CÍNTIA GERMANO DA ROCHA

**Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e
testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*,
Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física**

São Paulo
2010

CÍNTIA GERMANO DA ROCHA

Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2287
FMVZ

Rocha, Cíntia Germano

Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física / Cíntia Germano Rocha. -- 2010.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. *Callithrix penicillata*. 2. Testosterona urinária e fecal. 3. Cortisol urinário e fecal. 4. Contenção física. 5. Estresse. 6. Reprodução. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo dos perfis metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) submetidos à contenção física", protocolado sob o nº1304/2008, utilizando 05 (cinco) saguis-de-tufos-pretos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum" da referida Comissão.

We certify that the Research "Study of the profiles of urinary and fecal metabolites of cortisol and testosterone on black tufted-ear-marmoset males (*Callithrix penicillata*) submitted to the physical restraint", protocol number 1304/2008, utilizing 05 (five) black tufted-ear-marmoset, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 18 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROCHA, Cíntia Germano da

Título: Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao meu pai, Germano (in memorian), que me ensinou amar e
respeitar todas as formas de vida, e assim, despertou em mim ainda
criança, o amor pela natureza. Seus exemplos de honradez e
generosidade serão eternos.

A minha mãe, Raimunda, e minhas irmãs, Karen e Eliane, por
acreditar e lutar pelos meus sonhos sem medir esforços.
Esta realização é tão minha quanto de vocês!

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pela graça da vida e por tudo de maravilhoso que nela existe.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**, por acreditar e apostar no meu sonho. Esteve presente em todas as etapas deste projeto, orientando-me com a combinação perfeita entre a racionalidade e sensibilidade. Muito obrigada por transmitir, de forma majestosa, todo o conhecimento necessário para a realização deste trabalho.

A **Cristiane Schilbach Pizzutto**, que mesmo antes de me conhecer já estava presente na minha vida. A grandiosidade do seu trabalho refletiu nas minhas escolhas como um grande divisor de águas. Obrigada por confirmar minhas expectativas e me auxiliar diversas vezes.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa e o auxílio destinado ao projeto.

Ao **Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros** pela oportunidade de desenvolver este estudo, em especial à **Cecília Pessuti, Rodrigo Hidalgo e Adauto Nunes** pelo apoio total durante a fase experimental do projeto.

Ao querido **Vicente**, funcionário exemplar do Zoológico de Sorocaba, pela ajuda essencial durante as colheitas. Obrigada por cuidar com tanto zelo dos “meus” saguis. Você e sua família estão no meu coração.

Ao Veterinário **Fabício** que sugeriu idéias brilhantes que me auxiliaram na colheita das amostras, além de todo o apoio durante a fase experimental. Obrigada!

Aos **residentes, tratadores e demais funcionários do Zoológico de Sorocaba** pela demonstração de interesse e apoio ao meu projeto. Em especial aos estagiários: **Alícia, Mariana, Izabel, Michelle e Rafael** pela ajuda nas colheitas. Obrigada!

A **Awilda**, que veio de tão longe e entrou por acaso no meu caminho, porém sua ajuda foi fundamental na segunda fase de colheita.

A **Priscila Viau Furtado**, por sua dedicação nas dosagens hormonais e por todo envolvimento empregado no decorrer do projeto. Obrigada por me ajudar sempre!

Ao **Marcilo Nichi**, pelo treinamento nas dosagens de creatinina e apoio durante todo o mestrado. Sem contar a boa companhia nos divertidos churrascos do VRA.

A **Harumi Doi Shiraishi**, por seu carinho e eficiente ajuda em todos os momentos!

A todos os **professores, funcionários e alunos do departamento de Reprodução Animal** da FMVZ-USP, pela contribuição e apoio fundamentais durante todo o mestrado.

Aos **funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice** da FMVZ-USP, por todo auxílio durante a incansável busca por informação. Em especial à Elza Faquim, obrigada por sua generosa e fundamental colaboração!

A **Manuela G.F.G. Sgai**, pela amizade e por toda ajuda do início ao fim deste trabalho. O aprendizado que ganhei acompanhando seu mestrado foi essencial! Obrigada pelos bons momentos, às vezes um pouco tensos, mas a seu lado, sempre divertidos.

A **Juliana Anaya Sinhorini**, pelo apoio em todos os momentos e enorme força na reta final deste trabalho. Obrigada minha amiga e, sempre que possível companheira de forró.

A **Marilu Dominique Paladine**, pelo companheirismo e ajuda fundamental em diversos momentos deste trabalho.

A **Eliza Sevghenian**, pela amizade, apoio e colaboração nas pesagens das amostras.

As queridas amigas, **Renina, Flavia e Micheli**, por sempre poder contar com vocês. Obrigada pela indispensável ajuda nestes dois últimos anos.

A minha irmã do coração **Tânia**, que esteve presente em todos os momentos importantes da minha vida, e não foi diferente durante o mestrado. Sua ajuda fez toda a diferença. Obrigada minha amiga por tudo!

A minha querida irmã **Eliane**, por me apoiar do princípio ao fim de forma incondicional. Obrigada pelo carinho!

A minha querida irmã **Karen**, pelas impressões e entre outras colaborações fundamentais. Muito obrigada por sua generosidade e apoio em todos os momentos.

A minha querida mãe **Raimunda**, que diversas vezes abdicou de seus próprios sonhos em prol dos meus. Obrigada por estar presente em todos os momentos da minha vida. Graças a sua ajuda eu consegui realizar este trabalho! Serei eternamente grata!

A minha querida vó **Luzia**, tios e primos que sempre torceram por mim.

Aos meus amados **Poller, Viola, Guinevere, Yasmin e Lenin**, o amor de vocês foi um grande incentivo no início desta caminhada. Saudades... Obrigada, **Lancelot, Chico, Vênus, Lara, Izolda e Matilde**, por encher meus dias de alegria e amor.

A todos os fascinantes primatas não-humanos, em especial **Lucius, Romeu, Jimi, Tom, Figan e Buda**. MUITO OBRIGADA!!!

“É preciso, penso eu, ter renunciado à luz natural, para ousar afirmar que os animais são somente máquinas. Há uma contradição manifesta em admitir que Deus deu aos animais todos os órgãos do sentimento e em sustentar que não lhes deu sentimento.”

“Parece-me também que é preciso não ter jamais observado os animais para não distinguir neles as diferentes vozes da necessidade, da alegria, do temor, do amor, da cólera, e de todos os seus afetos; seria muito estranho que exprimissem tão bem o que não sentem.”

VOLTAIRE

RESUMO

ROCHA, C. G. **Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física.** [Profile study of cortisol and testosterone fecal and urine hormonal metabolites in Black-tufted marmoset males (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submitted to physical restraint]. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

A manutenção de animais em zoológicos, criadouros e centros de reprodução tem como objetivo auxiliar os programas de conservação *in situ* e *ex situ*, além de contribuir para os programas de educação ambiental. A cada dia, torna-se mais clara a importância do bem-estar dos animais cativos, e a redução do estresse é fundamental neste contexto. A contenção manual faz parte do manejo realizado em zoológicos e criatórios para diversos procedimentos, como tratamentos tópicos, colheita de sangue ou sêmen ou mesmo para exames físicos. Sabe-se que este tipo de procedimento provoca resposta do tipo estresse, porém não é claro a intensidade da resposta, ou se este mecanismo fisiológico poderia potencialmente alterar o padrão de secreção de cortisol e/ou testosterona. O objetivo do projeto foi avaliar o efeito da contenção física manual por cinco minutos, sobre os perfis de metabólitos fecais e urinários de testosterona e de cortisol, em cinco machos adultos de sagui-de-tufos-pretos (*C. penicillata*), mantidos em casais, no Parque Municipal Quinzinho de Barros em Sorocaba, SP. Considerando-se o dia da contenção física, como o dia 0, foram colhidas amostras fecais diárias, sempre pela manhã, a partir do dia -5 até o dia + 4. Para as amostras urinárias, foram realizadas múltiplas colheitas diárias, do dia -5 ao +1. As amostras foram dosadas através de radioimunoensaio. Baseado nos resultados encontrados foi verificado que a contenção física de *C. penicillata* por cinco minutos pode induzir resposta do tipo estresse, porém não de forma sustentada ou duradoura. Contudo, a variação individual e a adaptação dos animais às condições experimentais possivelmente desempenharam papel relevante na modulação da resposta.

Palavras-chave: *Callithrix penicillata*. Testosterona urinária e fecal. Cortisol urinário e fecal. Contenção física. Reprodução.

ABSTRACT

ROCHA, C. G. **Profile study of cortisol and testosterone fecal and urine hormonal metabolites in Black-tufted marmoset males (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submitted to physical restraint.** [Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física]. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

The maintaining of animals in Zoo's, breeders and reproduction centers have as objective to help *in situ* and *ex situ* conservation programs , besides contributing to environmental education programs. Every day, the importance of captive animals well being becomes more clear, and the reduction of stress is fundamental in this context. Manual restraining is part of the handling performed in zoos and breeders for many procedures, such as topic treatments, blood or semen draw or even for physical exams. It is known that this kind of procedure provokes a stress response, however the intensity of the response is not clear, or if this physiological mechanism could potentially alter the cortisol and/or testosterone secretion pattern. The objective of the project was to evaluate the effect of manual physical restraint for five minutes, over the fecal and urinary metabolites profiles of testosterone and cortisol, in five adult males of Black tufted marmosets (*C.penicillata*), maintained in couples, at the Parque Municipal Quinzinho de Barros in Sorocaba, SP. Considering the day of physical restraint as day 0, daily fecal samples were collected, always in the morning, starting from -5 until +4. For the urine samples, daily multiple collections were done, from day -5 to +1. The samples were measured with radioimmunoassay. Based on the results found, it was verified that the physical restraining of *C.penicillata* for five minutes can induce a stress response, though not in a sustained or long lasting manner. However, the individual variation and the adaptation of the animals to experimental conditions possibly had a relevant role over the modulation of the response.

Keywords: *Callithrix penicillata*. Fecal and urinary testosterone. Fecal and urinary Cortisol. Physical restraining. Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Macho de sagui-de-tufos-pretos (<i>Callithrix penicillata</i>) – Sorocaba, SP .– 2009.....	28
Figura 2 -	Fêmea e macho de <i>C. penicillata</i> - Sorocaba, SP.-2009.....	36
Figura 3 -	Gaiola utilizada no estudo – Sorocaba, SP. 2009.....	37
Figura 4 -	Gaiola adaptada com bandeja coletora - Sorocaba, SP. 2009.....	37
Figura 5 -	Contenção física pelo método manual de <i>C. penicillata</i> Sorocaba, SP. – 2009.....	38
Figura 6 -	Colheita de amostra fecal – Sorocaba, SP. – 2009.....	39
Figura 7 -	Colheita de amostra urinária – Sorocaba, SP – 2009.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida no ensaio para mensurar metabolitos e urina de testosterona.....	46
Gráfico 2 -	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida no ensaio para mensurar metabolitos fecais de testosterona.....	47
Gráfico 3 -	Representação gráfica da curva de paralelismo obtida no ensaio para mensurar metabolitos fecais de Glicocorticóides.....	47
Gráfico 4 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M1- São Paulo – 2009.....	51
Gráfico 5 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M1 - São Paulo – 2009.....	51
Gráfico 6 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M3 - São Paulo – 2009.....	52
Gráfico 7 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M3 - São Paulo – 2009.....	52
Gráfico 8 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M4 - São Paulo – 2009.....	53
Gráfico 9 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M4 - São Paulo – 2009.....	53
Gráfico 10 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M5 – São Paulo - 2009	54
Gráfico 11 -	Representação gráfica do perfil dos metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M5 – São Paulo - 2009	54
Gráfico 12 -	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M1- São Paulo -2009.....	56
Gráfico 13	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M1 – São Paulo - 2009	56
Gráfico 14	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M3 - São Paulo – 2009.....	57
Gráfico 15	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M3 - São Paulo – 2009.....	57

Gráfico 16	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M4 – São Paulo – 2009.....	58
Gráfico 17	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M4 – São Paulo – 2009.....	58
Gráfico 18	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M5 - São Paulo – 2009.....	59
Gráfico 19	Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M5 - São Paulo – 2009.....	59
Gráfico 20	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M1 - São Paulo – 2009.....	61
Gráfico 21	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal - M1 São Paulo – 2009.....	61
Gráfico 22	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M2 - São Paulo – 2009.....	62
Gráfico 23	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides animal M2 - São Paulo – 2009	62
Gráfico 24	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M3 São Paulo – 2009.....	63
Gráfico 25	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides animal M3 São Paulo – 2009.....	63
Gráfico 26	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal São Paulo – 2009.....	64
Gráfico 27	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M4 São Paulo – 2009.....	64
Gráfico 28	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M5 - São Paulo – 2009.....	65
Gráfico 29	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do ani M5 - São Paulo – 2009.....	65
Gráfico 30	Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de testosterona de todos os animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase I - São Paulo – 2009	66
Gráfico 31	Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de glicocorticóides dos animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase I - São Paulo – 2009.....	66

Gráfico 32	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M1 - São Paulo – 2009.....	68
Gráfico 33	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M1 - São Paulo – 2009.....	68
Gráfico 34	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M2 - São Paulo – 2009.....	69
Gráfico 35	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M2 - São Paulo – 2009.....	69
Gráfico 36	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M3 - São Paulo – 2009.....	70
Gráfico 37	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M3 - São Paulo – 2009.....	70
Gráfico 38	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M4 - São Paulo – 2009.....	71
Gráfico 39	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M4 - São Paulo – 2009.....	71
Gráfico 40	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M5 - São Paulo – 2009.....	72
Gráfico 41	Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M5 - São Paulo – 2009.....	72
Gráfico 42	Representação gráfica do perfis de metabólitos fecais de testosterona e de glicocorticóides do animal M5 - São Paulo – 2009.....	73
Gráfico 43	Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de testosterona dos animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase II - São Paulo – 2009.....	74
Gráfico 44	Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de glicocorticóides dos animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase II - São Paulo – 2009.....	74
Gráfico 45	Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de glicocorticóides nos períodos manhã e tarde durante a linha de base das Fases I e II - São Paulo – 2009.....	75
Gráfico 46	Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de testosterona nos períodos manhã e tarde durante a linha de base das Fases I e II - São Paulo – 2009.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Controle de qualidade dos ensaios de metabolitos de testosterona de machos de Saguís-de-Tufos-pretos (<i>Callithrix penicillata</i>) - São Paulo 2009.....	48
Tabela 2	Tabela 2- Controle de qualidade dos ensaios de metabolitos de glicocorticóides de machos de Saguís-de-tufos-pretos (<i>Callithrix penicillata</i>) - São Paulo – 2009.....	49
Tabela 3	Tabela 3 - Total de amostras colhidas, fecais e urinárias, em relação às fases experimentais I, II e validações GnRH/ACTH	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	OS CALLITRICHIDEOS.....	20
2.1.1	Aspectos gerais.....	20
2.1.2	Aspectos da biologia.....	21
2.1.3	Aspectos reprodutivos.....	23
2.2	O <i>CALLITHRIX PENICILLATA</i> (É. GEOFFROY, 1812).....	27
2.3	O ESTRESSE E SUAS IMPLICAÇÕES.....	29
2.3.1	O estresse e a reprodução.....	31
2.4	MÉTODOS NÃO-INVASIVOS APLICADOS AO ESTUDO ENDÓCRINO- REPRODUTIVO.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	ANIMAIS.....	36
4.2	GAIOLAS.....	37
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.3.1	Tratamento: contenção física.....	38
4.3.2	Processamento das amostras.....	39
4.3.2.1	Colheita das Amostras Fecais.....	39
4.3.2.2	Extração fecal.....	40
4.3.2.3	Colheita das amostras urinárias.....	40
4.3.2.4	Diluição das amostras urinárias.....	41

4.3.3	Ensaio para as dosagens.....	42
4.3.4	Validação.....	42
4.3.4.1	Validação laboratorial.....	42
4.3.4.2	Validação fisiológica.....	43
4.3.5	Controle de qualidade.....	44
4.3.6	Cálculo dos resultados.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	VALIDAÇÃO LABORATORIAL.....	46
5.2	CONTROLE DE QUALIDADE DO ENSAIO HORMONAL.....	48
5.3	PERFIS HORMONAIS DE METABÓLITOS FECAIS E URINÁRIOS DE TESTOSTERONA E GLICOCORTICÓIDES.....	49
5.3.1	Validação fisiológica ACTH.....	50
5.3.2	Validação fisiológica GNRH.....	55
5.3.3	Fase I	60
5.3.4		
5.3.5	Variação diurna nas médias das concentrações dos metabólitos urinários....	75
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O *Callithrix penicillata* é conhecido popularmente como sagui-de-tufos-pretos, sagui-do-cerrado ou mico-estrela. A espécie é nativa das florestas e matas de galerias do bioma cerrado e possui ampla distribuição na natureza, com uma área que vai desde os estados do Maranhão e sudeste do Piauí, ao norte de São Paulo, incluindo a maior parte da Bahia, Minas Gerais e Goiás (RYLANDS, 1993). Porém, em decorrência de introduções, o *C. penicillata* juntamente com o *Callithrix jacchus*, podem ser encontrados com frequência em locais distintos de suas áreas de ocorrência natural (CERQUEIRA, 1998; RUIZ-MIRANDA, 2006). Assim como os demais Callitrichideos exibem um mosaico único de características reprodutivas que os tornam interessantes modelos de estudos. Diferentemente de outros antropóides possuem uma elevada taxa reprodutiva, caracterizada pela produção de filhotes gêmeos com um curto intervalo entre partos. Apesar da proximidade filogenética com o *C. jacchus*, espécie que possui a reprodução amplamente estudada, informações consistentes sobre aspectos endócrino-reprodutivos do macho de *C. penicillata* inexistem na literatura nacional e internacional.

A manutenção de animais em zoológicos, criadouros e centros de reprodução tem como objetivo auxiliar os programas de conservação *in situ* e *ex situ*, além de contribuir para os programas de educação ambiental. A cada dia, torna-se mais clara a importância do bem-estar dos animais cativos, e a redução do estresse é fundamental neste contexto. Os animais selvagens mantidos em cativeiro são muitas vezes submetidos a situações de estresse, causadas por manejo inadequado, má alimentação e pela má qualidade dos recintos. O estresse pode desencadear diferentes respostas fisiológicas e comportamentais, que interferem diretamente nos padrões normais endócrino-reprodutivos dos indivíduos. Condições e procedimentos estressantes repetidos, sabidamente podem interferir com o funcionamento normal dos sistemas endócrino-reprodutivos, sendo conhecidos os efeitos prejudiciais da estimulação prolongada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando em altos níveis de glicocorticóides. A contenção manual faz parte do manejo realizado em zoológicos e criatórios para diversos procedimentos, como tratamentos tópicos, colheita de sangue ou sêmen ou mesmo para exames físicos. Sabe-se que este tipo de procedimento provoca resposta do tipo estresse, porém não é claro a intensidade da resposta, ou se este mecanismo fisiológico poderia potencialmente alterar o padrão de secreção de cortisol e/ou testosterona.

A avaliação do *status* reprodutivo pode ser realizada através do monitoramento de características endócrinas mensuradas no sangue, fezes, urina ou saliva, em resposta a mecanismos fisiológicos (LUTZ et al, 2000). A colheita sanguínea é o método mais tradicionalmente empregado para análises endócrinas e provêm níveis com representação temporal mais acurada dos eventos dinâmicos. Contudo, o uso da matriz sanguínea requer captura, contenção e venopunção dos animais. Como a investigação dos parâmetros endócrinos requer múltiplas colheitas para as análises hormonais a utilização de tal matriz torna-se inviável para a maioria das espécies (SHIMIZU, 2005). Desta mesma forma, a mensuração de hormônios relacionados ao estresse também pode ser de difícil aplicação se o próprio procedimento gerar no animal uma resposta do tipo estresse. Assim, a quantificação de metabólitos fecais e urinários de hormônios esteróides se mostra como uma poderosa alternativa para a monitorização endócrina dos animais selvagens.

Dentre as técnicas mais utilizadas para a mensuração de metabólitos hormonais, podemos citar o radioimunoensaio (RIE) e o enzimaímunoensaio (EIE) como os mais freqüentes. No entanto, como não existem conjuntos comerciais para dosagem de metabólitos fecais e urinários de esteróides, são necessárias validações que permitam o uso destes produtos (HEISTERMANN, 1993; ZIEGLER, 1996; FRENCH, 1996). Portanto, é imprescindível a realização das validações laboratoriais e fisiológicas ou biológicas.

As limitações de conhecimento e de técnicas são grandes desafios para a medicina da conservação e podem ser suplantados pelo avanço da ciência, com o desenvolvimento de técnicas reprodutivas aplicadas aos programas de conservação *in situ* e *ex situ*. Tem-se neste sentido que, a combinação de diferentes abordagens para a conservação pode ser, talvez, a única forma para evitar a extinção e/ou recuperar a população de algumas espécies de animais (ANDRIOLO, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS CALLITRICHIDEOS

Abaixo seguem os aspectos gerais, da biologia e da reprodução dos Callitrichideos.

2.1.1 Aspectos gerais

A ordem Primata é dividida em duas subordens: Strepsirrhini e Haplorrhini. A primeira, Strepsirrhini, inclui os lêmures, os lóris, e a última, Haplorrhini, reúne os társius, os Catarrhini (primatas do velho mundo, *apes* e humanos) e os Platyrrhini (primatas do novo mundo) (GROVES, 2004). Os primatas do novo mundo, também chamados de neotropicais, distribuem-se no continente americano, do sul do México ao norte da Argentina (HERSHKOVITZ, 1977; HIRSCH et al., 2002). Todos os primatas neotropicais são arborícolas e com exceção do gênero *Aotus*, as demais espécies possuem hábitos diurnos (KINZEY, 1997; STRIER, 2003).

A base da sistemática atual dos primatas neotropicais foi estabelecida por Philip Hershkovitz (1977). Contudo ainda hoje está longe de ser definitiva. Segundo a última classificação taxonômica de Rylands et al., (2000), baseada no conceito filogenético de espécie (GROVES, 2004), os primatas neotropicais foram divididos em cinco famílias: Callitrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae. Os Platyrrhini formam o maior grupo da ordem Primata, com 199 espécies e subespécies descritas, aproximadamente 31% do total de primatas não-humanos. Ainda assim é provável que este número aumente nos próximos anos com o avanço da genética molecular, considerando que após 1990 uma espécie foi redescoberta (*Cebus flavius*) (OLIVEIRA; LANGGUTH, 2006), 14 novas espécies (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009) e um novo gênero foram descritos (*Callibella*, antigo *Callithrix humilis*) (VAN ROOSMALE; VAN ROOSMALEN, 2003).

Entre os Callitrichidae, o aumento nas análises de dados sequenciais de DNA nas duas últimas décadas, ampliou o conhecimento sobre as relações filogenéticas (CORTÉZ-ORTIZ, 2009) propiciando assim, uma nova classificação da família. Portanto, a síntese

taxonômica atual dos callitrichídeos inclui sete gêneros: *Callithrix* (os saguis do leste brasileiro), *Mico* (os saguis da região amazônica), *Saguinus* (os micos), *Leontopithecus* (os micos-leão), *Cebuella* (os saguis-leãozinho), *Callibella* (o sagui-anão) e *Callimico* (o Calimico) (RYLANDS et al., 2009 livro *the smallest anthropoids*). Atualmente 61 espécies e subespécies de callitrichídeos são reconhecidas (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009).

O gênero *Callithrix* é representado por seis espécies, todas comumente denominadas de saguis. O *C. aurita*, o *C. flaviceps*, o *C. geoffroyi* e o *C. kuhlii* ocorrem na mata atlântica das regiões sudeste e nordeste, o *C. jacchus* é nativo da caatinga e mata atlântica do nordeste e o *C. penicillata* proveniente do cerrado, na região central e leste do Brasil. Contudo, em decorrência da ação antrópica, tanto o *C. jacchus* quanto o *C. penicillata* podem ser encontrados em áreas originalmente distintas de suas áreas de ocorrência natural (RYLANDS, 2009).

2.1.2 Aspectos da biologia

Os callitrichídeos ocorrem somente na América do Sul e diferentemente de outros, primatas neotropicais, como por exemplo, alguns Cebídeos e Atelídeos, ocupam um nicho que não é explorado por nenhum outro primata na região paleotropical (África, Madagascar e Ásia), logo assim, compartilham características consideradas incomuns entre os demais antropóides (EISENBERG, 1977).

A família Callitrichidae abriga os menores antropóides existentes, com gêneros que variam de aproximadamente 100-120 g de peso, como o *Cebuella*, a no máximo 500-700 g no caso do *Leontopithecus*. Além do pequeno tamanho, os callitrichídeos apresentam outras características altamente especializadas, que incluem unhas como garras em todos os dígitos, com exceção do *hallux*, que os permite desenvolver um deslocamento vertical em troncos e ausência ou redução do terceiro molar em mandíbula e maxila (HERSHKOVITZ, 1977; SUSSMAN; KINZEY, 1984; GARBER et al., 1996; JURKE, 1996; VAN ROOSMALEN; VAN ROOSMALEN, 2003).

A alimentação dos Callitrichídeos é baseada em três itens principais: insetos, frutos, flores e néctar, e exsudatos de plantas (seiva, goma e resina). Entretanto, a frequência com que cada alimento é utilizado varia conforme a estratégia de forrageamento e a técnica de exploração de cada espécie (SUSSMAN; KINZEY, 1984). Os exsudatos de plantas são fontes

ricas em carboidratos, minerais e água, contudo a prática da gomivoria necessita de adaptações morfológicas, sendo considerada rara entre os mamíferos (POWER, 1996). Entre os Callitrichideos a gomivoria é bastante freqüente, principalmente quando há escassez dos demais recursos alimentares (FERRARI; DIGBY, 1996) e a presença de características derivadas na dentição, mandíbula e morfologia intestinal parecem estar diretamente relacionadas ao uso dos exsudatos na dieta, principalmente em *Callithrix pygmaea* (atual *Cebuella pygmaea*), *C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. flaviceps* e *C. kuhlii* (GARBER, 1992). O mesmo padrão não é encontrado nos gêneros *Saguinus*, *Callimico* e *Leontopithecus*, nos quais a gomivoria ocorre na maioria das vezes de forma oportunista (RYLANDS, 1988; GARBER et al., 1996).

Os saguis e micos, como também são chamados os Callitrichideos, habitam ambientes completamente distintos, sugerindo uma grande diversidade ecológica e comportamental, mas de modo geral preferem áreas com menor cobertura vegetal, quando comparados aos Cebídeos (SUSSMAN; KINZEY, 1984). Os habitats explorados por esses primatas variam das secas florestas semi-decíduas da América Central e norte da Colômbia às úmidas florestas Amazônica e Atlântica do Brasil; das matas de galeria, bosques e áreas tipo savana na Amazônia, o cerrado na região central do Brasil à caatinga do nordeste brasileiro e o *chaco* da Bolívia e Paraguai (RYLANDS, 1989).

Normalmente, os gêneros *Callithrix* e *Saguinus* habitam áreas de matas marginais ou de crescimento secundário, com densa vegetação de sub-bosque, onde são abundantes pequenas presas e também provém refúgio contra predadores. Contudo, podem utilizar matas primárias e até mesmo habitats degradados demonstrando grande flexibilidade ecológica e comportamental (OLIVEIRA; FERRARI, 2008). Ocupam áreas onde se encontram espécies de árvores produtoras de goma, porém com pouca disponibilidade de frutos maiores ao longo do ano, o que torna este ambiente perfeito para os saguis e os micos, porém limitado aos primatas maiores, evitando assim, uma competição interespecífica (SUSSMAN; KINZEY, 1984; RYLANDS, 1996).

O menor dos Callitrichideos, o *Cebuella*, necessita de florestas inundadas e inalteradas alteradas, em virtude de seu pequeno tamanho e o uso de uma pequena área de vida, utiliza a gomivoria como fonte obrigatória de carboidratos. Enquanto que os *Leontopithecus*, os maiores Callitrichideos, utilizam uma área de vida relativamente maior e são essencialmente adaptados ao forrageamento de insetos e pequenos vertebrados, que ocorrem de forma abundante em locais específicos em florestas maduras, como no interior de bromélias (RYLANDS, 1996).

2.1.3 Aspectos reprodutivos

Os Callitrichideos exibem um mosaico único de características reprodutivas que os tornam objetos de estudos em diferentes linhas de pesquisa. Diferentemente de outros antropóides possuem uma elevada taxa reprodutiva, caracterizada pela produção de filhotes gêmeos com um curto intervalo entre partos. Com exceção do *Callimico*, que tipicamente produz um único descendente em cada gestação, uma vez ao ano, todos os demais membros da família geram regularmente filhotes gêmeos. Como o período de gestação da maioria dos Callitrichideos varia entre 130 a 150 dias, muitas espécies são capazes de obter duas gestações no ano (EISENBERGER, 1977; HERSHKOVITZ, 1977; HEARN, 1983; POWER, et al., 2003; VAN ROOSMALEN; VAN ROSMALEN, 2003).

Em geral, o *C. jacchus* produz dois filhotes por gestação (70% dos nascimentos) e nascimentos triplos ou de apenas um filhote não são comuns (20% e 10% respectivamente). Na maioria das vezes o registro de um único filhote, representa o sobrevivente de uma gestação dupla, onde um dos gêmeos pode ter sido abortado ou reabsorvido no início do desenvolvimento embrionário (HERSHKOVITZ, 1977; HEARN, 1983; HAIG, 1999).

Outra particularidade rara exibida pelos Callitrichideos é a produção de gêmeos dizigóticos que compartilham a mesma circulação placentária durante o desenvolvimento embrionário, através de anastomoses e conexões vasculares com o disco placentar, e por isso, possuem compatibilidade imunológica. Mas apesar do quimerismo sanguíneo, o *freematinismo* não ocorre em gêmeos heterossexuais (SUSSMAN; KINZEY, 1984; HAIG, 1999).

Em decorrência do alto gasto energético necessário para a reprodução dos Callitrichideos, o número de filhotes produzidos pode estar relacionado com a disponibilidade e a qualidade dos recursos alimentares. Portanto, sob condições de cativeiro, a taxa reprodutiva pode ser maior, através do aumento no tamanho da ninhada, com nascimentos duplos ou triplos, ou pelo aumento do número de gestações produzidas no ano (DE VLEESCHOUWER, 2003).

O intervalo entre partos na maioria das espécies de Callitrichideos é bastante curto se comparado aos demais primatas, de seis meses (no cativeiro) ou 12 meses (no cativeiro e em vida livre) (EISENBERG, 1977). Um estudo que comparou dados de populações na natureza de *Callithrix jacchus*, *C. flaviceps* e *C. intermedia* (atual *Mico intermedius*) verificou um intervalo entre partos de cinco a oito meses (FERRARI; DIGHY, 1996). O fator decisivo

atribuído ao aumento da taxa reprodutiva nos Callitrichideos ao longo da evolução foi o uso de exsudatos de plantas como recurso alimentar, possivelmente através do aumento na concentração de cálcio para as fêmeas reprodutoras e por prover uma fonte de alimento contínua (AH-KING; TULLBERG 2000).

Na maioria das espécies de primatas não-humanos ocorre uma diminuição da fertilidade após o parto, com inibição da ovulação e redução ou abolição da atividade sexual. Em decorrência da lactação são gerados estímulos neurais e níveis elevados de prolactina, que levam à supressão da produção de gonadotropinas (McNEILLY, 2006). Consequentemente, o período entre o parto e a próxima ovulação é estendido se houver amamentação e cuidados com o filhote (ZIEGLER et al., 1990).

No entanto, entre os Callitrichideos a lactação parece não desempenhar o mesmo efeito sobre a reprodução. Em algumas espécies o aleitamento interfere de modo limitado na fertilidade da fêmea, como em *Saguinus oedipus*, onde foi verificado uma taxa elevada de concepção pós-parto e um intervalo curto, de 10 dias, entre o parto e ovulação, contudo o número de filhotes amamentados e a frequência dos cuidados dispensados aos neonatos pode atrasar a ovulação (ZIEGLER et al., 1990). Em outras espécies como *C. jacchus*, os altos níveis de prolactina e a manutenção do estímulo do aleitamento não inibem necessariamente o crescimento folicular e a ovulação (McNEILLY, 1981; HEARN, 1983). Deste modo, como em alguns casos não há um período anovulatório pós-parto considerável, as fêmeas reprodutoras podem estar prenhes quando seus filhotes ainda estão com 10 dias de vida, e assim tornam-se simultaneamente prenhes e lactantes (HEARN, 1983). A ovulação pós-parto também foi descrita nos gêneros *Callimico* (JURKE, 1996) e *Cebuella* (CARLSON, 1997).

Em circunstâncias normais, as mães de Callitrichideos não podem criar os filhotes gêmeos sozinhas, além do custo energético atribuído a amamentação e em algumas espécies ainda associada à prenhez, a soma do peso dos filhotes ao nascimento pode exceder 10% do peso da mãe. Em alguns casos extremos, o peso dos filhotes combinados aproxima-se de 28% do peso da mãe (EISENBERG, 1977). Por isso, para a criação dos filhotes, há necessidade da ajuda do pai ou de outros membros do grupo, geralmente os irmãos mais velhos, que são chamados de ajudantes. Basicamente são distinguíveis três tipos mais frequentes de ajudantes: indivíduos imaturos que permanecem no grupo natal atuando como ajudantes até adquirirem seu próprio território reprodutivo, machos adultos que agem como satélites não reprodutivos no território de outro macho a fim de herdar uma fêmea e as coalisões de machos que defendem o acesso às fêmeas e apresentam acasalamentos poliândricos (DUNBAR, 1994 b). Na maioria dos Callitrichideos o pai desempenha com maior frequência o papel de ajudante,

porém o mesmo padrão não foi observado em *Callimico* e no *Callibella*, onde mãe é quem mais carrega o filhote. (SCHRADIN, 2001; VAN ROOSMALEN; VAN ROOSMALEN, 2003).

Os saguis e micos apresentam uma flexibilidade em relação ao sistema de acasalamento bastante evidente. A forma como machos e fêmeas reprodutores se relacionam varia tanto entre as espécies, como entre grupos de uma mesma espécie, de acordo com as diferenças no habitat e nas condições demográficas (STREIR, 2000). No cativeiro, os *Callitrichideos* normalmente formam grupos familiares, com um par reprodutor monogâmico, de modo similar, o mesmo padrão se repete na natureza, mas grupos poligínicos e poliândricos também são observados (ABBOTT; HEARN, 1978; DUNBAR, 1994 a; SHAFFNER; FRENCH, 2004; DECANINI; MACEDO, 2008).

Embora grupos de *Callitrichideos* sejam normalmente compostos por mais de um indivíduo em idade reprodutiva, a produção de filhotes é tipicamente realizada por um único casal na maioria das espécies. A ausência de sucesso reprodutivo em indivíduos subordinados é verificada através da inibição fisiológica e/ou comportamental da atividade reprodutiva (ABBOTT; HEARN, 1978; ZIEGLER, 1987; SMITH; FRENCH, 1997). Os saguis e micos vivem em grupos sociais e possuem taxa elevada de reprodução, por isso a inibição reprodutiva pode ser uma resposta evolutiva a fatores ecológicos, como a limitação dos recursos alimentares (RYLANDS, 1996). Por outro lado, determinantes sociais também justificam a supressão reprodutiva. Em grupos formados basicamente por membros familiares, a inibição da reprodução pode evitar cruzamentos entre indivíduos aparentados. Por exemplo, quando animais em inatividade reprodutiva são retirados do grupo natal ou entram em contato com indivíduos do sexo oposto durante os encontros intergrupais, podem apresentar potencial reprodutivo (BAKER, 1999; GINTHER, 1999).

A supressão reprodutiva das fêmeas subordinadas ocorre por meio endócrino, em decorrência da secreção inadequada de gonadotrofina, porém diferentemente de outras espécies, não ocorre aumento da secreção de cortisol e prolactina (ABBOTT, 1981). As fêmeas reprodutoras regulam a função reprodutiva de suas filhas e das subordinadas através de sinais olfatórios, visuais e comportamentais (PUFFER, 2004). As consequências endócrinas da subordinação são rápidas e reversíveis: quando uma fêmea apresentando ciclicidade ovariana é introduzida num grupo social onde ela se tornará subordinada comportamentalmente, os níveis plasmáticos de hormônio luteinizante (LH) declinam severamente em 1 a 4 dias e o ciclo ovariano cessa rapidamente. Ao contrário, quando removidas de um grupo social, fêmeas subordinadas anovulatórias mostram igualmente rápida

reversão destas mudanças endócrinas e usualmente ovulam dentro de 2 a 3 semanas (ABBOTT et al., 1988).

Entretanto, o fato de fêmeas subordinadas não se reproduzirem difere entre as espécies e o contexto social. Em *C. jacchus*, a maioria das fêmeas subordinadas que vivem em grupos formados por indivíduos não aparentados apresentam aciclicidade ovariana (ABBOTT, 1981). Contudo, a supressão da atividade reprodutiva não é o fenômeno absoluto e algumas fêmeas de *C. jacchus* (ABBOTT, 1984), *Callimico* (JURKE, 1996) e *Cebuella* (CARLSON, 1997) apresentam atividade ovariana mesmo na presença da mãe, desde que haja um macho não aparentado. Ao contrário, fêmeas subordinadas de *Saguinus* são inibidas por mecanismos primariamente fisiológicos, por exemplo, fêmeas de *S. oedius* mantidos em colônias nunca exibem ciclicidade ovariana dentro de seu grupo natal (ZIEGLER, 1995). O mesmo padrão não foi observado no gênero *Leontopithecus* para animais que vivem em condições de cativeiro, diferentemente dos demais Callitrichídeos, não apresenta evidências de inibição reprodutiva de fêmeas subordinadas por dominantes e nem de filhas pelas mães. Embora, as oportunidades reprodutivas para as fêmeas subordinadas na natureza sejam relacionadas às cópulas com machos de outros grupos (FRENCH, 2003).

Diferentemente, em machos com relação afiliativa, a inibição reprodutiva de indivíduos não reprodutores ocorre principalmente por restrição comportamental, sem comprometimento hormonal, permitindo-o responder potencialmente a oportunidades reprodutivas (BAKER, 1999; GINTER, 1999; CASTRO; SOUSA, 2005). Todavia, machos adultos subordinados de *Leontopithecus rosalia*, que não possuem relação de parentesco com o dominante, demonstram níveis inferiores de andrógenos quando comparados aos dominantes (BALES, 2006).

A testosterona afeta as funções e o desenvolvimento das características reprodutivas no macho, tais como: gametogênese, comportamento sexual e as características sexuais secundárias. Todas essas características contribuem para o sucesso reprodutivo do macho. Contudo, a manutenção de altos níveis de testosterona gera um alto custo para o indivíduo, associados à diminuição da função imune, diminuição das reservas de energia e diminuição do investimento parental (ROSS; FRENCH; PATERA, 2004). Em espécies onde ocorre ampla variação do sucesso reprodutivo entre machos, o custo de altas concentrações de testosterona é compensado pelo aumento do sucesso reprodutivo, contudo espécies monogâmicas que apresentam cuidado parental os níveis testosterona tornam-se elevados somente nos períodos de conquista de par e de território, e permanecem baixos durante o resto do ano (WINGFELD, 1990). Os níveis de testosterona podem aumentar antes da estação

reprodutiva ou durante conflitos internos ou externos. Em machos de *C. kuhlii* foi verificado que as concentrações de metabólitos urinários de testosterona aumentam em resposta a encontros com indivíduos intrusos, com altos níveis de comportamento agressivo (ROSS; FRENCH; PATERA, 2004). Outro estudo, também com *C. Kuhlii* verificou que os níveis de metabólitos urinários de testosterona declinaram no período pós-parto, e relacionou concentrações menores de metabólitos urinários de testosterona e estradiol aos machos que apresentaram maior comportamento de carregar os filhotes (NUNES et al., 2000). Contudo, em *S. mystax* não houve aumento significativo de metabólitos fecais de testosterona correlacionados a taxas de encontros entre grupos e nem em situações de instabilidade social, mas foi observado aumento nos de andrógenos logo após o nascimento de filhotes (HUCK et al., 2004). Por outro, em machos de *C. jacchus* houve correlação do cuidado parental somente com os níveis séricos de prolactina, sem apresentar diferença significativa nos níveis de testosterona (DIXON; GEORGE, 1982)

2.2 O *CALLITHRIX PENICILLATA* (É. GEOFFROY, 1812)

O *Callithrix penicillata* (Figura 1) é conhecido popularmente como sagui-de-tufos-pretos, sagui-do-cerrado ou mico-estrela. Assim como os demais Callitrichídeos, possui hábitos arborícolas e um pequeno porte, com peso entre 300 a 450 g (RYLANDS, 2000; DECANINI; MACEDO, 2008b). Um estudo que avaliou índices fisiológicos em *C. penicillata* mantidos sob condições de cativeiro, obteve pouca variação de peso entre os adultos machos (260 a 450g) e as fêmeas (330 a 400 g) (BOERE, 2005).

A espécie é nativa das florestas e matas de galerias do bioma cerrado e possui ampla distribuição na natureza, com uma área que vai desde os estados do Maranhão e sudeste do Piauí, ao norte de São Paulo, incluindo a maior parte da Bahia, Minas Gerais e Goiás (RYLANDS, 1993). Porém, em decorrência de introduções, o *C. penicillata* juntamente com o *C. jacchus*, podem ser encontrados com frequência em locais distintos de suas áreas de ocorrência natural (CERQUEIRA, 1998; RUIZ-MIRANDA, 2006).

Com uma dieta composta principalmente de exsudados de plantas, o *penicillata* está entre os principais gomívoros do gênero *Callithrix*. Alimentando-se também de frutas, invertebrados, néctar, mel e ovos de pássaros (MIRANDA; FARIA, 2001).

O *C. penicillata* vive em grupo de 2 a 13 membros com relação de parentesco, a baixa taxa de comportamentos agonísticos observada entre os membros de *C. penicillata*, dificulta a determinação de uma relação de dominância linear, contudo a estrutura social sugere que a fêmea reprodutora seja a dominante no grupo. Normalmente apenas um casal se reproduz e os demais membros auxiliam na criação dos filhotes, porém o sistema de acasalamento, assim como os demais Callitrichideos, apresenta flexibilidade intra-específica. No entanto, dados comportamentais sugerem que a monogamia com associação de ajudantes seja o predominante. (MIRANDA; FARIA, 2001; DECANINI; MACEDO, 2008a).

A fêmea de *C. penicillata* possui alta taxa reprodutiva, apresentando duas gestações durante o ano, quase sempre com nascimento de filhotes gêmeos (MIRANDA; FARIA, 2004; VILELA; FARIA, 2004). O ciclo ovariano determinado para a espécie é em média de $23,5 \pm 10$ dias (PALADINE, 2009). Apesar da proximidade filogenética com o *C. jacchus*, espécie que possui a reprodução amplamente estudada (LI, 2005), informações consistentes sobre aspectos endócrino-reprodutivos do macho de *C. penicillata* inexistem na literatura nacional e internacional

Figura 1 – Macho de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) – Sorocaba, SP. - 2009

2.3 O ESTRESSE E SUAS IMPLICAÇÕES

Durante o ciclo de vida dos vertebrados, os efeitos entre a interação do meio ambiente e o organismo geram uma série de reações endócrinas e neurais conhecidas como resposta ao estresse. O fundador do estudo sistemático ao estresse foi o médico Hans Selye. Em 1936, durante uma série de experimentos efetuados com animais de laboratório Selye, observou que os organismos respondiam de uma maneira estereotipada a uma ampla variedade de agentes, tais como: infecções, intoxicações, traumatismos, emoções, frio, calor, fadiga muscular, irradiações, etc. As ações específicas de todos estes agentes eram totalmente distintas. Sua característica em comum era produzir um sofrimento geral do organismo. Esta resposta estereotipada de manifestações somáticas e inespecíficas foi denominada “estresse” sistemático (SELYE, 1954). Posteriormente Selye (1974) considerou estresse como um recurso fisiológico para adaptação a qualquer evento desafiador da homeostase, inclusive sendo inerente a todos os seres vivos. Apesar de Selye, definir estresse como uma resposta não específica, existe vários exemplos de heterogeneidade da resposta neuroendócrina que diferencia o estressor, particularmente na fase inicial da resposta e no estresse severo, sugerindo que a resposta pode até certo grau ser específica ao estressor (FERIN, 2006)

De maneira geral o estresse pode ser considerado como uma interação adaptativa neuroendócrina e comportamental de um organismo, hígida ou patológica, com os desafios que potencialmente possam danificar o equilíbrio entre os sistemas internos. Pode-se dizer que estresse é um mecanismo de defesa do organismo, para os desafios cotidianos ou extraordinários, envolvendo primariamente vias neuroendócrinas que sustentam o comportamento adaptativo (SOUZA, 2002). O conceito mais frequentemente usado define o estímulo ambiental, que gera um desequilíbrio da homeostase como “estressor”, e a reação de defesa desencadeada, como “resposta ao estresse” (MÖSTL; PALME, 2002). Entretanto, o termo estresse também é utilizado para descrever processos do ciclo de vida, que não envolvam perturbações ambientais. É comum o uso da palavra estresse com o significado de aumento na demanda metabólica, por exemplo, o “estresse da reprodução” (WINGFIEL, 2005)

Alguns pesquisadores introduziram o modelo de alostase para explicar em longo prazo a resposta adaptativa ao estresse. A alostase, estabilidade durante a mudança, é um sistema teórico que integra a demanda metabólica do ciclo de vida normal (eventos previsíveis) com as perturbações do ambiente (eventos imprevisíveis). Além disso, a alostase inclui a

habilidade para antecipar mudanças ambientais e assumir modificações para que haja adaptação. Enquanto a homeostase clássica resulta em ajuste da morfologia, fisiologia e do comportamento após ou durante, a mudança do ambiente (aclimação) (WINGFIELD, 2005).

Embora não tão estereotipada como já se pensou no passado, a resposta ao estresse tipicamente envolve dois eixos: o simpático-adrenal-medular, que resulta na produção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e o hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (cortical) responsável pela liberação de glicocorticóides (cortisol e corticosterona) (SAPOLSKY, 2000). Através das respostas destes dois sistemas o organismo pode suprir as necessidades metabólicas necessárias para enfrentar o desafio (FERIN, 2006).

As glândulas adrenais têm um papel-chave na reação ao estresse uma vez que estão envolvidas tanto no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como no sistema simpático-adrenal-medular. Em praticamente todos os níveis taxonômicos dos vertebrados é reconhecido o envolvimento das adrenais ou glândulas homólogas na reação de estresse. Reações adversas desencadeiam respostas das adrenais, que resultam no aumento na secreção de glicocorticóides e/ou catecolaminas (MÖSTL; PALME, 2002). Os glicocorticóides são conhecidos como os principais hormônios presentes e que desencadeiam, uma série de reações ao estresse, inclusive em respostas a situações estressantes consideradas fisiológicas, como a cópula, o parto e a caça (SAPOLSKY, 2000).

O cortisol é o principal glicocorticóide dos primatas e pertence à mesma “superfamília” dos hormônios esteróides sexuais, todos são derivados de colesterol e compartilham um receptor com propriedade similar de ligação (BERCOVITCH; ZIEGLER, 2002). O cortisol é um importante biomarcador que pode refletir a alocação energética entre sobrevivência e outras necessidades do ciclo de vida, a mensuração do cortisol provém informações sobre fatores fisiológicos que podem influenciar o *fitness* (ANESTIS, 2005). Por isso, a mensuração das concentrações do cortisol é muito utilizada para avaliar a intensidade da resposta frente ao estresse em primatas (COE, 1982). Particularmente nos primatas do novo mundo observa-se o fenômeno de “resistência ao cortisol”, que foi caracterizado por hipercortisolemia sem que haja possíveis efeitos deletérios no organismo. Os altos níveis de cortisol circulante são resultado da diminuição da afinidade dos receptores de glicocorticóides a essas moléculas (FULER; SMITH; ROGERSON, 2004). O estado fisiológico da “resistência ao estresse” é pobremente conhecido em termos fisiológicos e comportamentais (BOERE et al., 2005).

A resposta ao estímulo estressante agudo, conhecida como luta ou fuga, ocorre em questão de segundos, primeiramente com ativação do eixo simpático-adrenal-medular,

desencadeando a liberação de adrenalina e noradrenalina, que irão melhorar as aptidões através da mobilização de energia. Possui funções adaptativas, fazendo uma triagem de processos não essenciais a sobrevivência imediata. Um pouco mais lentamente, sobre o curso de minutos, ocorre ativação do eixo HPA, que confere uma complexa sequência de eventos hormonais e neuro-hormonais, com vários pontos de retroalimentação negativa, cuja finalidade última, acredita-se, é a mediação pelo cortisol no controle da homeostase (SAPOLSKY, 2000; SOUZA, 2002).

Contudo, no estresse crônico severo (períodos prolongados com alta concentração de cortisol) pode inibir a produção de anticorpos e a resposta inflamatória, diminuir o *fitness* as aptidões individuais pela imunossupressão, atrofia de tecidos, ulcerações no trato gastrointestinal, anovulação, impotência, osteoporose, indução ou piora de hipertensão arterial, diabetes (tipo II) insulina-resistente e nanismo psicogênico (MUNCK, 1984; SAPOLSKY, 2000).

Entre os primatas da família Callitrichidae, ao contrário dos primatas do velho mundo, que apresentam relação da atividade do eixo HPA com a posição social, estudos apontam não existir tal relação (ZIEGLER, 1995). O paradigma que assume que os primatas de baixa posição social estão sujeitos a altos níveis de estresse social e nutricional, sendo caracterizados por maiores níveis de cortisol e reduzido sucesso reprodutivo, se mostra cada vez mais inadequado em diversas de espécies. Segundo o modelo alternativo criado por Bercovitch e Ziegler (2002), a atividade reprodutiva irá aumentar a demanda metabólica e elevar o “estresse”. Os autores propõem que os animais desenvolveram uma flexibilidade fisiológica para aumentar demanda energética durante a atividade de acasalamento através do aumento das concentrações de esteróides sexuais e adrenal sem prejudicar o sucesso reprodutivo. Os efeitos do estresse são modulados pelas interações sociais positivas entre os primatas, que diminuem a potencialidade do impacto negativo da circulação dos glicocorticóides no processo reprodutivo.

2.3.1 O estresse e a reprodução

Existem numerosas alterações fisiológicas que ocorrem durante a resposta ao estresse, que possibilitam o sucesso do organismo frente ao desafio estressor, contudo o “efeito colateral” de tal resposta é o de postergar tarefas não essenciais. Então, durante a resposta ao

estresse espera-se um efeito inibitório no sistema reprodutivo e um aumento nas taxas de infertilidade (FERIN, 2006).

O sistema reprodutivo está sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonada (HHG) e estudos descrevem o estresse como modulador do eixo, sugerindo a possibilidade de relação entre HHG e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (CAMERON, 1997). Os hormônios relacionados ao estresse podem influenciar as funções sexuais em três níveis do eixo HHG: no hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH, na hipófise, interferindo por ação do GnRH na liberação do hormônio luteinizante (LH) e nas gônadas, alterando o efeito estimulatório das gonadotropinas na produção de esteróides sexuais (RIVIER; RIVEST, 1991).

Em mulheres, condições de estresse podem levar a supressão do ciclo menstrual em uma síndrome denominada amenorréia hipotalâmica funcional. Quando atinge o grau máximo, tal síndrome é caracterizada pela quiescência ovariana, amenorréia e infertilidade (FERIN, 1999). Os primatas não-humanos se mostram particularmente sensíveis aos impactos reprodutivos causados pelo estresse, em decorrência de condições psicossociais associados a encontros agressivos e baixa posição social (O'BYRNE; LUNN; DIXSON, 1988; JOHNSON, 1991; CAMERON, 1997; SALTZMAN, 1998; SAPOLSKY, 1995; ABBOTT, 2003) e condições de cativeiro (HOSEY, 2005; PIZZUTTO, 2006; PIZZUTTO et al., 2010).

2.4 MÉTODOS NÃO-INVASIVOS APLICADOS AO ESTUDO ENDÓCRINO-REPRODUTIVO

Recentes estudos que correlacionam medidas comportamentais e hormonais em primatas não humanos, ofertam novas descobertas sobre várias espécies e os custos e benefícios de estratégias comportamentais e suas regulações endócrinas, além de possibilitar um entendimento mais apurado da evolução do comportamento social (ZIEGLER et al., 2005; PONTES, 2006; SGAI, 2007; MATTLE; PRYCE; ANZENBERGER, 2008, PIZZUTTO, 2010).

A avaliação do *status* reprodutivo pode ser realizada através do monitoramento de características endócrinas mensuradas no sangue, fezes, urina ou saliva, em resposta a mecanismos fisiológicos. A colheita sanguínea é o método mais tradicionalmente empregado para análises endócrinas e provém níveis com representação temporal mais acurada dos eventos dinâmicos. Contudo, o uso da matriz sanguínea requer captura, contenção e

venopunção dos animais (SHIMIZU, 2005). Como a investigação dos parâmetros endócrinos requer múltiplas colheitas para as análises hormonais a utilização de tal matriz torna-se inviável para a maioria das espécies. Desta forma, pesquisadores em diferentes países, desenvolveram estudos de endocrinologia reprodutiva para diferentes espécies, utilizando os chamados métodos não-invasivos, quais sejam extração e dosagem de metabólitos de esteróides sexuais (MOBERG, 1985; ZIEGLER, 1990; LIPTRAP, 1993; DOBSON; SMITH 1995; CARLSTEAD, 1996; FRENCH, 1996).

Os esteróides e os hormônios peptídeos hipofisários podem ser mensurados no soro, plasma, urina, saliva (LUTZ et al., 2000) e fezes (apenas para os esteróides), além de alguns neurotransmissores encontrados no fluido cerebroespinal (WHITTEN; BROCMAN; STAVISKY, 1998a). O método mais utilizado para o monitoramento endócrino-reprodutivo em primatas tem sido a extração e mensuração de metabólitos hormonais em fezes e urina. (HEISTERMANN, 1993; ZIEGLER, 1996; SMITH, 2004; PALME, 2005).

A via de excreção dos metabólitos hormonais varia conforme a espécie e o hormônio estudados, necessitando estudos prévios para determinação da matriz mais adequada. Um estudo que comparou a excreção de metabólitos de testosterona em fezes e urina em três espécies diferentes de primatas não humanos, macaco-de-cauda-longa (*Macaca fascicularis*), sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) e chimpanzé (*Pan troglodytes*), concluiu que em todos os animais avaliados os metabólitos de testosterona foram predominantemente excretados pela urina, variando entre as espécies de 67 %, 80 % e 91 % respectivamente, de forma similar a outros mamíferos, incluindo os humanos, porém diferentemente dos carnívoros (MÖHLE et al., 2002). Os metabólitos de cortisol apresentaram resultado similar em *C. jacchus*, com 81,7 % da eliminação via urina e 18,3% via fezes (BAHR et al., 2000).

Os esteróides urinários são excretados mais rapidamente que os esteróides fecais. Em *C. jacchus* o pico de excreção dos metabólitos urinários de testosterona e de cortisol é aproximadamente de 2 horas e 2,5 horas respectivamente. Enquanto, para metabólitos fecais, o curso para excreção do cortisol é de 8 a 24 horas e da testosterona é de 4 a 24 horas (BAHR et al., 2000; MÖHLE et al., 2002).

A mensuração de hormônios relacionados ao estresse pode ser de difícil aplicação se o próprio procedimento gerar no animal uma resposta do tipo estresse. Assim, a quantificação de metabólitos fecais e urinários de hormônios adrenais se mostra como uma poderosa alternativa para a monitorização de resposta ao estresse ambiental e social para vários mamíferos (KEAY et al., 2006).

Os glicocorticóides são esteróides adrenais secretados em resposta ao estímulo do estresse e também oferecem informações a respeito do bem-estar fisiológico do animal (WHITTEN et al, 1998b). Vários estudos em primatas estabeleceram correlações significativas entre corticosteróides fecais e séricos (STAVISKY et al., 1995; WASSER et al., 1997; WHITTEN, 1997).

Existe uma periodicidade sazonal e circadiana em várias funções endócrinas, entretanto nos metabólitos hormonais ocorre uma atenuação de tal variação. Portanto, é importante determinar a variação diária na excreção de metabólitos hormonais nas diferentes matrizes para que haja uma padronização das colheitas. A variação circadiana é claramente observada em valores hormonais séricos e plasmáticos, também os metabólitos hormonais urinários apresentam concentrações variáveis conforme o período do dia. Em chimpanzés (*Pan troglodytes*) os metabólitos urinários de cortisol e de testosterona apresentam níveis maiores no período da manhã (MULLER; LIPSON, 2003). Porém, no caso de matriz fecal, o perfil de metabólitos de andrógenos e de cortisol em indivíduos machos de *C. jacchus* não demonstrou variação com o ciclo claro-escuro (RAMINELLI et al., 2001; CASTRO; SOUZA, 2005).

Dentre as técnicas mais utilizadas para a mensuração de metabólitos hormonais, podemos citar o radioimunoensaio (RIE) e o ensaimunoensaio (EIE) como os mais freqüentes. No entanto, como não existem conjuntos comerciais para dosagem de metabólitos fecais e urinários de esteróides, são necessárias validações que permitam o uso destes produtos (HEISTERMANN, 1993; FRENCH, 1996; ZIEGLER, 1996).

Todo imunoensaio deve ser submetido à validação analítica (laboratorial) que a avaliará a sensibilidade, acurácia, precisão e reações cruzadas presentes nos metabólitos hormonais. Outra etapa imprescindível para a obtenção de resultados fidedignos, a partir de amostras fecais e urinárias é a validação fisiológica, qual seja a estimulação da produção do hormônio avaliado, seguida da mensuração dos metabólitos correspondentes nas matrizes fecal e urinária. Assim, a validação fisiológica deve ser conduzida para demonstrar que a técnica utilizada é capaz de detectar variações dos metabólitos de esteróides em níveis fecais e urinários comparáveis as concentrações dos esteróides no sangue (PALME, 2005).

3 OBJETIVOS

- Avaliar se a contenção física manual produz alterações significativas nos níveis de metabólitos fecais e/ou urinários de cortisol e testosterona.
- Verificar qual das matrizes biológicas, fezes ou urina, é a mais adequada para avaliar as variações dos metabólitos dos hormônios testosterona e cortisol, na espécie *C. penicillata*.
- Avaliar o efeito da variação diurna sobre nos níveis de metabólitos hormonais urinários de cortisol e testosterona.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritos os materiais e os métodos empregados no estudo.

4.1 ANIMAIS

Neste projeto foram estudados cinco machos de *Callithrix penicillata*, adultos, pertencentes ao Parque Municipal Quinzinho de Barros, localizado no município de Sorocaba, São Paulo. Os animais foram denominados Lucius (M1), Romeu (M2), Jimi (M3), Tom (M4) e Figan (M5).

Durante o período experimental os animais permaneceram pareados e alojados em gaiolas onde foram separados por uma grade que permitia contato físico entre os indivíduos (Figura 2). Contudo, entre os casais havia apenas contato auditivo e olfatório. Apesar de abrigados, os animais estavam sob condição de iluminação natural.

O manejo alimentar foi padronizado pela instituição mantenedora, composto basicamente de frutas da estação e ração para primatas (MegaZoo®, MG., Brasil), sendo a água *ad libitum*. Todos os animais estavam sob os cuidados do parque há no mínimo dois anos, onde a condição experimental, qual seja, a manutenção dos casais em gaiolas com a grade de separação, foi mantida previamente ao início do experimento, por quatro meses.

Figura 2 – Fêmea e macho de *C. penicillata*
Sorocaba, SP.-2009

4.2 GAIOLAS

As gaiolas utilizadas foram construídas de ferro e arame, medindo aproximadamente 1m x 0,5m x 1m (Figura 3). Sendo as mesmas adaptadas com divisórias e bandejas coletoras, que possibilitaram a separação dos indivíduos e facilitou a colheita do material (fezes e urina), garantindo assim maior confiabilidade aos resultados (Figura 4).

Figura 3 – Gaiola utilizada no estudo – Sorocaba, SP. 2009

Figura 4 – Gaiola adaptada com bandeja coletora
Sorocaba, SP. 2009

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi dividido em fase I, II e validação fisiológica, realizadas respectivamente em fevereiro/2009, junho/2009 e outubro/2010. Foram utilizadas as matrizes fezes e urina para a dosagem de metabólitos fecais de testosterona (MFT), metabólitos urinários de testosterona (MUT), metabólitos fecais de glicocorticóides (MFG), e metabólitos urinários de glicocorticóides (MUG) nos períodos pré e pós-tratamento (contenção física ou aplicação de (GnRH/ACTH). Convencionou-se que as amostras obtidas antes da contenção seriam correspondentes ao período pré-contenção e amostras obtidas após a contenção corresponderiam ao período pós-contenção.

4.3.1 Tratamento: contenção física

Todos os animais foram contidos fisicamente pelo método manual, sendo imobilizados por cinco minutos e em seguida liberados de volta na gaiola, a fim de induzir uma resposta do tipo estresse, uma vez que é sabido que este tipo de contenção é estressante para pequenos primatas (SMITH; FRENCH, 1997) (Figura 5).

Figura 5 – Contenção física pelo método manual de *C. penicillata*
Sorocaba, SP. - 2009

4.3.2 Processamento das amostras

4.3.2.1 Colheita das Amostras Fecais

Foram colhidas amostras de fezes diretamente da bandeja coletora, no período da manhã, entre 07h00-07h30. Considerando-se o dia da contenção física, como o dia 0, as amostras fecais foram colhidas a partir do dia -5 até o dia + 4 (Figura 6).

Cada amostra foi acondicionada em criotubo plástico devidamente identificado. Em seguida, foi homogeneizada e armazenada em freezer a - 20°C, até o processamento laboratorial.

Figura 6 – Colheita de amostra fecal – Sorocaba, SP. - 2009

4.3.2.2 Extração fecal

As extrações dos metabólitos foram realizadas segundo a técnica preconizada por WHITTEN et al. (1998b) e modificada por Pizzutto (2006), conforme descrito abaixo.

As amostras fecais foram liofilizadas com o auxílio do aparelho evaporador giratório tipo *Speed vac* (*Speed vac* – Sc110, Savant), para garantir a ausência de ação bacteriana e padronização do peso do material fecal.

Uma alíquota de 0,2 g de fezes secas foi fervida em 5 ml de etanol 90% (90% etanol: água destilada) por 25 minutos. Durante este tempo, o etanol evaporado foi gradativamente reposto, de forma que ao final desta etapa, o volume inicial fosse mantido.

Após a centrifugação por 15 minutos a 500 G, o sobrenadante foi recuperado e o *pellet* resultante foi re-suspendido em 5 ml de etanol 90%, homogeneizado em aparelho de vórtex por 1 minuto (PHOENIX, MOD AT 56) e re-centrifugado por 15 minutos a 500 G. Os dois sobrenadantes foram combinados e secos completamente sob ar comprimido e, então re-dissolvidos em 1 ml de metanol absoluto.

Para as dosagens de metabólitos de testosterona, as amostras foram diluídas 1:10, em tampão gelatina pH 7,0 [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g), gelatina (1,0g) e água destilada (1000ml)] antes das análises para validação do radioimunoensaio.

Para as dosagens de metabólitos de glicocorticóides, as amostras foram diluídas 1:40 em diluente fornecido no próprio kit.

4.3.2.3 Colheita das amostras urinárias

Para as amostras urinárias, uma vez que a eliminação de metabólitos hormonais por esta via é esperada em uma questão de horas (SMITH; FRENCH, 1997; MÖHLE et al., 2002), foram realizadas múltiplas colheitas do dia -5 ao + 1, de forma a constituir “pools” de amostras representativas de intervalos de duas horas, durante 12 horas consecutivas (Figura 7). Em outras palavras, a cada intervalo de duas horas, a contar das 7:00 horas, todas as amostras urinárias foram combinadas em um “pool” referente a cada bloco de horas. Por exemplo: todas as amostras de urina colhidas no intervalo de tempo entre as 7:00 e 9:00

horas, foram combinados no “pool” das 7-9. Depois vieram os “pools” das 9-11, 11-13, 13-15, 15-17 e 17-19 horas.

Na fase I durante os três primeiros dias, D-5 ao D-3, as colheitas urinárias foram realizadas durante 72 horas consecutivas, em intervalo de 2 horas. Isto foi necessário para avaliar se possíveis variações circadianas nos níveis hormonais séricos, potencialmente seriam reproduzidas na via de eliminação urinária.

Figura 7 – Colheita de amostra urinária – Sorocaba, SP - 2009

4.3.2.4 Diluição das amostras urinárias

As amostras urinárias foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida, no caso das dosagens de metabólitos de testosterona, foram diluídas 1:4, em tampão gelatina pH 7,0 [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g), gelatina (1,0g) e água destilada (1000ml)] antes das análises para validação laboratorial do radioimunoensaio.

Para as dosagens de metabólitos de cortisol, as amostras foram diluídas 1:10 em diluente fornecido no próprio kit.

4.3.3 Ensaio para as dosagens

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo através do método de radioimunoensaio (RIE).

As dosagens dos metabólitos hormonais de testosterona foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida com a utilização de conjunto comercial do tipo *Coat-a-Count, DPC*, para dosagem de hormônios séricos, utilizando o I^{125} como elemento traçador. Para as dosagens dos metabólitos de cortisol utilizamos o conjunto comercial de corticosterona de duplo anticorpo *MP Biomedical - New York* (antiga ICN Biomedical).

4.3.4 Validação

4.3.4.1 Validação laboratorial

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos DPC MEDLAB[®] para os metabólitos fecais e urinários de testosterona e MP BIOMEDICAL para os metabólitos fecais de cortisol para o uso em *C. penicillata*. Não foi necessária a validação para mensuração de metabólitos urinários de cortisol, uma vez que esta já foi realizada em nosso laboratório (SGAI, 2007).

As validações laboratoriais foram realizadas através do método de paralelismo utilizando matriz íntegra. Tal método indica se o material utilizado está interferindo na ligação antígeno-anticorpo. Foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão). Nesta amostra foram adicionados valores conhecidos dos hormônios estudados a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão fornecida pelo conjunto diagnóstico, visando posterior análise comparativa pelo método de regressão linear.

4.3.4.2 Validação fisiológica

A validação fisiológica foi realizada a partir da estimulação da produção dos hormônios avaliados e posterior mensuração dos metabólitos correspondentes nas matrizes fecais e urinárias de *C. penicillata*. Neste estudo foram realizadas duas validações fisiológicas, para a mensuração de metabólitos de testosterona, a partir de desafio com GnRH e para metabólitos de glicocorticóides, com o desafio de ACTH.

Na validação do ensaio para mensurar metabólitos de testosterona, foi desenvolvido um protocolo experimental com quatro animais, divididos em dois grupos distintos. O primeiro denominado de GnRH (tratamento), foi composto pelos animais M1 e M3, o segundo chamado de SALINA (controle), foi formado pelos animais M4 e M5. Os indivíduos do grupo GnRH receberam 0,3 ml de GnRH sintético (Gestran Plus® ArsaS.R.L.- Argentina), o equivalente a 7,5 mcg por via intramuscular, a partir da extrapolação de dosagens da literatura para outras espécies de *Callithrix* (Nunes et al., 2002; Saltzmann et al., 2006). Os animais do grupo SALINA receberam por via intramuscular 0,3 ml de solução salina.

Para a mensuração de metabólitos de glicocorticóides seguiu-se o mesmo protocolo supracitado. Assim, formou-se o grupo ACTH (tratamento) com os animais M1 e M3 e o grupo SALINA (controle) com os indivíduos M4 e M5. Nos animais do grupo ACTH foi aplicado 12,5 UI de ACTH (Synacthen® Suíça), correspondente a 0,5 ml por via intramuscular, dosagem preconizada para *C. jacchus* (HEISTERMANN et al., 2006). Os indivíduos do grupo controle (SALINA) receberam 0,5 ml de solução salina por via intramuscular.

O mesmo esquema de colheita de fezes e urina foi aplicado na validação com GnRH e ACTH. As amostras urinárias foram colhidas, no período das 07h00 às 19h00, do dia D-3 ao D+1, sendo D0 o dia da aplicação. Da mesma forma que nas fases experimentais I e II, as amostras de urina provenientes do grupo TRATAMENTO (GnRH/ACTH) foram reunidas a fim de constituírem “pools” representativos do período de duas horas. Para as amostras fecais do grupo TRATAMENTO, foram colhidas as primeiras fezes matinais do D-3 até o D+3. Sendo que no dia do tratamento (D0), foram utilizadas todas as fezes e urina produzidas, formando “pools” em intervalos representativos do período de duas horas.

O grupo controle, nas duas validações fisiológicas, teve o mesmo esquema de colheita de fezes do grupo TRATAMENTO (GnRH/ACTH) citado acima. Contudo, para as dosagens

urinárias as amostras foram consolidadas em dois “pools”: manhã (toda urina produzida nas primeiras seis horas) e tarde (toda urina produzida nas seis horas posteriores).

Os protocolos, com GnRH e ACTH, foram realizados separadamente, com intervalo de 15 dias. As amostras foram processadas e dosadas da mesma da fase I e II.

4.3.5 Controle de qualidade

Foram realizados controles de qualidade dos ensaios com o cálculo do Coeficiente de Variação intra-ensaio, utilizando os valores altos e baixos, no início e no fim de cada ensaio e inter-ensaio, dosando um mesmo “pool” de amostras em todos os ensaios. Foram aceitos como ensaios de boa qualidade, aqueles que não ultrapassarem 10% em nenhum dos coeficientes.

4.3.6 Cálculo dos resultados

Os resultados dos metabólitos fecais de testosterona e de cortisol foram expressos em nanogramas por decilitro(ng/dl) de extrato fecal e posteriormente, convertidos para nanogramas por gramas(ng/g) de fezes secas. Para efeito de análise, foram considerados como valores de pico (aumento significativo) todos aqueles superiores a média do período pré-tratamento, acrescidos de dois desvios-padrão (BROWN; TERIO; GRAHAM, 1996; PIZZUTTO, 2006).

Os resultados dos metabólitos urinários de testosterona e de cortisol obtidos no radioimunoensaio foram corrigidos pelos índices de creatinina urinária mensurados pela técnica da reação de Jaffe (TAUSSKY, 1954). A utilização dos níveis de creatinina urinária para corrigir os resultados impede que variações de volume da urina possam influir nos valores de metabólitos mensurados, pois sendo esta medida (creatinina) um índice de filtração glomerular, não sofrerá alterações mesmo que os volumes urinários sejam diferentes. Desta forma, os resultados finais foram expressos em ng/mg de Creatinina.

No caso das concentrações urinárias, em decorrência do curto período necessário para eliminação dos metabólitos por esta via e da elevada responsividade dos animais, optou-se pela utilização das médias das concentrações acrescidas do erro padrão da média, obtidas em

dois períodos, manhã e tarde. As primeiras seis horas de colheita corresponderam ao período da manhã, enquanto que as últimas seis horas foram consideradas como período da tarde.

As médias das concentrações dos metabólitos urinários de testosterona e cortisol foram analisadas em relação à distribuição normal e homogeneidade das variâncias pelos testes de Kolmogorov-Smirnov (test KS) e Bartlett, respectivamente. Para os resultados que foram compatíveis com a normalidade foi utilizado o teste “t” não-pareado corrigido pelo teste de Welch. Enquanto, que para os resultados que não apresentaram a normalidade foi utilizado o teste Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Graphpad Instart™.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir.

5.1 VALIDAÇÃO LABORATORIAL

Os valores obtidos nos cálculos das regressões lineares simples foram de $R^2=0.97$ para os ensaios de dosagem de metabólitos urinários de testosterona, $R^2=0.99$ para os de dosagem de metabólitos fecais de testosterona e $R^2=0.95$ para os metabólitos fecais de glicocorticóides (Gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida no ensaio para mensurar metabólitos de urina de testosterona

Gráfico 2 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida no ensaio para mensurar metabolitos fecais de testosterona

Gráfico 3 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida no ensaio para mensurar metabolitos fecais de Glicocorticóides

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO ENSAIO HORMONAL

O controle de qualidade dos ensaios realizados para dosagem de metabolitos fecais e urinários de testosterona e glicocorticóides baseou-se na porcentagem de ligação (B/Bo), sensibilidade (dose mínima detectada) e os coeficientes de variação intra- e inter- ensaio (Tabelas 1 e 2).

Para os ensaios para mensuração de metabolitos de testosterona todos os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 9,23% e o inter-ensaio inferior a 1,66%. A concentração mínima detectada foi de 0.91ng/dL (Tabela 1).

Tabela 1- Controle de qualidade dos ensaios de metabolitos de testosterona de machos de saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) - São Paulo 2009

HORMÔNIO: Testosterona Total (Siemens)

Ensaio	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	B/Bo	CPM	(%)	% (dose ng/dL)	Baixo	Alto
1	93,429	858,9	99,944	796,38	10501	30162	35%	78,00	0,26%	90 (1,32)	4,76%	5,34%
2	93,587	806,39	106,66	786,38	11685	29204	40%	145,00	0,50%	92 (0,94)	9,23%	1,78%
3	97,682	787,21	90,147	813,38	11432	28888	40%	171,00	0,59%	94 (1,02)	5,67%	2,31%
4	80,568	727,49	77,17	782,51	11314	28408	40%	165,00	0,58%	92 (0,91)	3,05%	5,15%
CV Inter ensaio	91,3165	794,9975	93,48025	794,6625							1,66%	0,03%

Legenda:

C1 a C4 (média dos controles de cada ensaio)

CPM: Contagens por minuto

Cap. Lig.: Capacidade de ligação

L.N.E.: Ligação não-específica

CV Intra: Coeficiente de variação intra-ensaio

CV Inter: Coeficiente de variação inter-ensaio

Para os ensaios de metabolitos de glicocorticóides, todos os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 4,95% e o inter-ensaio inferior a 6,28%. A concentração mínima detectada foi de 2,17 ng/mL (Tabela 2).

Tabela 2- Controle de qualidade dos ensaios de metabolitos de glicocorticóides de machos de saguis- de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) - São Paulo - 2009

HORMÔNIO: Corticosterona (MPB)

Ensaio	Controle				CPM	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
	C1	C2	C3	C4	ponto 0	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose ng/mL)	Baixo	Alto
1	95,115	555,85	101,32	645,9	22486	38535	58%	395,00	1,03%	93 (3,11)	4,47%	10,60%
2	130,99	761,98	122,15	782,57	22768	38928	58%	439,00	1,13%	91 (2,18)	4,94%	1,89%
3	99,458	710,22	105,99	788,22	22895	39410	58%	422,00	1,07%	91 (2,17)	4,50%	7,36%
CV Inter ensaio	108,521	676,01667	109,82	738,89667							0,84%	6,28%

Legenda:

C1 a C4 (média dos controles de cada ensaio)

CPM: Contagens por minutos

Cap.Lig.: Capacidade de ligação

L.N.E.: Ligação não-específica

CV Intra: Coeficiente de variação intra-ensaio

CV Inter: Coeficiente de variação inter-ensaio

5.3 PERFIS HORMONAIS DE METABÓLITOS FECAIS E URINÁRIOS DE TESTOSTERONA E GLICOCORTICÓIDES

No total foram colhidas 596 amostras, sendo 175 de fezes e 421 de urina. Abaixo se encontra a tabela com o total de amostras fecais e urinárias colhidas em cada uma das fases experimentais.

Tabela 3 - Total de amostras colhidas, fecais e urinárias, em relação às fases experimentais I, II e validações GnRH/ACTH.

	Fase I	Fase II	Validação GnRH	Validação ACTH	Total
Fezes	50	55	34	36	175
Urina	170	153	47	51	421
Total	220	208	81	87	596

5.3.1 Validação fisiológica ACTH

O desafio com ACTH permitiu verificar uma resposta positiva nos dois animais testados tanto para a matriz fecal como para matriz urinária, demonstrada pela visualização de um pico nos níveis de metabólitos de glicocorticóides no período pós-aplicação (Gráficos 4, 5, 6 e 7). O animal M1 respondeu claramente ao ACTH, apresentando aumento nas concentrações dos metabólitos fecais de glicocorticóides (MFG) superiores aos valores de pico, a partir de 4-6 horas após a aplicação, mantendo-se elevada até a última amostra fecal produzida no dia 0, com 8-10 horas após o desafio (Gráfico 4). Como era esperado, o aumento nas concentrações de metabólitos urinários de glicocorticóides (MUG) ocorreu de forma mais rápida e efêmera, atingindo valores superiores ao de pico em aproximadamente 2-4 horas e retornando aos valores basais em 4-6 horas (Gráfico 5).

A resposta exibida pelo animal M3 foi do tipo bifásica, com um grande aumento nas concentrações de MFG nas primeiras 2-4 horas após a aplicação de ACTH, seguido de um declínio, mas ainda com valor superior ao de pico, e após 8-10 horas apresentou uma nova elevação (Gráfico 6). A resposta na matriz urinária também ocorreu 2-4 horas após o estímulo; contudo, retornou aos valores basais em 8-10 horas, ao passo que, nas fezes, os níveis de metabólitos permaneceram elevados até a última amostra produzida no dia. (Gráfico 7). Tanto o M1 quanto o M3 apresentaram concentrações de MFG e MUG próximos aos basais 24 horas após o desafio. Resultados similares foram encontrados por BAHR *et al.*, (2000) em *Callithrix jacchus*, ao avaliar o tempo de eliminação dos MFG e MUG após a infusão de cortisol radiomarcado. Os autores observaram o pico de radioatividade na urina em 2,5 horas após infusão, com 91,4% dos metabólitos excretados dentro de 5,5 horas. Nas fezes, o pico ocorreu de 8 a 24 horas.

As concentrações dos MFG produzidos pelos animais do grupo controle também apresentaram elevações significativas após a aplicação de solução salina. Isso pode ser explicado pelo fato de que a própria contenção física, seguida de aplicação intramuscular, pode tornar-se um estressor capaz de gerar uma resposta do tipo estresse, com aumento da produção de glicocorticóides (MOBERG, 1985; SMITH; FRANCH, 1997). Entretanto, a resposta apresentada pelos dois animais na matriz fecal ocorreu de forma mais lenta, com formação de pico 8-10 horas para o M4 (Gráficos 8) e de 6-8 horas para o M5 (Gráfico 10). Não houve ocorrência de aumento significativo nas concentrações de MUG para nenhum dos animais do grupo ACTH (Gráficos 9 e 11).

Gráfico 4 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M1 - São Paulo - 2009

Gráfico 5 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M1 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação do ACTH, ★ pico

Gráfico 6 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M3 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação do ACTH, ★ pico, as letras M e T são referentes ao “pool” de amostras representativas dos períodos manhã e tarde

Gráfico 7 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M3 - São Paulo - 2009

Gráfico 8 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M4 - São Paulo - 2009

Gráfico 9 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M4 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação de salina, ★ pico

Gráfico 10 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M5 – São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação de salina, as letras M e T ao “pool” de amostras representativas dos períodos manhã e tarde

Gráfico 11 - Representação gráfica do perfil dos metabólitos urinários de glicocorticóides do animal M5 – São Paulo - 2009

5.3.2 Validação fisiológica GnRH

No grupo GnRH, o indivíduo M1 apresentou um aumento significativo nos níveis de metabólitos fecais de testosterona (MFT), produzidos cerca de 3 a 4 horas após a aplicação, validando fisiologicamente os nossos ensaios para matriz fecal (Gráfico 12). O mesmo não ocorreu com o animal M3, que não demonstrou aumento significativo das concentrações dos metabólitos após indução com o GnRH exógeno (Gráfico 14). Provavelmente isso se deve ao fato deste animal não ter produzido fezes no período inferior a 24 horas após a aplicação, o que levaria a uma possível diluição das concentrações de pico de testosterona. O resultado corrobora com os estudos de MÖHLE et al, (2002) que verificaram que o tempo de eliminação dos MFT é inferior a 24 horas em *C.jacchus*, em decorrência do acelerado trânsito intestinal de tal espécie.

Nenhum dos animais (M1 e M3) apresentou aumento das concentrações de metabólitos urinários de testosterona (MUT) após aplicação de GnRH, portanto, não foi possível a validação fisiológica na matriz urinária (Gráficos 13 e 15).

Diferentemente do esperado, os animais do grupo controle M4 e M5, que receberam injeção de solução salina, apresentaram aumento nos níveis de MFT e MUT. Existe muita similaridade estrutural e antigênica entre os metabólitos dos esteróides e, em especial, entre os metabólitos de testosterona e dos glicocorticóides, sendo lícito pensar que possa ter ocorrido a reação cruzada (Gráficos 16 ao 19). Para dirimir tal dúvida, porém, seria necessário realizar um estudo com infusão de hormônios radiomarcados, com posterior colheitas das fezes, separação e identificação dos metabólitos e a realização de imunogramas com os diferentes anticorpos

Legenda - ↓ aplicação do GnRH, ★ pico

Gráfico 12 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M1- São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação do GnRH, as letras M e T são referentes ao “pool” de amostras representativa dos períodos manhã e tarde

Gráfico 13 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M1 - São Paulo - 2009

Legenda - aplicação do GnRH

Gráfico 14 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M3 São Paulo - 2009

Legenda - aplicação do GnRH, as letras M e T são referentes ao “pool” de amostras representativa dos períodos manhã e tarde

Gráfico 15 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M3 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação de salina, ★ pico

Gráfico 16 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M4 – São Paulo - 2009

Legenda - ↓ aplicação de salina, as letras M e T são referentes ao “pool” de amostras representativa dos períodos manhã e tarde

Gráfico 17 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M4 – São Paulo - 2009

Legenda - aplicação de salina, pico

Gráfico 18 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M5 São Paulo - 2009

Legenda - aplicação de salina, pico, as letras M e T são referentes ao “pool” de amostras representativas dos períodos manhã e tarde

Gráfico 19 - Representação gráfica do perfil de metabólitos urinários de testosterona do animal M5 São Paulo - 2009

5.3.3 Fase I

Na primeira fase foram obtidas 170 amostras de urina e 50 amostras de fezes (Tabela 3). O maior volume de urina e de fezes ocorreu entre 07-09 horas com 38 amostras. Praticamente não houve amostras nos horários entre 19-21 até 05-07 horas, somente de um animal foi possível colher urina em apenas um dia, no horário 05-07. O número de amostras de urina por animal demonstrou variação entre os indivíduos, com o animal 2 (M2) apresentando 23 amostras e o animal 5 (M5) com 42 amostras. Ao contrário, a colheita de fezes foi mais homogênea entre os indivíduos.

Os resultados obtidos nesta fase evidenciaram uma marcada diferença entre as duas matrizes avaliadas, fezes e urina, demonstrando maior consistência nas amostras de origem fecal. Foi possível verificar dois padrões distintos de resposta ao tratamento, um mais reativo e outro não-reativo. O grupo considerado mais reativo foi composto por três indivíduos (M1, M2 e M3), que apresentavam um temperamento semelhante, com características como comportamento mais arredio e maior demonstração de medo e agressividade. Tais animais responderam com aumento nos níveis de MFG, alcançando valores de pico, após a contenção manual por 5 minutos (Gráficos 21, 23 e 25). O grupo não-reativo, formado pelos animais M4 e M5, não demonstraram elevação relevante nos níveis de MFG após o tratamento (Gráficos 27 e 29).

No caso dos MFT constatou-se que quatro animais apresentaram aumento significativo nas concentrações, M1, M2, M4 e M5 (Gráficos 20, 22, 26 e 28). Apenas o indivíduo M3 não apresentou aumento significativo de MFT no período pós-contenção (Gráficos 24). Diferentemente da validação, o aumento nas concentrações dos metabólitos fecais dos hormônios estudados variou de 24 a 72 horas após o tratamento. Os resultados encontrados podem estar relacionados à ação de um estímulo menos intenso (contenção), comparados com estímulos mais intensos (contenção + desafio hormonal). Naturalmente um número amostral tão reduzido nos faz levar em conta possíveis variações individuais.

Para a matriz urinária, não houve alteração significativa entre as concentrações dos MUT não apresentaram diferença nos períodos pré e pós-contenção (Gráfico 30). Entre os MUG apenas o M5 apresentou diferença estatística entre os períodos, contudo, a média das concentrações foi maior antes da contenção (Gráfico 31).

Legenda - dia da contenção, pico

Gráfico 20 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M1 São Paulo - 2009

Legenda - dia da contenção, pico

Gráfico 21 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M1 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção ★ pico

Gráfico 22 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M2 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção, ★ pico

Gráfico 23: Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M2 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 24 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M3 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção ★ pico

Gráfico 25 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M3 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção, ★ pico

Gráfico 26 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M4 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 27 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M4 São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção, ★ pico

Gráfico 28 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M5 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 29 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M5 - São Paulo - 2009

Legenda - As letras sobreescritas iguais indicam que não houve diferença estatística, $p < 0,05$

Gráfico 30 - Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de testosterona de todos os animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase I - São Paulo - 2009

Legenda - As letras sobreescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$

Gráfico 31 - Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de glicocorticóides dos animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase I - São Paulo - 2009

5.3.4 Fase II

Os resultados obtidos na fase experimental II, quando comparados à fase I, demonstraram que um número menor de indivíduos respondeu ao tratamento. Entre os três animais agrupados como mais reativos, apenas o M2 apresentou novamente elevação significativa dos MFG após a contenção física (Gráfico 35). Os indivíduos M1 e M3, na fase II, não exibiram o mesmo padrão de resposta da fase anterior (Gráficos 33 e 37). Os demais animais, M4 e M5, que formavam o grupo não-reativo, novamente não apresentaram elevação significativa nas concentrações dos MFG (Gráficos 39 e 41). Interessantemente, a maioria dos animais exibiu uma mudança comportamental entre a primeira e a segunda fase, com exceção do animal M2, que manteve um temperamento tímido e arredio durante as duas fases experimentais. Os demais indivíduos demonstraram um claro processo de habituação às condições experimentais, tornando-se menos arredios e agressivos.

Na fase II, nenhum dos animais apresentou valores de pico nas concentrações de MFT após a contenção (Gráficos 32, 34, 36, 38, 40). Este resultado foi distinto do apresentado na fase I, na qual 4 dos 5 animais apresentaram picos nos níveis de MFT pós-tratamento.

Vale ressaltar que o animal M5, nesta fase, apresentou um perfil de MFG totalmente distinto dos demais indivíduos, inclusive dele próprio na fase anterior. Este animal produziu altos níveis de MFG e níveis praticamente basais de MFT, sinalizando um quadro sugestivo de estresse crônico, com supressão da produção de testosterona em resposta ao possível efeito de “feedback” negativo das concentrações de glicocorticóides sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Gráfico 42) (CARLSTEAD et al., 1996). A provável explicação para esta situação é o fato da fêmea, que estava pareada com este indivíduo, ter morrido há pelo menos 45 dias antes do início desta nova fase, deixando-o sozinho. E, por determinação da instituição mantenedora dos animais, um dia antes do início do experimento, este mesmo macho foi novamente pareado com uma fêmea estranha.

No caso da matriz urinária, apenas o animal M4 demonstrou aumento significativo nas concentrações de MUG (Gráfico 44). Somente o M5, exibiu aumento significativo nas concentrações médias de MUT na fase pós-contenção (Gráfico 43).

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 32 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M1 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ : dia da contenção

Gráfico 33 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M1 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 34 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M2 - São Paulo - 2009

Legenda -- ↓ : dia da contenção, ★ pico

Gráfico 35 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M2 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ : dia da contenção

Gráfico 36 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M3 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ : dia da contenção

Gráfico 37 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M3 - São Paulo - 2009

Legenda- ↓ dia da contenção

Gráfico 38 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M4 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 39 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M4 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 40 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de testosterona do animal M5- São Paulo - 2009

Legenda - ↓ dia da contenção

Gráfico 41 - Representação gráfica do perfil de metabólitos fecais de glicocorticóides do animal M5 - São Paulo - 2009

Legenda - ↓ : dia da contenção

Gráfico 42 - Representação gráfica dos perfis de metabólitos fecais de testosterona e de glicocorticóides do animal M5 - São Paulo - 2009

Legenda: As letras sobreescritas distintas indicam diferença estatística, $p < 0,05$

Gráfico 43. Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de testosterona dos animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase II São Paulo - 2009

Legenda - As letras sobreescritas distintas indicam diferença estatística, $p < 0,05$

Gráfico 44 - Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de glicocorticóides dos animais nos períodos pré e pós-contenção na Fase II - São Paulo - 2009

5.3.5 Variação diurna nas médias das concentrações dos metabólitos urinários

Utilizamos os valores das médias das concentrações dos metabólitos urinários de ambos os hormônios, obtidos nos dois períodos (manhã e tarde), nos dias que compunham a linha de base da fase I e da fase II para analisar as variações diurnas. Os resultados demonstraram um padrão de variação diurna nas concentrações médias dos MUG, com níveis significativamente maiores no período da manhã, em todas as etapas experimentais (Gráfico 45). Este padrão também foi verificado para os MUG em sagui-de-Wied (*Callithrix kuhlii*) (SMITH; FRENCH, 1997) e em chimpanzé (*Pan troglodytes*) (MULLER; LIPSON, 2003), assim como, para os metabólitos salivares de glicocorticóides em *C. jacchus* (CROSS; ROGERS 2004). Contudo, outro estudo com *C. Jacchus*, que avaliou os níveis de metabólitos de glicocorticóides ao longo do dia na matriz fecal, encontrou maiores concentrações dos metabólitos no período da tarde (SOUZA; ZIEGLER, 1998). Esta diferença é atribuída ao maior tempo de eliminação de metabólitos hormonais pela via fecal, quando comparada com as vias urinária e salivar. Não houve um padrão regular de variação diurna nas concentrações médias do MUT (Gráfico 46).

Legenda - As letras M e T são referentes aos períodos de colheita manhã e tarde. As letras sobscritas distintas indicam diferença estatística, $p < 0,05$

Gráfico 45 - Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de glicocorticóides nos períodos manhã e tarde durante a linha de base das Fase I e II - São Paulo - 2009

Legenda - As letras M e T são referentes aos períodos de colheita manhã e tarde. As letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferença estatística, $p < 0,05$.

Gráfico 46 - Representação gráfica do perfil das concentrações médias ($\pm$ EPM) de metabólitos urinários de testosterona nos períodos manhã e tarde durante a linha de base das Fase I e II - São Paulo - 2009

6 CONCLUSÃO

- Baseado nos resultados encontrados foi verificado que a contenção física de *Callithrix penicillata* por cinco minutos pode induzir resposta do tipo estresse, porém esta resposta não se mostrou sustentada ou duradoura.
- Existe variação individual grande e significativa nas concentrações de metabólitos fecais e urinários de glicocorticóides e de testosterona para *C. penicillata*.
- A adaptação dos animais às condições do cativeiro possivelmente desempenha papel relevante na modulação das respostas do tipo estresse.
- A matriz fecal mostrou-se mais adequada do que a urinária para estudos endócrinos por métodos não invasivos.
- Levando-se em conta os resultados obtidos em ambas as matrizes, conclui-se que o período entre o estímulo e o aparecimento de picos de metabólitos pode ser extremamente curto e fugaz, o que deve ser levado em conta no delineamento experimental em futuros projetos com esta espécie.
- Foi possível caracterizar a existência de variação diurna significativa nos MUG, sendo estes mais elevados no período da manhã.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D.H.; KEVERNE, F.B; BERCOVITCH, C.A; SHIVELY, S.P.; MENDOZA, S.P.; SALTZMAN, W.; SNOWDON, C.T; ZIEGLER, T.E.; BANJEVIC, M.; GARLAND, T.JR.; SAPOLSKY, R.M. Are subordination always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. **Hormones and Behaviour**, v.43, p.67-82, 2003.

ABBOTT, D. H.; HEARN, J. P. Physical, hormonal and behavioral aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 52, p. 155-166, 1977.

ABBOTT, D. H.; MCNEILLY, A. S.; LUNN, S. F.; HULME, M. J.; BURDEN, F. J. Inhibition of ovarian function in subordinate female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus jacchus*). **Journal of Reproduction Fertility**, v. 63, p. 335-345, 1981.

ABBOTT, D. H. Behavioural and physiological suppression of fertility in subordinate marmosets monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 6, p. 169-186, 1984.

ABBOTT, D. H.; HODGES, J. K.; GEORGE, L. M. Social status controls LH secretion and ovulation in female marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). **Journal of Endocrinology**, v. 117, p. 329-339, 1988.

AH-KING, M.; TULLBERG, B. S. Phylogenetic of twinning in Calitrichinae. **American Journal of Primatology**, v. 51, p. 135-146, 2000.

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

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

BAKER, J. V.; ABBOTT, D. H.; SALTZMAN, W. Social Determinants of reproductive failure in male common marmoset housed with their natal family. **Animal Behaviour**, v. 58, p. 501-513, 1999.

BALLES, K. L.; FRENCH, J. A.; HOSTETLER, C. M.; DIETZ, J. M. Social and reproductive factors affecting cortisol levels in wild female golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**, v. 67, p. 25-35, 2005.

BERCOVITCH, F. B.; ZIEGLER, T. E. Current topics in primate socioendocrinology. **Annual Rev. Anthropology**, v. 31, p. 45-67, 2002.

BOERE, V.; PINHEIRO, E. C.; OLIVEIRA, L. S.; PALUDO, G. R.; CANALE, G.; PIANITA, T.; WELKER, A.; ROCHA, M. Comparison between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological indices of the cerrado's marmosets (*Callithrix penicillata*). **Journal of Medical Primatology**, v.34, p. 156-162, 2005.

BROWN, J. L.; TERIO, K. A.; GRAHAM, L.H. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v.15, p. 425-434, 1996.

CAMERON, J. L. Stress and behaviorally induced reproductive dysfunction in primates. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 15, p. 37-45, 1997.

CARLSON, A. A.; ZIEGLER, T. E.; SNOWDON, C. T. Ovarian function of pygmy marmoset daughters (*Cebuella pygmae*) in intact and motherless families. **American Journal of Primatology**, v. 43, p. 347-355, 1997.

CARLSTEAD, K. Effects of captivity on the behavior of wild mammals. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. **Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques**. Chicago: The University of Chicago Press, 1996. p.315-376.

CASTRO, D. C.; SOUSA, M. B. C. Fecal androgen levels in common marmoset (*Callithrix jacchus*) males living in captive family groups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 65-72, 2005.

CERQUEIRA, R.; MARROIG, G.; FINDER, L. Marmosets and Lion-tamarins distribution (*Callitrichidae*, Primates) in Rio de Janeiro State, South-eastern Brazil, **Mammalia**, v. 62, p. 213-226 1998.

COE, C. L.; FRANKLIN, D.; SMITH, E.; LEVINE, S. Hormonal response accompanying fear and agitation in the squirrel monkey. **Physiology and Behavior**, v. 29, p. 1051-1057, 1982.

CROSS, N.; ROGERS, L.J. Diurnal cycle in salivary cortisol levels in common marmosets. **Developmental psychobiology** v.45, N.3, 134-139, 2004.

DECANINI, D. P.; MACEDO, R. H. Sociality in *Callithrix penicillata*: I. Intragroup male profile. **International Journal of Primatology**, v. 29, p. 433-447, 2008a.

DECANINI, D. P.; MACEDO, R. H. Sociability in *Callithrix penicillata*: II. Individual Strategies During Intergroup Encounters. **International Journal of Primatology**, v. 29, p. 627-639, 2008b.

DE VLEESCHOUWER, K.; LEUS, K.; VAN ELSACKER, L.; Characteristics of Reproductive Biology and Proximate Factors Regulating Seasonal Breeding in Captive Golden- Headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*). **American Journal of Primatology**, v. 60, p. 123–137, 2003.

DIXSON, A. F.; GEORGE, L. Prolactin and parental behavior in a male New World primate. **Nature**, v. 299, p. 551-553, 1982.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 451-461, 1995.

DUNBAR, R. I. M. The mating system of callitrichid primates: I Conditions for the coevolution of pair bonding and twinning. **Animal Behavior**, v. 50, p. 1057-1070, 1994a.

DUNBAR, R. I. M. The mating system of callitrichid primates: II. The impact of helpers. **Animal Behaviour**, v. 50, p. 1071-1089, 1994b.

EISENBERGER, J. F. Comparative ecology and reproduction of New World monkeys. In: KLEIMAN, D. G. **The biology and Conservation of Callitrichidae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1977. p. 39-71.

FERIN, M. Stress and the reproductive cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 84, 1768-1774, 1999.

FERIN, M. Stress and the reproductive system. In NEILL, J. D. **Physiology of Reproduction**. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press, 2006. P. 2627-2667.

FERRARI, S. F.; DIGBY, S. J.; Wild *Callithrix* Groups: Stable Extended Families? **American Journal of Primatology**, v. 38, p. 19-27, 1996.

FRENCH, J. A.; BALES, K. L.; BAKER, A. J. Endocrine monitoring of wild dominant and subordinate female *Leontopithecus rosalia*. **International Journal of Primatology**, v. 24, p.1281-1300, 2003.

FRENCH, J. A.; BREWER, K. J.; SCHAFFNER, C. M.; SCHALLEY, J.; HIGHTOWER-MERRITT, D.; SMITH, T. E.; BELL, S. M. Urinary steroid and gonadotropin excretion across the reproductive cycle in female Wied's black tufted-ear marmosets (*Callithrix kuhli*). **American Journal of Primatology**, v. 40, p. 231-246, 1996.

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

GARBER, P. A. Vertical Clinging, Small Body Size, and the Evolution of Feeding Adaptations in the Callitrichinae. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, p. 469-482, 1992.

GARBER, P. A.; ROSENBERGER, A. L.; NORCONK, M. A. Marmoset misconceptions: Introduction. In: NORCONK, M. A.; ROSENBERGER, A. L.; GARBER, P. A.; **Adaptive radiations of neotropical primates**. New York: Plenum Press, 1996, p. 87 - 95.

GINTHER, A. J.; ZIEGLER, T. E.; SNOWDON, C. T. Reproductive biology of captive male cottontop tamarin monkeys as a function of social environment. **Animal Behaviour**, v. 61, p. 65-78, 2001.

GROVES, C. The what, why and how of primate taxonomy. **International Journal of Primatology**, v. 25, p. 1105-1126, 2004.

GROVES, C. P. Order primates. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference**. Baltimore, Maryland. The Johns Hopkins University Press, 2005. v. 1, p. 111-184.

HAIG, D. What is a marmoset?. **American Journal of Primatology**, v. 49, p. 285-296, 1999.

HEARN, J. P. The endocrinology of reproduction in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. In: KLEIMAN, D. G. **The biology and conservation of marmosets**. Washington, D. C. : Smithsonian Institution, 1978, p. 163-171.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J. K. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in new world primates, callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 243-251, 1993.

HERSHKOVITZ, P. Systematics, evolution, and biology of the families Callitrichidae and Callimiconidae. In: HERSHKOVITZ, P. **Living new world monkeys (Platyrrhini)**. London: The University of Chicago, 1977, p. 397-911.

HIRSCH, A.; DIAS, L. V.; MARTINS, L. O.; CAMPOS, R. F.; LANDAU, E. C.; RESENDE, N. A. T. BDGEOPRIM – Database of Geo-Referenced Localities of Neotropical Primates. **Neotropical Primates**, v. 10, p. 79-84, 2002.

HOSEY, G. R. How does the zoo environment affect the behaviour of captive primates? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 90, p. 107-129, 2005.

HUCK, M.; LOTTKER, P.; HEYMANN, E. W.; HEISTERMANN, M. Characterization and social correlates of fecal testosterone and cortisol excretion in wild male *Saguinus mystax*. **International Journal of Primatology**, v. 26, p. 159-179, 2005.

JOHNSON, E.O.; KAMILARIS, T.C.; CARTER, C.S.; CALOGERO, A.E.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. The biobehavioral consequences of psychogenic stress in small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). **Biological Psychiatry**. v.40, p. 317-337, 1991.

JURKE, M. H. Behavioral and hormonal aspects of reproduction in captive Goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*) in a comparative and evolutionary context. **Primates**, v 37, p.109-119, 1996.

KEAY, J. M.; SINGH, J.; GAUNT, M. C.; KAUR, T. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: A literature review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, p.234-244, 2006.

LEAL, M. C.; FRANÇA, . L. R. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 616-624, 2006.

LI, L-H; DONALD, J. M.; GOLUB, M. S. Review on testicular development, structure, function, and regulation in common marmosets. **Birth defects research**, v. 74, p. 450-469, 2005.

LIPTRAP, R. M. Stress and reproduction in domestic animals. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 697, p. 275-284, 1993.

LUTZ, C. K.; TIEFENBACHER, S.; JORGENSEN, M. J.; MEYER, J. S.; NOVAK, M. A. Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult monkeys for cortisol assay. **American Journal of Primatology**, v. 52, p. 93-99, 2000.

MATTLE, F. M. E.; PRYE, C. R.; ANZENBERGER, G. Different ovarian responses to potential mates underlie species-specific breeding strategies in common marmoset and Goeldi's monkey. **Hormones and Behavior**, v.54, p. 302-311, 2008.

McNEILLY, A. S. Suckling and the control of gonadotropin secretion. In NEILL, J. D. **Physiology of Reproduction**. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press, 2006. p. 2526-2536.

McNEILLY, A. S.; ABBOTT, D. H.; LUNN, S. F.; CHAMBERS, P. C.; HEARN, J.P. Plasma prolactin concentrations during the ovarian cycle and lactation and their relationship to return of fertility *post partum* in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction Fertility**, v. 62, p. 353-360, 1981.

MIRANDA, G. H. B.; FARIA, D. S. Ecological aspects of Black-pinellid marmoset (*Callithrix penicillata*) in the cerrado and dense cerrado of the Brazilian central plateau. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 397-404, 2001.

MOBERG, G. P. **Animal stress**. Bethesda, Md.; Baltimore, Md.: American Physiological Society: Distributed by Williams & Wilkins, 1985. 324 p.

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

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**. v.23, p.67-74, 2002.

MULLER, M.; LIPSON, S. Diurnal patterns of urinary steroid excretion in wild chimpanzees. **American Journal of Primatology**, v. 60, p. 161-166, 2003.

MUNK, A.; GUYRE, P.M., HOLBROOK, N.I. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. **Endocrinology Review**. v.5, p.25-44, 1984.

NUNES, S.; FITE, J. E.; PATERA, K. J.; FRENCH, J. A. Interactions among paternal behavior, steroid hormones, and parental experience in male marmosets (*Callithrix kuhlii*). **Hormones and Behavior**, v. 39, p. 70-82, 2001.

O'BYRNE, K. T.; LUNN, S. F.; DIXSON, A. F. Effects of acute stress on the patterns of LH secretion in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Endocrinology**, v. 118, 1988.

OLIVEIRA, A. M.; FERRARI, S. F. Habitat exploitation by free-ranging *Saguinus niger* in Eastern Amazonia. **International Journal of Primatology**, v. 29, p. 1499-1510, 2008.

OLIVEIRA, M. M. DE.; LANGGUTH, A. Rediscovery of Macgrave's capuchin monkey and designation of a neotype for *Simia flavia* Schreber, 1744 (Primates, Cebidae). **Boletim Museu Nacional**, v. 523, p. 1-16, 2006.

PALADINI, M. D. **Estudo do ciclo ovariano de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, GEOFFROY, 1812) com o uso de métodos não-invasivos:** extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

PALME, R. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, p. 75-80, 2005.

PINHEIRO, B. V.; OLIVEIRA E SILVA, I.; PALUDO, G. R.; CANALE, G.; PIANA, T.; WELKER, A.; ROCHA-DE-MOURA, R. C.; Comparison between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). **Journal of Medical Primatology**, v. 34, p. 156-162, 2005.

PIZZUTTO, C. S. **Estudo sobre a influencia de técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrinos-comportamentais de antropóides não-humanos mantidos em cativeiro.** 2006. 172 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

PIZZUTTO, C.S.; SGAI, M.G.F.G.; CORRÊA, S.H.R.; BERESCA, A.M.; VIAU, P.; OLIVEIRA, C.A.; NICHI, M.; GUIMARÃES, M.A.B.V. Enriquecimento ambiental e condicionamento operante com reforço positivo no retorno da ciclicidade ovariana de uma fêmea de chimpanzé (*Pan troglodytes*) - relato de caso. **Clínica Veterinária**, v. 85, p. 66-72, 2010.

PIZZUTTO, C. S.; SGAI, M. G. F. G.; VIAU, P.; CHELINI, M. O. M.; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Validação laboratorial e fisiológica de conjunto comercial para a quantificação de corticóides fecais em chimpanzé (*Pan troglodytes*) e orangotango (*Pongo pygmaeus*), cativos e submetidos a enriquecimentos ambientais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, p. 104-110, 2008.

PONTES, M. C. **Correlato hormonal do comportamento reprodutivo de machos de sagüi comum (*callithrix jacchus*) em ambiente natural,** 2006.72 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

PUFFER, A. M.; FITE, J. E.; FRENCH, J. A.; RUKSTALIS, M.; HOPKINS, E. C.; PATERA, K. J. Influence of the mother's reproductive state on the hormonal status of daughter's in marmoset (*Callithrix kuhlii*). **American Journal of Primatology**, v. 64, p. 29-37, 2004.

POWER, M. L. The other side of Callitrichine gummivory: Digestibility and nutritional value. In: NORCONK, M. A.; ROSENBERGER, A. L.; GARBER, P. A.; **Adaptive radiations of neotropical primates**. New York: Plenum Press, 1996, p. 97-110.

POWER, M. L.; TARDIF, S. D.; POWER, R. A.; LAYNE, D. G. Resting energy metabolism of Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) is similar to that of other callitrichids. **American Journal of Primatology**, v. 60, p.57-67, 2003.

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

RIVIER, C., RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanism. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

ROSS, C. N.; FRENCH, J. A.; PATERA, K. J. Intensity of aggressive interections modulates testosterone in male marmosets. **Physiology and Behavioral**, v. 83, p. 437-445, 2004.

RUIZ-MIRANDA, C. R.; AFFONSO, A. G.; DE MORAES, M. M.; VERONA, C. E.; MARTINS, A.; BECK, B. B. Behavioral and ecological interactions between reintroduced golden Lion tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and introduced marmosets (*Callithrix* spp, Linnaeus, 1758) in Brazil's atlantic coast forest fragments, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 99-109, 2006.

RYLANDS, A. B. Sympatric Brazilian callitrichids: The black tufted-ear, *Calithrix kuhli*, and the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus crysomelas*. **Journal of Human Evolution**, v. 18, p. 679-695, 1989.

RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Systematics, geographic distribution, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: A. B. Rylands (ed.), **Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology**. Oxford University Press, Oxford, pp. 11-77. 1993.

RYLANDS, A. B. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in Callitrichidae. **American Journal of Primatology**, v. 38, p. 5-18, 1996.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C.P.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. An Assessment of the Diversity of the New World Primates. **New Tropical Primates**, v. 8, p. 61-93, 2000.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The Diversity of the NewWorld Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; CÉSAR, J.; MARQUES, B.; HEYMANN, E. W.; STRIER, K. B. **South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation**. New York: Springer, 2009, p. 23-54.

SALTZMAN, W.; SCHULTZ-DARKEN, N.J; ABBOTT, D.H. Suppression of cortisol levels in subordinate female marmosets: reproductive and social contributions. **Hormones and Behaviour**. v.33, p.58-74, 1998.

SAPOLSKY, R.M. Social subordination as a marker of hypercortisolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.771, p.626-639. 1995.

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

SCHAFFNER, C. M.; FRENCH, J. A. Behavioral and endocrine responses in male marmosets to the establishment of multimale breeding groups: evidence for non-monopolizing facultative polyandry. **International Journal of Primatology**, v. 25, p. 709-732, 2004.

SCHRADIN, C.; ANZENBERGER, G. Infant carrying in family groups of Goeldi's Monkeys (*Callimico goeldi*). **American Journal of Primatology**, v. 53, p. 57-67, 2001.

SHIMIZU, K. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: application of non-invasive methods. **Journal of Reproduction and Development**. V. 51, p. 1-13, 2005.

SELYE, H. **Fisiologia y Patologia de la exposicion al "stress": sufrimento**. V. 2, Barcelona: Científico Médica, 1954, p. 336.

SELYE, H. **Stress without distress**. Toronto: McClelland & Stewart, 1974, p. 171.

SGAY, M. G. F. G. **A avaliação das influencias das técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrinos e comportamentais de *Callithrix penicillata* (sagüi-de-tufos-pretos) mantidos em estabilidade social e isolados.** 2007. 107 p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

SMITH, T. E., FRENCH, J. A. Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhli*). **Physiology & Behaviour**, v.62, p.225 – 232, 1997.

SMITH, T. E.; MCCALLISTER, J. M; GORDON, S. J.; WHITTICKAR, M. Quantitative data on training new world primates to urinate. **American Journal of Primatology**, v. 64, p. 83-93, 2004.

SOUZA, M.B.C.; ZIEGLER, T.E. Diurnal variation on the excretion patterns of steroids in common marmoset (*Callithrix penicillata*) **American Journal of Primatology** v.46, p. 105-117, 1998.

SOUZA, V. B. **Efeitos do estresse psicossocial crônico e do enriquecimento ambiental em sagüis (*Callithrix penicillata*): um estudo comportamental, fisiológico e farmacológico.** 2002, 238 p. Tese (doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2002.

STAVISKY, R. C.; RUSSELL, E.; STALLINGS, J.; SMITH, E. O.; WORTHMAN, C. M.; WHITTEN, P. L. Fecal steroid analysis of ovarian cycles in free ranging baboons. **American Journal of Primatology**, v. 36, p. 285-297, 1995.

SUSSMAN, R. W.; KINZEY, W. G. The ecological role of the callitrichidae: a review. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 64, p.419-449, 1984.

STRIER, K. B. Traits, trends, and taxonomy. In: STRIER, K. B. **Primate behavioral ecology**. University of Wisconsin-Madison: Allyn and Bacon, 2003, p. 36-66.

TAUSSKY, H. H. A microcolorimetric determination of creatinine in urine by the Jaffe reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 209, p. 853-861, 1954.

VAN ROOSMALEN, M. G. M.; VAN ROOSMALEN, T.; The description of a new marmoset genus, callibella (Callitrichinae, primates), including its molecular phylogenetics status. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2003.

VILELA, S. L.; FARIA, D. S. Seasonality of the activity pattern of *Callithrix penicillata* (Primates, Callitrichidae) in the Cerrado (Scrub Savanna Vegetation). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 363-370, 2004.

WASSER, S. K.; BEVIS, K.; KING, G.; HANSON, E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern Spotted Owl. **Conservation Biology**, v. 11, p. 1019, 1022, 1997.

WHITTEN, P. L. Noninvasive methods for the study of stress, reproductive function, and aggression. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 24, p. 239, 1997.

WHITTEN, P. L.; BROCMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **Yearbook of Physical Anthropology**, v. 41, p. 1-23, 1998a.

WHITTEN, P. L.; STAVISKY, R.; AURELI, F.; RUSSEL, E. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v. 44, p. 57-69, 1998b.

WINGFIELD, J. C.; HEGNER, R. E.; DUFTY, A. M. J.; BALL, G. F. The "challenge hypothesis": Theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. **The American Naturalist**, v. 136, p. 829-846, 1990.

WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis: coping with a capricious environment. **Journal of Mammalogy**, v. 86, p. 248-254, 2005.

ZIEGLER, T. E.; SAVAGE, A.; SCHEFFLER, G.; SNOWDON, C. T. The endocrinology of puberty and reproductive functioning in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) under varying social conditions. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 618-627, 1987.

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

ZIEGLER, T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D. J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C. T.; ABBOTT, D. H. 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**, v. 54, p. 91-99, 1996.

ZIEGLER, T. E.; SCHULTZ-DARKEN, N. J.; SCOTT, J. J.; SNOWDON, C. T.; FERRIS, J. J. Neuroendocrine response to female ovulatory odors depends upon social condition in male common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Hormones and Behavior**, v. 47, p. 56-64, 2005.

ZIEGLER, T. E.; WIDOWSKI, T. M.; LARSON, M. L.; SNOWDON, C. T. Nursing does affect the duration of the post-partum to ovulation interval in cotton-top tamarins (*saguinus oedipus*). **Journal of Reproduction of Fertility**, v. 90, p. 563-570, 1990.