	0,64	0,21	0,08	0,44	0,01	0,24	0,04	0,34	0,01	0,32	0,79
Esfregação hiomandibular (Fêmea)	0,37	0,01	0,02	0,88	0,25	0,03	-0,12	0,03	-	-	0,20	0,10
Esfregação hiomandibular (Macho)	0,39	0,01	0,03	0,81	0,36	0,01	0,16	0,19	-0,03	0,81	0,29	0,15
Tempo em proximidade à machos	0,15	0,21	0,08	0,53	0,28	0,02	0,13	0,29	0,55	0,01	0,05	0,70
Cocceira	0,05	0,69	0,14	0,24	0,16	0,20	0,09	0,47	-0,08	0,50	0,25	0,04
	Proceptividade											
	F1		F2		F3		F4		F6		F7	
	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p
Recepção de comportamentos afiliativos	-0,06	0,60	0,17	0,15	0,39	0,01	0,35	0,01	0,26	0,03	0,06	0,61
Emissão de comportamentos afiliativos	0,07	0,55	0,17	0,17	0,33	0,01	0,12	0,30	0,36	0,01	0,08	0,47
Esfregação hiomandibular (Fêmea)	0,59	0,01	0,18	0,13	0,19	0,12	0,01	0,94	-	-	0,19	0,11
Esfregação hiomandibular (Macho)	0,16	0,19	0,12	0,32	0,25	0,04	0,16	0,19	0,04	0,77	0,38	0,01
Tempo em proximidade à machos	-0,08	0,51	0,03	0,80	0,44	0,01	0,21	0,08	0,43	0,01	0,09	0,47
Morder/Lamber substrato (machos)	-0,04	0,77	0,09	0,45	0,04	0,73	0,12	0,31	0,31	0,01	0,11	0,38
	Atratividade X Proceptividade											
	F1		F2		F3		F4		F6		F7	
	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p	Rs	p
	0,59	0,01	0,60	0,01	0,79	0,01	0,77	0,01	0,81	0,01	0,59	0,01

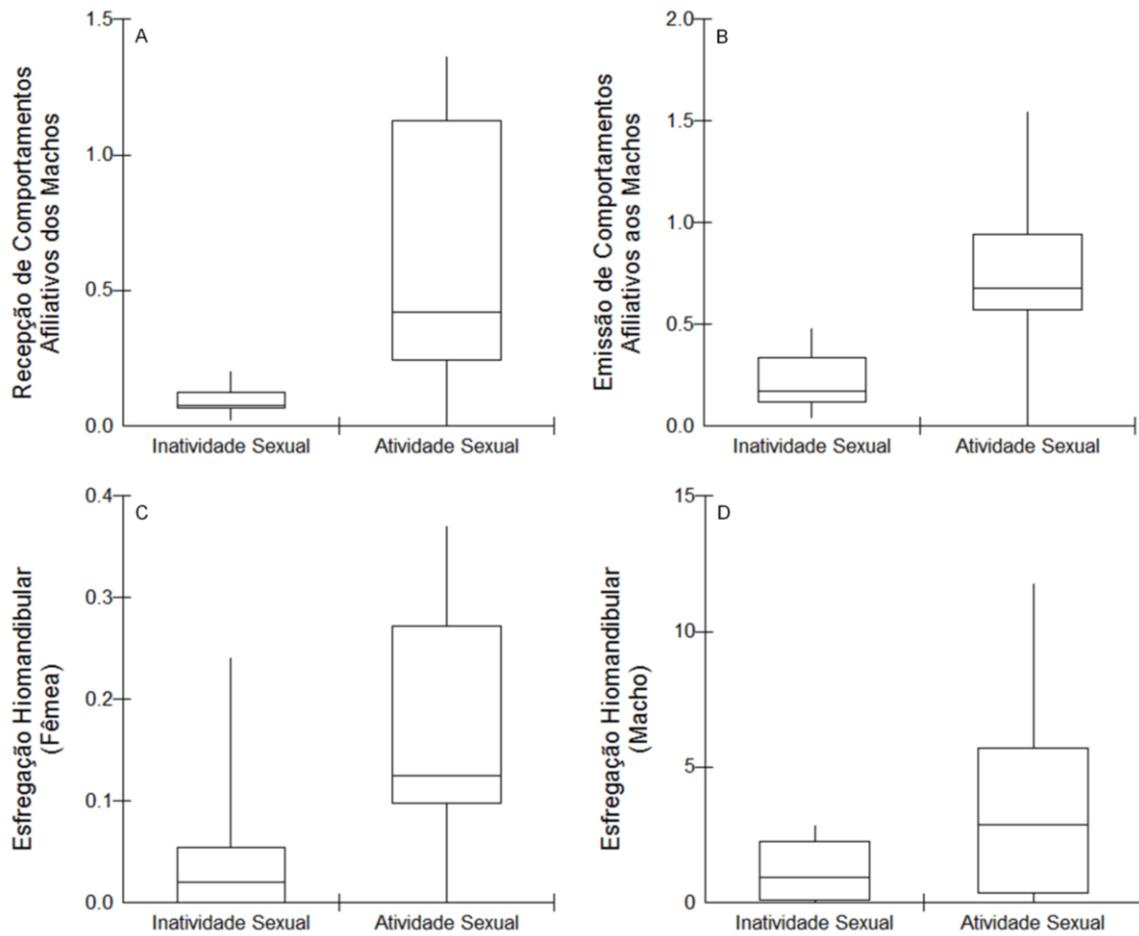


Figura 16: Diferenças ( $p < 0,05$ ) encontradas entre os períodos de atividade sexual e inatividade sexual. Dados em frequência relativa por hora de amostragem.

## 5. Discussão

A dosagem de progestinas fecais através do enzimoimunoensaio demonstrou a ciclicidade ovariana em sete das oito fêmeas estudadas, mostrando-se um método confiável para esta finalidade. Metabólitos fecais já foram dosados por este método em *Alouatta pigra* de vida livre (Van Belle *et al.* 2009) e através de radioimunoensaio em *A. caraya* cativos (Kugelmeier *et al.* 2011). Em ambos os casos a despeito da disponibilidade dos perfis de estrógenos, os perfis de progestinas foram considerados mais confiáveis para acessar a ciclicidade ovariana e o provável dia de ovulação.

Em outras espécies de primatas os perfis de progestinas também demonstraram eficiência e estabilidade ao serem utilizados para avaliar a atividade ovariana. Os metabólitos fecais de estrógenos e progestinas, também evidenciaram a atividade cíclica em *Macaca fuscata*, entretanto, o aumento no perfil de estrógenos não foi observado em todos os ciclos de progestinas (O'Neill *et al.* 2004). Atsalis *et al.* (2004) utilizaram progestinas e estrógenos fecais para acessar o ciclo ovariano em *Gorilla gorilla*, contudo verificaram grande variabilidade do perfil de estrógenos e atribuíram isso a possível ineficácia do ensaio utilizado na detecção destes metabólitos. Heistermann & Hodges (1995) encontraram resultados semelhantes em *Saguinus fuscicollis* utilizando metabólitos urinários, mas atribuíram a variabilidade nos estrógenos a uma possível interferência de produção adrenal, devido aos procedimentos de contenção.

Em *Callithrix jacchus*, utilizando hormônios circulantes, a progesterona foi utilizada confiavelmente na definição do ciclo e para estimar o dia da ovulação (Kendrick & Dixson 1983). Desta forma observa-se que o ciclo ovariano é avaliado de maneira segura utilizando apenas os perfis cíclicos da progesterona e seus metabólitos.

A grande amplitude nos níveis de progestinas fecais encontradas é a maior descrita para o gênero (mínimo: 92,72, máximo: 20.859,81). Para *A. caraya* os níveis destes metabólitos não ultrapassaram os 4500 ng/g (Kugelmeier *et al.* 2011), e em *A. pigra* estes não chegaram aos 2000 ng/g (Van Belle *et al.* 2009). Em ambos os casos os metabólitos foram extraídos de amostras úmidas de fezes, enquanto neste estudo as amostras foram secas, o que pode ter aumentado a concentração hormonal.

Para descrição do ciclo ovariano, excluiu-se o segundo ciclo observado em F1. Apesar da clareza do padrão cíclico observado (Figura 7), a fase interluteal deste ciclo teve comprimento de 20 dias, muito superior a todos os demais observados nas sete fêmeas. Em sua revisão, Baird *et al.* (1975) demonstraram que o tempo de desenvolvimento e maturação folicular varia entre 10 e 17 dias em diversas espécies de mamíferos, inclusive em primatas. Desta maneira é provável que a fase interluteal deste ciclo tenha englobado um período de aciclia.

O comprimento médio do ciclo ovariano de  $16 \pm 0,52$  dias é o menor descrito para o gênero, contudo se assemelha aos dados disponíveis para outras espécies de bugios utilizando metabólitos fecais de esteroides sexuais (*A. caraya*:  $19,11 \pm 2,14$  dias, Kugelmeier *et al.* 2011; *A. pigra*:  $18,3 \pm 1,4$  dias, Van Belle *et al.* 2009).

Estes resultados também vão de encontro a descrições de ciclos ovarianos para o gênero utilizando outros métodos, como a citologia vaginal (*A. caraya*:  $19,7 \pm 1$  dias, Colillas & Coppo 1978 *apud* Kugelmeier 2011;  $19,8 \pm 0,9$  dias, Kugelmeier *et al.* 2011) a observação de cópulas (*A. seniculus*: 17 dias, Crockett & Sekulic 1982) e o comportamento sexual aliado à mudanças morfológicas genitais (*A. palliata*:  $16,3 \pm 0,7$  dias, Glander 1980). O único dado realmente discrepante do conjunto apresentado acima para o gênero foi descrito por Herrick *et al.* (2000) que com o uso dos

metabólitos urinários obtiveram uma média do ciclo ovariano de  $29,5 \pm 0,5$  dias para *A. seniculus*.

Por outro lado, se considerarmos as fases do ciclo, diferenças emergem. Neste estudo a fase interluteal ( $4 \pm 0,37$  dias) foi bem menor que a fase luteal ( $11 \pm 0,50$  dias). Para *A. caraya*, Kugelmeier *et al.* (2011) encontraram uma fase folicular de ( $9,83 \pm 2,21$  dias) semelhante à fase luteal ( $9,47 \pm 0,72$  dias). Nota-se que justamente a fase folicular (correspondente à interluteal pelo método empregado) encontrada pelos autores é a que apresenta maior variabilidade em relação à média, demonstrada pelo erro padrão e pela variação dos dados (comprimento de 4 dias no mínimo e 39 dias no máximo), o que pode ter superestimado o comprimento da fase folicular.

Em contrapartida, o método empregado na presente pesquisa, ao ligar graficamente os pontos entre intervalos de coleta, pode ter subestimado a estimativa do comprimento nas fases interluteais. Dos 11 ciclos onde as fases interluteais foram curtas (< de 4 dias; Tabela 12), em nove deles o intervalo de coletas ocorreu durante a fase interluteal (Figuras 7 e 8). Desta forma os pontos deduzidos poderiam estar no nível basal das fêmeas, o que aumentaria a estimativa de comprimento da fase interluteal.

Mesmo se este for o caso, se estes 11 ciclos fossem excluídos do cálculo das médias, os valores não se alterariam drasticamente (dados não publicados: comprimento de ciclo de  $17 \pm 0,53$  dias; fase interluteal de  $5 \pm 0,38$  dias e luteal de  $10 \pm 0,54$  dias).

Diversos estudos demonstram que a fase folicular é curta em primatas neotropicais quando comparados aos primatas do velho mundo (Carosi *et al.* 1999: *Cebus apela*, Dixson 1983: *Aotus trivirgatus*, De Vleeschouwer *et al.* 2000: *Leontopithecus chrysomelas*, Heistermann & Hodges 1995: *Saguinus fuscicollis*, Kendrick & Dixson 1983: *Callithrix jacchus*), podendo durar apenas dois dias em

fêmeas cativas de *Ateles geoffroyi* (Campbell *et al.* 2001). Esta curta duração pode significar que a maturação dos folículos (que varia entre 10 a 17 dias em diversos mamíferos, inclusive em primatas do velho mundo) ocorre ao longo de toda a fase luteal. Dessa forma o intervalo entre o final de uma fase luteal para o início da próxima pode representar apenas as etapas finais de maturação do folículo dominante (revisado por Baird *et al.* 1975).

As fêmeas 2, 6 e 7 apresentaram níveis absolutos baixos de progesteronas em relação às outras fêmeas estudadas. Uma das razões para isto poderia ser uma falha metodológica devido à variabilidade diurna na excreção dos metabólitos. Sousa & Ziegler (1998) demonstraram a existência de variabilidade na excreção de progesteronas fecais ao longo do dia em *Callithrix jacchus*, onde são observados picos de excreção durante a manhã, que decrescem no período vespertino.

Nenhum estudo desta natureza foi realizado com espécies da família Atelidae, contudo este viés é descartado para os resultados apresentados devido à padronização de coleta das amostras, sempre executadas ao amanhecer.

Wasser *et al.* (1993) demonstraram que a dieta rica em fibras pode ter efeitos negativos na excreção de progesteronas, no entanto a dieta entre os animais mantidos no CEPESBI é padronizada e apesar da preferência individual por determinados itens alimentares ser evidente, é pouco provável que isto explique os baixos níveis de progesteronas encontrados para estas fêmeas durante todo o estudo.

Fatores ambientais entre a fase de desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual podem ser determinantes para os níveis de progesteronas durante a fase adulta. Mulheres sem acesso a boas condições sanitárias, assistência à saúde, recursos alimentares estáveis e com grande estresse físico entre o nascimento e a menarca

possuem níveis de progestinas salivares inferiores ao de mulheres em condições opostas (Ellison 1996, Núñez-de La Mora *et al.* 2007).

Tanto F2 como F7 chegaram adultas ao CEPESBI, e não se pode descartar a ideia de que seu desenvolvimento juvenil possa ter ocorrido em situações precárias. A F2 foi recebida ao ser vítima de eletrocussão na rede elétrica no município de Blumenau e F7 foi resgatada pela Polícia Ambiental em cativeiro clandestino. Apesar da hipótese de variação individual não poder ser descartada, a análise dos efeitos originados destes traumas é inviável atualmente. Além disso, as fêmeas utilizadas na pesquisa se encontram no CEPESBI justamente por terem em comum a ocorrência de alguma situação traumática.

A senilidade pode alterar a atividade ovariana e conseqüentemente os níveis hormonais (Heistermann *et al.* 2005, Helvacioğlu *et al.* 1994, Hernández-López *et al.* 2010). Em *Saimiri boliviensis boliviensis* os níveis de progesterona circulantes foram inferiores em fêmeas senis (Helvacioğlu *et al.* 1994), e em *Macaca silenus*, além dos níveis de progestinas fecais serem inferiores em fêmeas senis, estas também apresentaram ciclos irregulares (Heistermann *et al.* 2005).

Esta possibilidade não é viável para F6, pois esta chegou juvenil ao CEPESBI, sendo com certeza uma adulta jovem. Já F2 e F7, eram adultas quando foram recebidas, e sua idade mínima estimada é de >6 e >11 anos, respectivamente. Contudo, em *Ateles geoffroyi* a diferença encontrada entre fêmeas adultas e senis foi a irregularidade dos ciclos e os baixos níveis de estrógenos fecais nas últimas, enquanto a excreção de progestinas fecais não diferiu entre os grupos (Hernández-López *et al.* 2010). Aliado a isso, ressalta-se que F5 é a fêmea que possui a idade estimada mais avançada (mínimo estimado de >13 anos) e também apresenta sinais de senilidade evidentes não

encontrados em nenhuma outra fêmea pertencente ao estudo, como cataratas e perda de dentes. Mesmo assim seus níveis hormonais e regularidade de atividade ovariana são semelhantes ao das demais fêmeas.

As fêmeas com níveis baixos de progestinas são três das quatro que estão mantidas em díades de fêmeas. A supressão hormonal ou interferência na atividade ovariana devido a diferenças sociais e hierárquicas é conhecida em primatas neotropicais, especificamente melhores estudadas nos calitriquídeos.

Em vida livre esta supressão hormonal não foi verificada em *Callithrix jacchus*, onde todas as subordinadas apresentaram atividade ovariana e chegaram até mesmo a parir (Sousa *et al.* 2005). Já no caso de *L. rosalia* também selvagens, algumas subordinadas possuem atividade ovariana regular, enquanto outras não demonstram sinais de ciclicidade, ou ainda, apesar de ciclarem, não engravidam. Somado a isso os padrões gerais dos níveis hormonais exibidos por estas fêmeas são inferiores aos das dominantes, evidenciando a supressão hormonal (French *et al.* 2003).

Já em cativeiro os efeitos da supressão podem ser potencializados pelo confinamento e proximidade. Fêmeas subordinadas de *C. kuhli* mantidas em seus grupos natais tiveram fases luteais mais curtas e menores níveis de excreção de progestinas quando comparadas às fêmeas vivendo sozinhas ou com um macho não relacionado (Smith *et al.* 1997). No caso de *C. jacchus* mesmo as subordinadas mantidas longe das dominantes, podem ter sua ovulação prejudicada por pistas olfatórias (sinais químicos) das mesmas (Barrett *et al.* 1990). Em outro relato, se averiguou que as subordinadas não aparentadas com a dominante podem ter a ovulação até mesmo suprimida (Abbott & Hearn 1978). Assim sendo, as condições de confinamento do cativeiro podem potencializar a interferência na atividade ovariana.

Através do índice de dominância obteve-se que F2 domina F1 e F7 domina F6. Apesar das possíveis distorções que o cativeiro pode infringir sobre o sistema social, as dominantes tiveram mais interações sexuais, sendo mais proceptivas e atrativas em relação aos seus pares. Maior atividade sexual também está associada à dominância em fêmeas selvagens de *Cebus capucinus* e *Alouatta clamitans* (Carnegie *et al.* 2005, Junglos, dados não publicados). A esfregação da região hiomandibular também tem sido considerada um comportamento ligado à dominância em *A. clamitans* (Junglos 2011), e apesar da baixa ocorrência deste comportamento nas fêmeas do presente estudo, F2 e F6 esfregaram mais a região hiomandibular do que seus pares (Tabela 13). Todavia esta hipótese somente poderia ser considerada para a díade F7-F6, pois F2, dominante sobre F1, é quem apresenta perfis hormonais abaixo das demais fêmeas.

O regime de cativeiro por si só, assim como todos os seus aspectos, sejam bióticos ou abióticos podem ameaçar o bem estar dos animais e causar estresse, evidenciado pelo aumento de glicocorticóides (Mason 2010, Morgan & Tromborg 2007, Rangel-Negrín *et al.* 2009). Entre os malefícios do estresse crônico, ressaltam-se seus efeitos prejudiciais sobre a função reprodutiva tanto no âmbito comportamental, inibindo a proceptividade, como no fisiológico, podendo entre outros efeitos, reduzir os níveis de progesterona (Sapolsky *et al.* 2000, Wingfield & Sapolsky 2003). Apesar deste trabalho não contemplar a dosagem de glicocorticoides, o comportamento estereotipado comum em regime de cativeiro é indicativo de estresse e também ocorre nos animais mantidos no CEPESBI (obs. pessoal, Dada *et al.* 2011).

As díades F6 e F7 encontrava-se em outro recinto provisório, na cidade de Blumenau, enquanto os recintos do CEPESBI passavam por reformas. No início do estudo foram translocadas para o CEPESBI, o que pode ter desencadeado estresse pela

contenção física, transporte e readaptação ao novo ambiente. Em especial, as fêmeas de *Alouatta* são mais sensíveis ao processo de manejo e translocação (Aguilar-Cucurachi *et al.* 2010).

Aguilar-Cucurachi *et al.* (2010) capturaram um grupo selvagem de *A. palliata* para translocá-los a outro fragmento, então mantiveram o grupo junto até a translocação, passando por duas etapas: o cativeiro e posteriormente o semi-cativeiro (recinto ao ar livre de 0,18 ha). Estas duas etapas somaram 90 dias, e os níveis de glicocorticoides fecais se mantiveram elevados até a soltura no novo fragmento a ser habitado.

Apesar da situação ser distinta, sendo que F6 e F7 apenas mudaram de recinto e continuaram cativas, este procedimento pode ter gerado um estresse crônico durante a maior parte do estudo. Esta díade apresenta diferenças no perfil hormonal e comportamental, sendo que F7 apresentou dois ciclos ovarianos e poucos comportamentos estereotipados (senso Dada *et al.* 2011). Já F6 pode ter sofrido mais com o estresse, pois ela não demonstrou ciclicidade ovariana e apresentou atividade sexual somente por volta do centésimo dia após sua translocação. Outra evidência é que ela apresentou estereotípias graves como a auto-mutilação.

Já F2, que iniciou o estudo em aciclia, não apresentou evidências comportamentais graves de estresse, nem sofreu com mudança de recinto previamente ao estudo, mesmo assim esta hipótese não pode ser descartada. Esta ideia poderá ser posteriormente testada com a dosagem dos glicocorticoides fecais dos mesmos extratos utilizados para a dosagem das progestinas.

Entre os efeitos hormonais nas fêmeas durante o ciclo ovariano estão alterações morfológicas cíclicas da região genital que podem indicar seu estado reprodutivo. Tais alterações são particularmente bem estudadas e conspícuas em alguns primatas do velho

mundo e podem variar em intensidade ou até mesmo ser ausente em diferentes espécies. Por exemplo, a região genital em fêmeas de babuínos e chimpanzés experimentam ciclicamente um intumescimento rosado relacionado ao ciclo ovariano (revisado por Beach 1976, Dixson 1998; Aujard *et al.* 1998; Shideler & Lasley 1982, Stavisky *et al.* 1995, Thompson 2005).

Glander (1980) relata alteração cíclica da coloração e intumescência da região genital como características do ciclo estral em *A. palliata*. Durante o período de intumescência genital há um pico na atividade sexual onde o macho dominante somente copulou com as fêmeas no dia de máximo inchaço genital.

Algumas alterações na coloração e intumescência das genitálias, inclusive com ereções de clitóris foram verificadas nos animais de estudo. Contudo durante a fase piloto foi averiguado grande variedade nas diferenças de coloração e na magnitude do inchaço genital entre as fêmeas em questão, portanto não foram registradas sistematicamente. Crockett & Sekulic (1982) também não encontraram um padrão de alterações morfológicas da genitália que remetesse ao ciclo estral de maneira confiável em *A. seniculus*.

De maneira geral, as fêmeas apresentaram comportamentos sexuais ao longo de todos os períodos ou fases dos ciclos ovarianos, sem restrição. Esta flexibilidade comportamental na atividade sexual ocorre por toda ordem Primates, com exceção dos prosímios onde ocorre um período exclusivo na atividade sexual, podendo ser considerado de fato um período de estro (Dixson 1998, Sauther 1991, Shideler & Lasley 1982).

Entre todo o repertório de comportamentos sexuais, o mais decisivo para estes animais atingirem a fecundação é a cópula, representativa da receptividade feminina

(Beach 1976, Dixson 1998, Nelson 1995). Haja vista que a reprodução não é um dos objetivos do CEPESBI/Projeto Bugio, machos e fêmeas não são mantidos no mesmo recinto (Figura 1), justamente com intuito de impedir a cópula, gerando um problema em particular neste trabalho. Apesar de anteriormente a esta pesquisa terem ocorrido dois nascimentos acidentais resultantes de cópulas entre as telas de arame vazado (Souza-Jr comunicação pessoal), nenhuma cópula foi registrada pelo observador durante este estudo.

Esta é a razão do conceito de receptividade não ser abordado, pois, nestas condições, em qualquer sequência de interações sexuais observadas, não foi possível ter certeza se a cópula não ocorreu porque a fêmea não estava receptiva ou porque a tela de arame impossibilitou sua execução.

Ademais, não se pode excluir a possibilidade de que a criação em cativeiro tenha afetado o aprendizado e desenvolvimento do repertório sócio-sexual natural. O macho 5 por exemplo, foi o único observado tentando copular algumas vezes, enquanto o macho 2, apesar de ser o que mais interagiu sexualmente, nunca tentou a cópula e se masturbava com frequência durante seu contato com as fêmeas. Verifica-se no histórico destes indivíduos que MA5 chegou adulto ao CEPESBI e MA2 era um juvenil quando foi recebido.

Na ausência de cópulas, a atividade sexual geral foi aplicada para verificar se há associação entre o comportamento sexual e algum período/fase específica do ciclo ovariano. Na divisão do ciclo entre fases interluteal e luteal não foi observada associação de comportamentos sexuais para ambas.

O aumento da atividade sexual está associada ao nível de estrógenos (Dixson 1998, Kendrick & Dixson 1983). Mesmo em estudo utilizando dosagem de hormônios

sexuais sanguíneos, em alguns primatas neotropicais os estrógenos apresentam elevação pouco antes do aumento na concentração de progestinas, (Dixson 1983: *Aotus trivirgatus*, Kendrick & Dixson 1983: *Callithrix jacchus*) o que não caracteriza uma fase folicular predominada por elevadas concentrações de estrógenos. Apesar de não haver estudos com hormônios plasmáticos para o gênero *Alouatta*, Kugelmeier *et al.* (2011) e Van Belle *et al.* (2009) relataram um pico nos estrógenos fecais ocorrendo simultaneamente à elevação dos progestinas. Este pode ser o padrão para *A. clamitans*, e poderia explicar porque nem a fase interluteal ou a luteal se associaram à atividade sexual.

A divisão entre períodos periovulatório e não-periovulatório corroborou claramente os dados comportamentais, o que também vai de encontro com o exposto no parágrafo acima. Tanto a atratividade como a proceptividade se associaram ao período periovulatório.

Em *L. chrysomelas* estas atividades não diferiram entre PPO e PNPO. Nesse caso, avaliando a divisão entre fases folicular e luteal os autores encontraram maior proceptividade e atratividade durante a fase folicular (De Vleeschouwer *et al.* 2000). Carnegie *et al.* (2005), encontraram que o PPO em *Cebus capucinus* é caracterizado por um aumento na atratividade, sem diferenças estatísticas em relação à proceptividade, enquanto que em *C. apella* o contrário foi observado (Linn *et al.* 1995). Já em *M. fuscata* e *A. pigra* de vida livre, o PPO se caracterizou por maior frequência de atividade sexual tanto atrativa como proceptiva (O'Neill *et al.* 2004, Van Belle *et al.* 2009), como observado nesse estudo.

O PPO's foram os únicos períodos em que a masturbação foi observada nas fêmeas deste estudo. A masturbação é comumente registrada entre espécies da

infraordem Catarrhini, enquanto são raros os relatos em Platyrrhini. Além disso, ocorre com maior frequência em machos e em animais de cativeiro, e pode estar associada a distorções do comportamento natural e impossibilidade de cópula (Dixson 1998).

Contudo, Altmann (1959) observou a ocorrência de masturbação em ambos os sexos em *A. palliata* de vida livre. No presente estudo, a masturbação em machos foi observada com frequência pelo observador, tanto em contextos sexuais como em outros momentos sem clara contextualização. Somente a masturbação realizada pelas fêmeas foi registrada e ocorreu unicamente durante os PPO's. A masturbação em fêmeas de orangotangos (*Pongo pygmaeus*) esteve associada aos picos de estrógenos, durante o PPO, juntamente com emissões de comportamentos proceptivos e cópulas (revisado por Dixson 1998). Com exceção das cópulas, o mesmo ocorreu com as fêmeas de *A. clamitans* objetos deste estudo. Apesar de sua relação com PPO ser evidente, não se pode afirmar se a ausência de cópulas influenciou a ocorrência da masturbação feminina na presente pesquisa.

O período periovulatório também foi caracterizado pela aproximação social dos machos, que emitiram mais comportamentos afiliativos às fêmeas. Em *C. capucinus* os machos também cataram mais as fêmeas durante seu PPO (Carnegie *et al.* 2005), e em *M. fuscata*, a catação recíproca entre machos e fêmeas foram mais frequentes durante a fase folicular e PPO do ciclo (O'Neill *et al.* 2004). Já em *A. pigra*, a frequência de catações não se alterou de acordo com a fase do ciclo ovariano, mas diferiu de acordo com o nível hierárquico, sendo que os machos centrais cataram mais as fêmeas do que os não-centrais (Van Belle *et al.* 2009).

Em ambos os casos essa aproximação social pode estar relacionada à guarda da fêmea, manutenção do relacionamento e/ou permitir o acesso à oportunidades de

cópulas, sejam elas diretamente influenciadas pela fase do ciclo ovariano e conseguinte alteração de comportamento nas fêmeas, ou por manutenção/consequência do status hierárquico. Além da catação, a própria proximidade entre os indivíduos pode sugerir estes fatores.

Machos e fêmeas permanecem mais tempo juntos durante o PPO em outros primatas neotropicais. Em *L. chrysomelas* este padrão foi encontrado, apesar de não ser possível identificar qual sexo é o responsável pela manutenção da proximidade (De Vleeschouwer *et al.* 2000). Já para *C. capucinus* e *A. pigra* os machos foram os responsáveis pela aproximação, que foi mais frequente durante o PPO (Carnegie *et al.* 2005, Van Belle *et al.* 2009). Neste estudo, o tempo em proximidade não apresentou relação com as fases e períodos do ciclo ovariano.

O relacionamento espacial em *Alouatta* nunca foi investigado em situação de cativeiro em relação ao ciclo ovariano. Talvez, as dimensões dos recintos já proporcionem uma aproximação que impossibilite a avaliação do distanciamento entre machos e fêmeas vizinhos, ou mesmo o fato de estarem separados por tela de arame prejudique a avaliação da aproximação.

Esta situação de divisão também prejudica outros comportamentos de relevância no estudo da sexualidade, como a cópula e a ejaculação. Mesmo se a avaliação da monta fosse factível neste estudo, estes dois comportamentos poderiam não ocorrer exclusivamente durante uma única fase do ciclo ovariano (Dixson 1998, Kendrick & Dixson 1983, Linn *et al.* 1995, O'Neill *et al.* 2004, Strier & Ziegler 1997). Na ausência de um padrão ou período exclusivo de atividade sexual, a frequência destes comportamentos pode remeter ao período fértil nos primatas (e.g. Aujard *et al.* 1998, Kendrick & Dixson 1983, O'Neill *et al.* 2004).

Tanto a atratividade intensa (AI) como a proceptividade intensa (PI) se associaram significativamente ao período periovulatório, o que torna a intensidade da atividade sexual característica do período. Através desse resultado foi gerado embasamento para análise *post hoc* entre os períodos de atividade sexual não-intensa e intensa. Entre AI e ANI, se verificou que a proceptividade foi maior durante AI e que os machos morderam ou lamberam o substrato de seu recinto mais em ANI do que em AI.

Os primatas neotropicais possuem um sistema olfatório relativamente bem desenvolvido com órgão vomeronasal funcional (Evans 2006), além disso, genes responsáveis pela comunicação espécie-específica através de ferormônios em primatas sofreram seleção positiva, inclusive no gênero *Alouatta* (Mundy & Cook 2003).

Machos de *A. pigra* e *L. chrysomelas* cheiraram a genitália das fêmeas com maior frequência durante o PPO, o que sugere que em ambas espécies os machos podem monitorar o estado reprodutivo das fêmeas através de pistas olfatórias (De Vleeschouwer *et al.* 2000, Van Belle *et al.* 2009). Em *A. palliata* os machos rotineiramente cheiram ou lambem locais urinados pelas fêmeas, o que pode significar que estão investigando seu estado reprodutivo (Glander 1980). É possível que machos de *C. capucinus* também utilizem pistas olfatórias com os mesmos objetivos (Carnegie *et al.* 2005). Assim sendo, o comportamento de lamber/morder o substrato pode ser uma maneira de adquirir pistas químicas de outros indivíduos da mesma espécie.

O fato dos machos realizarem este comportamento somente durante ANI, pode significar que eles procuram monitorar o estado reprodutivo das fêmeas por pistas químicas em primeira instância. Tendo em vista que se observou associação entre AI e PI, em um segundo momento as fêmeas demonstram comportamentalmente seu estado reprodutivo, e então, as pistas químicas podem se tornar desnecessárias.

Tais pistas químicas podem advir da urina das fêmeas, que pode ser levada ao recinto do macho quando elas urinam em estrato vertical elevado dentro do recinto e também das esfregações, que ocorreram entre outros, nas divisas dos recintos.

Com relação à proceptividade, as fêmeas estiveram mais atrativas durante PI e efetuaram mais autocatação durante PNI, ou seja, durante os dias de provável infertilidade nas fêmeas. A autocatação tem sido discutida por sua função higiênica em primatas, relativa ao cuidado com a pelagem e controle de ectoparasitas (Ventura *et al.* 2006), contudo os bugios mantidos no CEPESBI não apresentam infestações por estes animais (Souza-Jr, comunicação pessoal).

Em outros mamíferos, comportamentos auto-direcionados com aparente função de limpeza também são chamados de “*self-groom*” (correspondente a autocatação). Apesar de exibir um padrão locomotor completamente distinto, até mesmo pela anatomia, a autocatação em ratos é relacionada à comunicação. Através da autocatação, os ratos podem espalhar as secreções pelo corpo todo se tornando melhores sinalizadores químicos. Este comportamento tem sido associado à comunicação sexual entre estes animais (Ferkin *et al.* 1996, Ferkin *et al.* 2001).

A comunicação química através de secreções glandulares é conhecida entre os primatas neotropicais, com controvérsias acerca de suas possíveis funções sociais (Junglos 2011, Heymann 2006, Hirano *et al.* 2008). Em especial, *A. clamitans*, possui glândulas epidérmicas (sudoríparas modificadas, existentes nas regiões da mandíbula, hióide, nuca e inguinal) que liberam uma secreção colorida, responsáveis pela coloração rubra característica dos machos adultos. Estas secreções possivelmente são utilizadas como sinalizadores químicos e visuais (Hirano 2004; Hirano *et al.* 2003).

Lembrando que em bugios ambos os sexos são tricromatas (Jacobs *et al.* 1996), é possível que nesta espécie a autocatãção possa espalhar não somente sinalizadores químicos, mas também visuais, que revelem alguma pista sobre o estado fisiológico das fêmeas. Contudo, é prudente conduzir uma investigação específica sobre este comportamento e sua relação com a comunicação sexual, secreção dos pigmentos, região do corpo mais autocatada e fatores abióticos, como a temperatura ambiente, que pode conseqüentemente aumentar a secreção dos pigmentos coloridos.

A proceptividade e atratividade apresentaram correlação, contudo diferenças emergem sobre sua presença no PPO e no PNPO e em relação à atividade sexual. A proceptividade demonstrou divisão clara em relação à sua intensidade e o período do ciclo ovariano, onde PNI ocorreu mais no PNPO enquanto que PI ocorreu quase que exclusivamente no PPO. A atratividade não apresentou mesma divisão, sendo que AI também se associou a PPO enquanto ANI não apresentou diferenças entre PPO e PNPO.

Em relação à atividade sexual, nenhum comportamento apresentou associação com AI, ANI e PNI, enquanto que em PI a atratividade foi maior do que em PNI. Juntos estes fatores sugerem que a fêmea exibe comportamentalmente sua fertilidade, caracterizada por atividade proceptiva intensa, e que sua proceptividade não é diretamente associada à atividade sexual dos machos, mas sim ao seu estado fisiológico. Por outro lado, as fêmeas estão sempre atrativas aos machos, independente de seu estado fisiológico. Entretanto a atratividade se intensifica nos períodos periovulatórios, associada diretamente à pistas comportamentais das fêmeas.

Em espécies onde o comportamento da fêmea aparenta não delatar seu estado reprodutivo, os machos podem iniciar a aproximação social durante o período

periovulatório, o que indiretamente aponta para maior importância das pistas químicas e/ou auditivas emitidas pelas fêmeas para o início da atividade sexual (Carnegie *et al.* 2005).

Verificando que a maior parte dos dias em que apenas um dos dois comportamentos se apresentou, observa-se que a proceptividade ocorre em exclusividade em mais dias do que a atratividade. Ela também foi mais frequente nos dias em que ambas se manifestaram. Tal fato sugere que as fêmeas estão à frente no início da atividade sexual, o que corrobora os dados de Belle *et al.* (2009) e Van Belle *et al.* (2009), com bugios de vida livre.

Em *A. pigra* de vida livre, a maioria das cópulas ocorreu por iniciativa das fêmeas, e elas ocorreram com maior frequência durante PPO (Van Belle *et al.* 2009). Em *Callithrix jacchus* os comportamentos sexuais emitidos pelos machos ocorreram mais nos dias do PPO, somente quando as fêmeas emitiram os “*tongue flicks*” (correspondente ao “mostrar língua” deste estudo). O PPO por si só sem o “mostrar língua” não se diferenciou quanto à atratividade das fases luteal e folicular (Kendrick & Dixson 1983), dando força a ideia de que o estado hormonal altera o comportamento da fêmea, que por sua vez modifica o comportamento dos machos.

Machos e fêmeas de *M. fuscata* costumam formar pares que se unem e podem passar longos períodos juntos durante a estação reprodutiva. A atratividade também ocorre ao longo do ciclo ovariano. Entretanto, as fêmeas despendem mais tempo junto e são elas que se aproximam aos machos com maior frequência durante a fase folicular e PPO, sugerindo a iniciativa da fêmea na formação dos pares durante seu período de maior fertilidade (O’neill *et al.* 2004).

A presença da atividade sexual demonstrou influenciar outros padrões comportamentais que podem não estar diretamente ligados à ovulação. Apesar do PPO, a presença da atividade sexual demonstrou associação com a emissão de comportamentos afiliativos de maneira recíproca, assim como maior frequência da esfregação hiomandibular, tanto de machos como de fêmeas.

A esfregação da região hiomandibular em *Alouatta clamitans* está associada à competição intrasexual, status hierárquico e defesa de recursos (inclusive parceiros sexuais) (Hirano *et al.* 2008; Junglos 2011). Se existente, o sistema social estabelecido entre os animais cativos no CEPESBI é de difícil avaliação, devido a todas as interferências do confinamento e manejo humano. Entretanto, constatada a associação entre a esfregação hiomandibular e a atividade sexual, qualquer uma das hipóteses citadas acima é possível de ocorrer. Pesquisas com este foco específico tanto experimentalmente em cativeiro, ou em vida livre poderiam oferecer evidências menos enviesadas sobre os contextos aos quais a esfregação hiomandibular se relaciona à atividade e/ou comunicação sexual.

## 6. Conclusões

- O método não-invasivo de dosagem de progestinas fecais através do ensaio imunoenzimático demonstrou ser eficaz para acessar a atividade ovariana em fêmeas de *Alouatta clamitans*;

- O ciclo ovariano de *Alouatta clamitans* foi de  $16 \pm 0,52$  dias, com fase interluteal de  $4 \pm 0,37$  dias e fase luteal de  $11 \pm 0,50$  dias;

- A atividade sexual ocorreu ao longo de todos os momentos do ciclo ovariano, contudo o aumento na intensidade da atividade sexual remeteu ao período de maior probabilidade de fertilidade nas fêmeas de *A. clamitans*;

- A masturbação em fêmeas esteve ligada à libido sexual, ocorrendo somente nos períodos de maior receptividade;

- As fêmeas foram atrativas em todas as fases de seu ciclo ovariano e alertaram comportamentalmente os machos em relação ao seu estado reprodutivo;

- O comportamento sexual dos machos esteve associado à mudança comportamental das fêmeas, sendo que a atratividade delas aumenta junto com sua receptividade;

- Apesar da investida sexual dos machos ao longo dos ciclos, a receptividade das fêmeas foi influenciada pela sua atividade ovariana, aumentando próxima à ovulação;

- A atividade sexual está associada à maior interação social.

## 7. Referências Bibliográficas

Abbott, D.H. & Hearn, J.P. 1978. Physical, Hormonal and Behavioural Aspects of Sexual Development in the Marmoset Monkey, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction and Fertility** **53**: 155-166.

Aguiar, L.M., Ludwig, G., Hilst, C.L.S, Malanski, L.S. & Passos, F.C. 2005. Tentativa de Homicídio por um Macho Dominante de *Alouatta caraya* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em um infant Extra-Grupo Devido a Influência do Observador. **Revista Brasileira de Zoologia** **22(4)**: 1201-1203.

Aguiar, L.M., Pie, M.R. & Passos, F.C. 2008. Wild Mixed Groups of Howler Species (*Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans*) and New Evidence of Their Hybridization. **Primates** **49**: 149-152.

Aguiar, L.M., Reis, N.R., Ludwig, G. & Rocha, V.J. 2003. Dieta, Área de Vida, Vocalizações e Estimativas Populacionais de *Alouatta guariba* em um Remanescente Florestal no Norte do Paraná. **Neotropical Primates** **11(2)**: 78-86.

Aguilar-Cucurachi, M.A.S., Dias, P.A.D., Rangel-Negrín, A., Chavira, R., Boeck, L. & Canales-Espinosa, D. 2010. Preliminary Accumulation of Stress During Translocation in Mantled Howlers. **American Journal of Primatology** **72**: 805-810.

Altmann, J. 1974. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. **Behaviour** **40**: 227-267.

Altmann, S. A. 1959. Field Observations of a Howling Monkey Society. **Journal of Mammalogy** **40(3)**: 317-330.

Arroyo-Rodríguez, V., Asension, N. & Cristóbal-Azkarate, J. 2008a. Demography, Life History and Migrations in a Mexican Mantled Howler Group in a Rain Forest Fragment. **American Journal of Primatology** **70**: 114-118.

Arroyo-Rodríguez, V., Mundujano, S. & Benítez-Malvido, J. 2008b. Landscape Attributes Affecting Patch Occupancy by Howler Monkeys (*Alouatta palliata mexicana*) at Los Tuxtlas, Mexico. **American Journal of Primatology** **70**: 69-77.

Asa, C.S. 1996. Reproductive Physiology, p. 379-389. In: Kleiman, D.G., Allen, M.E., Thompson, K.V. & Lumpkin, S. (eds.). **Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques**. Chicago, University of Chicago Press.

Asensio, N. & Gómez-Marín, F. 2002. Interspecific Interaction and Predator Avoidance Behavior in Response to Tayra (*Eira barbara*) by Mantled Howler Monkeys (*Alouatta palliata*). **Primates** **43(4)**: 339-341.

Atsalys, S., Margulis, S.W., Bellem, A. & Wielebnowski, N. 2004. Sexual Behavior and Hormonal Estrus Cycles in Captive Aged Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla*). **American Journal of Primatology** **62**: 123-132.

Aujard, F., Heistermann, M., Thierry, B. & Hodges, J.K. 1998. Functional Significance of Behavioral, Morphological and Endocrine Correlates Across the Ovarian Cycle in Semifree Ranging Tonkean Macaques. **American Journal of Primatology** **46**: 285-309.

Baird, D.T., Baker, T.G., McNatty, K.P. & Neal P. 1975. Relationship Between the Secretion of the Corpus Luteum and the Length of the Follicular Phase of the Ovarian Cycle. **Journal of Reproduction and Fertility** **45**: 611-619.

Barrett, J., Abbott, D.H. & George, L.M. 1990. Extension of Reproductive Suppression by Pheromonal Cues in Subordinate Female Marmoset Monkeys, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction and Fertility** **90**: 411-418.

Beach, F.A. 1976. Sexual Attractivity, Proceptivity and Receptivity in Female Mammals. **Hormones and Behavior** **7**: 105-138.

Belle, S. V., Estrada, A., Ziegler, T.E. & Strier, K.B. 2009. Social and Hormonal Mechanisms Underlying Male Reproductive Strategies in Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*). **Hormones and Behavior** **56(4)**: 355-363.

Bercovitch, F.B. & Ziegler, T.E. 2002. Current Topics in Primate Socioendocrinology. **Annual Review of Anthropology** **31**: 45-67.

Bianchi, R.C. & Mendes, S.L. 2007. Ocelot (*Leopardus pardalis*) Predation on Primates in Caratinga Biological Station, Southeast Brazil. **American Journal of Primatology** (**69**): 1173-1178.

Bicca-Marques, J.C. 2009. Outbreak of Yellow Fever Affects Howler Monkeys in Southern Brazil. **Oryx** **43(2)**: 173.

Blanco, M.B. & Meyer, J.S. 2009. Assessing Reproductive Profiles in Female Brown Mouse Lemurs (*Microcebus rufus*) From Ranomafana National Park, Southeast Madagascar, Using Fecal Hormone Analysis. **American Journal of Primatology** **71**: 439-446.

Bravo, S.P. & Sallenave, A. 2003. Foraging Behavior and Activity Patterns of *Alouatta caraya* in the Northeastern Argentinean Flooded Forest. **International Journal of Primatology** **24(4)**: 825-846.

Bravo, S.P. & Zunino, G.E. 1998. Effects of Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) Seed Ingestion of Insect Larvae. **American Journal of Primatology** **45**: 411-415.

Brockman, D.K. & Whitten, P.L. 1996. Reproduction in Free-Ranging *Propithecus verreauxi*: Estrus and the Relationship Between Multiple Partner Matings and Fertilization. **American Journal of Physical Anthropology** **100**: 57-69.

Brown, J. L. 2008. Endocrine Manual for Hormonal Assessment of Wildlife Species. **Endocrine Research Laboratory**. Conservation & Research Center National Zoological Park, Front Royal, Virginia.

Camargo, C.C. & Ferrari, S.F. 2007. Interactions Between Tayras (*Eira barbara*) and Red-Handed Howlers (*Alouatta belzebul*) in Eastern Amazonia. **Primates** **(48)**: 147-150.

Campbell, C.J., Shideler, S.E., Todd, H.E. & Lasley, B.L. 2001. Fecal Analysis of Ovarian Cycle in Female Black-Handed Spider Monkeys (*Atelles geoffroyi*) **American Journal of Primatology** **54**: 79-89.

Carnegie, S.D., Fedigan, L.M. & Ziegler, T.E. 2005. Behavioral Indicators of Ovarian Phase in White-Faced Capuchins (*Cebus capucinus*). **American Journal of Primatology** **67**: 51-68.

Carosi, M., Heistermann, M. & Visalberghi, E. 1999. Display of Proceptive Behaviors in Relation to Urinary and Fecal Progesterone Levels Over the Ovarian Cycle in Female Tufted Capuchin Monkeys. **Hormones and Behavior** **36**: 252-265.

Chapman, C.A. & Balcomb, S.R. 1998. Population Characteristics of Howlers: Ecological Conditions of Group History. **International Journal of Primatology** **19(3)**: 382-403.

Chapman, C. & Chapman, L.J. 1986. Behavioural Development of Howling Monkey Twins (*Alouatta palliata*) in Santa Rosa National Park, Costa Rica. **Primates** **27(3)**: 377-381.

Chiarello, A.G. 1993. Activity Pattern of the Brown Howler Monkey *Alouatta fusca*, Geoffroy 1812, in a Forest Fragment of Southeastern Brazil. **Primates** **34(3)**: 289-293.

Chiarello, A.G. 1995. Role of Loud Calls in Brown Howlers, *Alouatta fusca*. **American Journal of Primatology** **36**: 213-222.

Clarke, M.R., Zucker, E.L., Ford, R.T. & Harrison, R.M. 2007. Behavior and Endocrine Concentrations do Not Distinguish Sex in Monomorphic Juvenile Howlers (*Alouatta palliata*). **American Journal of Primatology** (**69**): 477-484.

Clarke, M.R. & Glander, K.E. 2008. Natal Emigration by Both Sexes in the La Pacifica Population of Mantled Howlers: When do Some Stay? **American Journal of Primatology** (**70**): 195-200.

Clarke, M.R. & Glander, K.E. 2010. Secondary Transfer of Adult Mantled Howlers (*Alouatta palliata*) on Hacienda La Pacifica, Costa Rica: 1975-2009. **Primates** **51**: 241-249.

Cristóbal-Azkarate, J. & Arroyo-Rodríguez, V. 2007. Diet and Activity Pattern of Howler Monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: Effects of Habitat Fragmentation and Implications for Conservation. **American Journal of Primatology** **69**: 1013-1029.

Crockett, C.M. 1998. Conservation Biology of genus *Alouatta*. **International Journal of Primatology** **19(3)**: 549-578.

Crockett, C. M. & Eisenberg, J. F. 1987. Howlers: Variations in group size and

Demography, p.54-68. In: Smuts, B. B., Cheney, D. L., Seyfarth, R. M., Wrangham, R. W. & Struhsaker, T. T. (eds.). **Primate Societies**. Chicago, University of Chicago Press.

Crockett, C.M. & Sekulic, R. 1982. Gestation Length in Red Howler Monkeys. **American Journal of Primatology 3**: 291-294.

Cunha, R.G.T. & Jalles-Filho, E. 2007. The Roaring of Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) as a Mechanism of Active Defense of Borders. **Folia Primatologica (78)**: 259-271.

Dada, A.N., Souza-Jr, J.C., Oliveira, D.A.G. & Hirano, Z.M.B. 2011. Padrões Comportamentais de Bugio-Ruivo (*Alouatta clamitans* Cabrera, 1940) em Cativeiro (Primates: Atelidae) p. 137-159. In: Miranda, J.M.D. & Hirano, Z.M.B. (eds.). **A Primatologia no Brasil (12)**, Curitiba, UFPR/SBPr.

Dixson, A.F. 1983. The Owl Monkey, p. 69-114. In: Hearn, J.P. (ed.). **Reproduction in New World Primates: New Models in Medical Sciences**. Lancaster, MTP Press Limited.

Dixson, A.F. 1998. **Primate Sexuality: Comparative Studies of the Prosimians, Monkeys, Apes, and Human Beings**. Oxford. Oxford University Press.

De Vleeschouwer, K., Heistermann, M., Van Elsacker, L. & Verheyen, R.F. 2000. Signaling of Reproductive Status in Captive Female Golden-Headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*). **International Journal of Primatology 21(3)**: 445-465.

Ellison, P.T. 1996. Developmental Influences on Adult Ovarian Hormonal Function. **American Journal of Human Biology 8**: 725-734.

Estrada, A. & Coates-Estrada, R. 1984. Fruit Eating and Seed Dispersal by Howling Monkeys (*Alouatta palliata*) in the Tropical Rain Forest of Los Tuxtlas, Mexico. **American Journal of Primatology** 6: 77-91.

Estrada, A., Anzures, A.D. & Coates-Estrada, R. 1999a. Tropical Rain Forest Fragmentation, Howler Monkeys (*Alouatta palliata*), and Dung Beetles at Los Tuxtlas, Mexico. **American Journal of Primatology** 48: 253-262.

Estrada, A., Juan-Solano, S., Martínez, T.O. & Coates-Estrada, R. 1999b. Feeding and General Activity Patterns of a Howler Monkey (*Alouatta palliata*) Troop Living in a Forest Fragment at Los Tuxtlas, Mexico. **American Journal of Primatology** 48: 167-183.

Ferkin, M.H., Leonard, S.T., Health, L.A. & Paz-y-Miño, G.C. 2001. Self-Grooming as a Tactic Used by Prairie Voles *Microtus ochrogaster* to Enhance Sexual Communication. **Ethology** 107: 939-949.

Ferkin, M.H., Sorokin, E.S. & Johnston, R.E. 1996. Self-Grooming as a Sexually Dimorphic Communicative Behaviour in Meadow Voles, *Microtus pennsylvanicus*. **Animal Behavior** 51: 801-810.

French, J.A., Bales, K.L., Baker, A.J. & Dietz, J.M. 2003. Endocrine Monitoring of Wild Dominant and Subordinate Female *Leontopithecus rosalia*. **International Journal of Primatology** 24(6): 1281-1300.

French, J.A., Brewer, K.J., Schaffner, C.M., Schalley, J., Hightower-Merrit, D., Smith, T.E. & Bell, S.M. 1996. Urinary Steroid and Gonadotropin Excretion Across the Reproductive Cycle in Female Wied's Black Tufted-Ear Marmosets (*Callithrix kuhli*). **American Journal of Primatology** 40: 231-245.

Fujita, S., Mitsunaga, F., Sugiura, H. & Shimizu, K. 2001. Measurement of Urinary and Fecal Steroid Metabolites During the Ovarian Cycle in Captive and Wild Japanese Macaques, *Macaca fuscata*. **American Journal of Primatology** **53**: 167-176.

Fujita, S., Sugiura, H., Mitsunaga, F. & Shimizu K. 2004. Hormone Profiles and Reproductive Characteristics in Wild Female Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). **American Journal of Primatology** **64**: 367-375.

Glander, K.E. 1980. Reproduction and Population Growth in Free-Ranging Mantled Howling Monkeys. **American Journal of Primatology** **53**: 25-36.

Graham, L. H.; Schwarzenberger, F.; Möstl, E.; Galama, W.; Savage, A. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biology** **20**: 227–236.

Gregorin 2006. Taxonomia e Variação Geográfica das Espécies do Gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** **23(1)**: 64-144.

Hearn, J.P. (ed.) 1983. **Reproduction in New World Primates: New Models in Medical Science**. Lancaster, MTP Press Limited.

Heistermann, M. & Hodges, J.K. 1995. Endocrine Monitoring of the Ovarian Cycle and the Pregnancy in the Saddle-Back Tamarin (*Saguinus fuscicollis*) by Measurement of Steroid Conjugates in Urine. **American Journal of Primatology** **35**: 117-127.

Heistermann, M., Finke, M. & Hodges, J.K. 1995. Assessment of Female Reproductive Status in Captive-Housed Hanuman Langurs (*Presbytis entellus*) by Measurement of Urinary and Fecal Steroid Excretion Patterns. **American Journal of Primatology** **37**: 275-284.

Heistermann, M., Trohorsch, B. & Hodges, J.K. 1997. Assessment of Ovarian Function in the African Elephant (*Loxodonta africana*) by Measurement of 5 $\alpha$ -Reduced Progesterone Metabolites in the Serum and Urine. **Zoo Biology** **16**: 273-284.

Helvacioğlu, A., Aksel, S., Yeoman, R.R., Williams, L.E. & Abee, C.R. 1994. Age-Related Hormonal Differences in Cycling Squirrel Monkeys (*Saimiri boliviensis boliviensis*). **American Journal of Primatology** **32**: 201-213.

Hernández-López, L., Cerda-Molina, A.L., Chavira-Ramírez, R. & Mondragón-Ceballos, R. 2010. Age-Dependent Changes in Fecal 17 $\beta$ -Estradiol and Progesterone Concentrations in Female Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology** **73**: 468-473.

Herrick, J.R., Agoramoorthy, G., Rudran, R. & Harder, J.D. 2000. Urinary Progesterone in Free-Ranging Red Howler Monkeys (*Alouatta seniculus*): Preliminary Observations of the Estrous Cycle and Gestation. **American Journal of Primatology** **51(4)**: 257-263.

Heymann, E.W. 2006. Scent Marking Strategies of New World Primates. **American Journal of Primatology** **68**: 650-661.

Hirano, Z.M.B. 2004. **Secreção epidérmica de *Alouatta guariba clamitans***. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Hirano, Z.M.B., Correa, I.C. & Oliveira, D.A.G. 2008. Contexts of Rubbing Behavior in *Alouatta guariba clamitans*: A Scent-Marking Role?. **American Journal of Primatology** **70**: 575-583.

Hirano, Z.M.B., Tramonte, R., Silva, A.R.M., Rodrigues, R.B. & Santos, W.F. 2003. Morphology of Epidermal Glands Responsible for the Release of Colored Secretions in *Alouatta guariba clamitans*. **Laboratory Primate Newsletter** **42(2)**: 4-7.

Jacobs, G.H., Neitz, M., Deegan, J.F. & Neitz, J. Trichromatic Colour Vision in New World Monkeys. **Nature** **382**: 156-158.

Julliot, C. 1996. Fruit Choice by Red Howler Monkeys (*Alouatta seniculus*) in a Tropical Rain Forest. **American Journal of Primatology** **40**: 261-282.

Junglos, A.M. 2011. **Funções Sociais e Ecológicas de Esfregações em Bugios-Ruivos (*Alouatta clamitans*, Cabrera, 1940) em Ambiente Natural**. Monografia. Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

Kendrick, K.M. & Dixson, A.F. 1983. The Effects of the Ovarian Cycle on the Sexual Behaviour of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). **Physiology & Behavior** **30**: 735-742.

Kleiman, D.G. & Rylands, A.B. 2008. Biologia e Conservação dos Micos-Leões: Uma Síntese e Desafios para o Futuro, p.186-215. In: Kleiman, D.G. & Rylands, A.B. (eds.). **Micos-Leões: Biologia e Conservação**. Brasília, MMA.

Kitchen, D.M. 2003. Alpha Male Black Howler Monkey Responses to Loud Calls: Effect of Numeric Odds, Male Companion Behaviour and Reproductive Investment. **Animal Behaviour** **67**: 125-139.

Knopff, K.H., Knopff, A.R.A. & Pavelka, M.S.M. 2004. Observed Case of Infanticide Committed by a Resident Male Central American Black Howler Monkey (*Alouatta pigra*). **American Journal of Primatology** (**63**): 239-244.

Knopff, K.H. & Pavelka, M.S.M. 2006. Feeding Competition and Group Size in *Alouatta pigra*. **International Journal of Primatology** **27(4)**: 1059-1078.

Kugelmeier, T., Valle, R.R., Guimarães, M.A.B.V., Muniz, J.A.P.C, Monteiro, F.O.B. & Oliveira, C.A. 2011. Tracking the Ovarian Cycle in Black-and-Gold Howlers

(*Alouatta caraya*) by Measuring Fecal Steroids and Observing Vaginal Bleeding. **International Journal of Primatology** **35**: 605-615.

Linn, G.S., Mase, D., Lafrancois, D., O’Keeffe, R.T. & Lifshitz, K. 1995. Social and Menstrual Cycle Phase Influences on the Behavior of Group-Housed *Cebus apella*. **American Journal of Primatology** **35**: 41-57.

Lu, A., Borries, C., Czekala, N.M. & Beehner, J.C. 2010. Reproductive Characteristics of Wild Female Phayre’s Leaf Monkeys. **American Journal of Primatology** **72**: 1073-1081.

Ludwig, G., Aguiar, L.M., Miranda, J.M.D., Teixeira, G.M., Svoboda, W.K., Malanski, L.S., Shiozawa, M.M., Hilst, C.L.S., Navarro, I.T. & Passos, F.C. Cougar Predation on Black-and-Gold Howlers on Mutum Island, Southern Brazil. **International Journal of Primatology** **28(1)**: 39-46.

Martin, P. & Bateson, P. 1983. **Measuring Behavior: An Introductory Guide**. Cambridge, Cambridge University Press.

Mason, G.J. 2010. Species Differences in Response to Captivity: Stress, Welfare and the Comparative Method. **Trends in Ecology and Evolution** **25(12)**: 713-721.

Mendes, S.L. 1989. Estudo Ecológico de *Alouatta fusca* (Primates: Cebidae) na Estação Biológica de Caratinga, MG. **Revista Nordestina de Biologia** **6(2)**: 71-104.

Milton, K. 1979. Factors Influencing Leaf Choice by Howler Monkeys: a Test of Some Hypotheses of Food Select by Generalist Herbivores. **American Naturalist** **114**: 362-378.

Miranda, J.M.D., Bernardi, I.P. Abreu, K.C. & Passos, F.C. 2005. Predation on *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) by *Leopardus pardalis* (Linnaeus) (Carnivora, Felidae). **Revista Brasileira de Zoologia** **22(3)**: 793-795.

Miranda, J.M.D., Bernardi, I.P., Moro-Rios, R.F. & Passos, F.C. 2006a. Antipredator Behaviour of Brown Howlers Attacked by Black-Hawk Eagle in Southeastern Brazil. **International Journal of Primatology** **27(4)**: 1097-1101.

Miranda, J.M.D., Bernardi, I.P., Moro-Rios, R.F. & Passos, F.C. 2006b. Three Years on Demography of a group of *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae): Growth and Fragmentation. **Revista Brasileira de Zoologia** **23(3)**: 703-706.

Miranda, J.M.D. & Passos, F.C. 2004. Hábito Alimentar de *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em Floresta de Araucária, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** **21(4)**: 821-826.

Miranda, J.M.D. & Passos, F.C. 2005. Composição e Dinâmica de Grupos de *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) em Floresta Ombrófila Mista no Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** **22(1)**: 99-106.

Mittermeier, R.A. 1973. Group Activity and Population Dynamics of the Howler Monkeys on Barro Colorado Island. **Primates** **14(1)**:1-19.

Miyamoto, S., Chen, Y., Kurotori, H., Yoshida, T.S.T. & Machida, T. 2001. Monitoring the Reproductive Status of Female Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) by Measuring the Steroid Hormones in Fecal Samples. **Primates** **42(4)**: 291-299.

Moreland, R.B., Richardson, M.E., Lamberski, N. & Long, A.J.A. 2001. Characterizing the Reproductive Physiology of the Male Southern Black Howler Monkey, *Alouatta caraya*. **Journal of Andrology** **22(3)**: 395-413.

Morgan, K.N. & Tromborg, C.T. 2007. Sources of Stress in Captivity. **Applied Animal Behaviour Science** **102**: 262-302.

Muñoz, D., Estrada, A., Naranjo, E. & Ochoa, S. 2006. Foraging Ecology of Howler Monkeys in a Cacao (*Theobroma cacao*) Plantation in Comalcalco, Mexico. **American Journal of Primatology** **68**: 127-142.

Nagle, C.A. 2000. Primate Menstrual Cycle. **Yerkes Regional Primate Research Center**. Atlanta, Emory University. Disponível em: [www.primate.wisc.edu/pin/menstrual.html](http://www.primate.wisc.edu/pin/menstrual.html), acessado em 12/02/2012.

Nagle, C.A. & Denari, J.H. 1983. The *Cebus* Monkey (*Cebus apella*), p. 38-68. In: Hearn, J.P. (ed.). **Reproduction in New World Primates: New Models in Medical Sciences**. Lancaster, MTP Press Limited.

Nelson, R.J. 1995. **An Introduction to Behavioral Endocrinology**. Sunderland, Sinauer Associates Inc.

Norris, D.O. 2007. **Vertebrate Endocrinology**. London, Elsevier Academic Press.

Núñez-de La Mora, A., Chatterton, R.T., Choudhury, O.A., Napolitano, D.A. & Bentley, G.R. 2007. Childhood Conditions Influence Adult Progesterone Levels. **PLoS Medicine** **4(5)**: 813-821.

O'Neill, A.C., Fedigan, L.M. & Ziegler, T.E. 2004. Relationship Between Ovarian Cycle Phase and Sexual Behavior in Female Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). **American Journal of Physical Anthropology** **125**: 352-362.

Palacios, E. & Rodriguez, A. 2001. Ranging Pattern of Use of Space in a Group of Red Howler Monkeys (*Alouatta seniculus*) in a Southeastern Colombian Rainforest. **American Journal of Primatology** **55**: 233-251.

Peetz, A., Norconk, M.A. & Kinzey, W.G. 1992. Predation by Jaguar on Howler Monkeys (*Alouatta seniculus*) in Venezuela. **American Journal of Primatology** **28**: 223-228.

Rangel-Negrín, A., Alfaro, J.L., Valdez, R.A., Romano, M.C. & Serio-Silva, J.C. 2009. Stress in Yucatan Spider Monkeys: Effects on Environmental Conditions on Fecal Cortisol Levels in Wild and Captive Populations. **Animal Conservation** **12**: 496-502.

Rylands & Mittermeier 2009. The Diversity of The New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy, p. 23-54. In: Garber, P.A., Estrada, A., Bicca-Marques, J.C., Heymann, E.W. & Strier, K. (eds.). **South American Primates: Comparative Perspective in the Study of Behavior, Ecology and Conservation**. Springer Verlag.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M. & Munck A.U. 2000. How do Glucocorticoids Influence Stress Response? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. **Endocrine Reviews** **21(1)**: 55-89.

Sauther, M.L. 1991. Reproductive Behavior of Free-Ranging *Lemur catta* at Beza Mahafaly Special Reserve, Madagascar. **American Journal of Physical Anthropology** **84**: 463-477.

Savage A., Shideler, S.E., Soto, L.H., Causado, J., Giraldo, L.H., Lasley, B.L. & Snowdon, C.T. 1997. Reproductive Events of Wild Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*) in Colombia. **American Journal of Primatology** **43**: 329-337.

Schon, M.A. 1971. The Anatomy of Resonating Mechanism in Howling Monkeys. **Folia Primatologica** **15**: 117-132.

Silver, S.C., Ostro, L.E.T., Yeager, C.P. & Horwich, R. 1998. Feeding Ecology of the Black Howler Monkey (*Alouatta pigra*) in Northern Belize. **American Journal of Primatology** **45**: 263-279.

Shideler, S.E. & Lasley, B.L. 1982. A Comparison of Primate Ovarian Cycles. **American Journal of Primatology Supplement 1**: 171-180.

Shideler, S.E., Ortuño, A.M., Morán, F.M., Moorman, E.A. & Lasley, B.L. 1993. Simple Extraction and Enzyme Immunoassays for Estrogen and Progesterone Metabolites in the Feces of *Macaca fascicularis* during Non-Conceptive and Conceptive Ovarian Cycles. **Biology of Reproduction** **48**: 1290-1298.

Smith, T.E., Schffaner, C.M., & French, J.A. 1997. Social and Developmental Influences on Reproductive Function in Female Wied's Black Tufted-ear Marmosets (*Callithrix kuhli*). **Hormones and Behavior** **31**: 159-168.

Sousa, M.B.C., Albuquerque, A.C.S.R., Albuquerque, F.S., Araujo, A., Yamamoto, M.E. & Arruda, M.F. 2005. Behavioral Strategies and Hormonal Profiles of Dominant and Subordinate Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Females in Wild Monogamous Groups. **American Journal of Primatology** **67**: 37-50.

Sousa, M.B.C. & Ziegler, T.E. 1998. Diurnal Variation on the Excretion Patterns of Fecal Steroids in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Females. **American Journal of Primatology** **46**:105-117.

Stavisky, R., Russell, E., Stallings, J., Smith, E.O., Worthman, C. & Whitten, P.L. 1995. Fecal Steroid Analysis of Ovarian Cycles in Free-Ranging Baboons. **American Journal of Primatology** **36**: 285-297.

Strier, K.B. & Ziegler, T.E. 1997. Behavioral and Endocrine Characteristics of the Reproductive Cycle in Wild Muriqui Monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology** **42**: 299-310.

Strier, K.B., Mendes, S.L. & Santos, R.R. 2001. Timing of Births in Sympatric Brown Howler Monkeys (*Alouatta fusca clamitans*) and Northern Muriquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). **American Journal of Primatology** **55**: 87-100.

Treves, A. 2001. Reproductive Consequences of Variation in the Composition of Howler Monkey (*Alouatta* spp.) Groups. **Behavioral Ecology and Sociobiology** **50**: 61-71.

Thompson, M.E. 2005. Reproductive Endocrinology of Wild Female Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*): Methodological Considerations and the Role of Hormones in Sex and Conception. **American Journal of Primatology** **67**: 137-158.

Valeggia, C.L., Mendoza, S.P. Fernandez-Duque, E., Mason, W.A. & Lasley, B. 1999. Reproductive Biology of Female Titi Monkeys (*Callicebus moloch*) in Captivity. **American Journal of Primatology** **47**: 183-195.

Van Belle, S., Estrada, A., Ziegler, T.E. & Strier, K. 2009. Sexual Behavior Across Ovarian Cycles in Wild Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*): Male Mate Guarding and Female Mate Choice. **American Journal of Primatology** **71(2)**: 153-164.

Ventura, R., Majolo, B., Koyama, N.F., Hardie, S. & Schino, G. 2006. Reciprocation and Interchange in Wild Japanese Macaques: Cofeeding, and Agonistic Support. **American Journal of Primatology** **68**: 1138-1149.

Versiani, N.F., Pereira, R.J.G. & Duarte, J.M.B. 2009. Annual Variations in Fecal Androgen Metabolites and Antler Cycle of Captive Red Brocket Bucks (*Mazama americana*) in Southeast Brazil. **European Journal of Wildlife Research** **55(5)**: 534-538.

Wasser, S.K., Thomas, R., Nair, P.P., Guidry, C., Southers, J, Lucas, J., Wildt, D.E. & Monfort, S.L. 1993. Effects of Dietary Fibre of Faecal Steroid Measurements in Baboons (*Papio cynocephalus*). **Journal of Reproduction and Fertility** **97**: 569-574.

Wingfield, J.C. & Sapolsky, R.M. 2003. Reproduction and Resistance to Stress: When and How. **Journal of Neuroendocrinology** **15**: 711-724.

Worthman, C.M. 1990. Socioendocrinology: Key to a Fundamental Synergy, p.187-212. In: Ziegler, T.E. & Bercovitch, F.B. (eds.). **Socioendocrinology of Primate Reproduction**. New York, Wiley-Liss.

Ziegler, T.E., Santos, C.V., Pissinati, A. & Strier, K.B. 1997. Steroid Excretion During the Ovarian Cycle in Captive and Wild Muriquis, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology** **42**: 311-321.

Ziegler, T.E., Scheffler, G., Wittwer, D.J, Schultz-Darken, N., Snowdon, C.T. & Abbott, D.H. 1996. Metabolism of Reproductive Steroids During the Ovarian Cycle in Two Species of Callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and Estimation of the Ovulatory Period from Fecal Steroids. **Biology of Reproduction** **54**: 91-99.

Zunino, G.E., Kowalewski, M.M., Oklander, L.I. & González, V. 2007. Habitat Fragmentation and Population Size of the Black and Gold Howler Monkey (*Alouatta caraya*) in a Semideciduous Forest in Northern Argentina. **American Journal of Primatology** **69**: 966-975.