MARILU DOMINIQUE PALADINI

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

São Paulo

2009

Marilu Dominique Paladini

Estudo do ciclo ovariano de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata,* GEOFFROY, 1812) com o uso de métodos não–invasivos: extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

São Paulo

2009

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.2188
FMVZ

Paladini, Marilu Dominique
Estudo do ciclo ovariano de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata,* Geoffroy, 1812) com o uso de métodos não-invasivos : extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona / Marilu Dominique Paladini. – 2009.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. *Callithrix penicillata*. 2. Ciclo ovariano. 3. Esteroides fecais. 4. Gestação. 5. Reprodução. I. Título.

ERRATA

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

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
FOLHA DE ROSTO	3º	5ª	Medicina Veterinária	Ciências
Ficha catalográfica	3º	1ª	78 f.	77 f.
FOLHA DE AVALIAÇÃO	4º	5º	Medicina Veterinária	Ciências
RESUMO	2º	5ª	78 f.	77 f.
RESUMO	2º	2ª	*penicillata*)	*penicillata,* GEOFFROY, 1812).
RESUMO	2º	6ª	Mestrado em Medicina Veterinária	Mestrado em Ciências
ABSTRACT	2º	7ª	78 f.	77 f.
ABSTRACT	2º	1ª	*Callithrix penicillata*)	*Callithrix penicillata,* GEOFFROY, 1812).
ABSTRACT			Mestrado em Medicina Veterinária	Mestrado em Ciências

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do ciclo ovariano de sagüi-de-tufos pretos (*Callithrix penicillata*) com uso de métodos não-invasivos: Estração e mensuração de metabólicos fecais de estradiol e progesterona", protocolado sob o nº1164/2007, utilizando 05 (cinco) sagüis de tufo preto, 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 em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Study of the ovarian cycle in Black tufted ear marmosets (*Callithrix penicillata*) using non invasive methods: Extraction and measuring of fecal estradiol and progesterone metabolites", protocol number 1164/2007, utilizing 05 (five) marmosets, 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 Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PALADINI, Marilu Dominique

Título: Estudo do ciclo ovariano de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) com o uso de métodos não–invasivos: extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr _____Instituição_____

Assinatura_____Julgamento_____

Prof. Dr _____Instituição_____

Assinatura_____Julgamento_____

Prof. Dr _____Instituição_____

Assinatura_____Julgamento_____

A meus pais por sempre me darem força e apoio. Obrigado por tudo que fizeram por mim. Amo muito vocês!

A meu amor, melhor amigo e agora pai, Luiz! Obrigado por fazer minha vida tão feliz. TE AMO!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães** por sua excelência como pesquisador e orientador, obrigada por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho!

A **Cecília Pessuti e Adauto Nunes do Zoológico de Sorocaba** por permitirem este estudo com os seus animais.

Aos **funcionários do Zoológico de Sorocaba**, pela dedicação e ajuda à execução do estudo, pela paciência e carinho.

Aos tratadores **Vicente e Eugenio**, pela ajuda, companheirismo, dedicação e carinho.

A **coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa do mestrado.

Ao **prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira** pelo auxilio nas dosagens hormonais.

A **Priscila Viau Furtado** pela amizade e competência nas dosagens.

A todos os funcionários e professores do **Departamento de Reprodução Animal** pelo auxilio e carinho.

Ao serviço da **biblioteca da FMVZ-USP** pela ajuda na busca e aquisição da literatura e a **Fátima** por toda sua dedicação.

Ao **Rodrigo Del Rio do Valle**, por compartilhar sua experiência e ajudar no inicio do desenvolvimento do projeto.

A **Cristiane Schilbach Pizzutto**, por nossas longas conversas, por me passar sua experiência e por toda sua ajuda. Obrigada!

A **Suzana Hirata**, pelo companheirismo nas disciplinas e pela ajuda no laboratório.

As amigas **Aline e Gabi** pelas infinitas risadas que tivemos durante nossas disciplinas e viagens a Pirassununga.

A **Cintia Germano da Rocha**, pela amizade, companheirismo, risadas e pela ajuda indispensável nas dosagens. Obrigada!

A todos **meus amigos** da pós-graduação pelo companheirismo.

As minhas queridas amigas de infância, de agora e sempre: **Daniela, Luciana e Renata,** por tantos anos de companheirismo, compreensão, acolhimento e diversão.

A meus irmãos **Gino, Giovanni, Carlos, Cito, Marilu, Dennise, Arturo** que mesmo cada um de nós vivendo em um lugar diferente, sei que sempre estaremos unidos e um agradecimento especial ao meu irmão **Carlos** que teve a paciência de me enviar vários artigos.

A toda **minha família** que sempre me apóia e me incentiva.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma colaboraram e participaram na concretização deste trabalho.

RESUMO

PALADINI, M. D. **Estudo do ciclo ovariano de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) com o uso de métodos não–invasivos:** extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona**.** [Study of the Black-tufted-marmoset's (*Callithrix penicillata*) ovarian cycle with the use of non-invasive methods: extraction and measurement of estrogen and progesterone fecal metabolites]. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Este trabalho teve por objetivo descrever os perfis hormonais do ciclo ovariano de cinco exemplares adultos de *C. penicillata,* mantidas no Parque Municipal Quinzinho de Barros em Sorocaba, SP. As amostras de fezes foram colhidas diariamente, sempre pela manhã, durante três meses e mantidas congeladas até o processamento laboratorial. Após a extração com solventes orgânicos, as mensurações foram efetuadas com o uso da técnica de radioimunoensaio (RIE). Para as mensurações dos metabólitos hormonais foram utilizados conjuntos comerciais validados para o uso em matriz fecal de *C.penicilatta.* Os resultados mostraram que duas fêmeas estavam ciclando e três estavam gestantes. Para as fêmeas que apresentaram ciclicidade ovariana o ciclo teve duração média de 23.5 ±9, 9 dias, sendo que as durações das fases lúteas e foliculares foram de 13,25 dias ± 9,46 dias e de 10,25 ±7,2 dias, respectivamente. Entre as outras três fêmeas, duas tiveram suas gestações confirmadas, parindo filhotes e uma teve suspeita de ter sofrido abortamento .Para as que tiveram suas gestações confirmadas, a média das concentrações dos metabólitos fecais de progesterona foi de 4527,19 ± 3667,8 ng/g para o terço medio enquanto a média do terço final foi de 2974±2471,9 ng/g. As médias obtidas para as concentrações de metabólitos de estrógenos nos terços medio e final foram respectivamente de 1401,41± 1034,4 ng/g e 1546,67± 1227,2 ng/g. Para a fêmea que teve suspeita de abortamento foram confeccionados gráficos dos valôres obtidos das concentrações de ambos os metabólitos hormonais para o período anterior e posterior a data presumida do evento e comparadas as suas médias . A média da concentração dos metabólitos fecais de progesterona antes do suposto abortamento foi de 1466,22± 784,36 ng/g e para o período posterior ao suposto evento foi de 813 ± 614,66 ng/g Para as médias das concentrações de

metabólitos fecais de estrógenos, os resultados obtidos foram de 745,65± 747,39 ng/g antes e 212,42 ±331,84 ng/g depois do suposto evento. As analises das concentrações de metabóltios fecais dos hormonios esteroides, mostrou-se uma ferramenta efficiente e adequada para estudos sobre a ciclicidade ovariana e gestação do *C. penicillata*.

Palavras-chaves: *Callithrix penicillata*. Esteróides fecais. Ciclo ovariano. Gestação. Reprodução animal.

ABSTRACT

PALADINI, M. D. **Study of the Black-tufted-marmoset's (*Callithrix penicillata*) ovarian cycle with the use of non-invasive methods:** extraction and measurement of estrogen and progesterone fecal metabolites. [Estudo do ciclo ovariano de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) com o uso de métodos não-invasivos: extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona.] 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

This study had as objective to describe the hormonal profiles of the ovarian cycle of five adult females of C.penicillata, from the Parque Municipal Quinzinho de Barros in Sorocaba, SP. The fecal samples were collected on a daily basis, always in the morning, during three months and then frozen until their processing. After extraction with organic solvents, the measurements were conducted with radioimmunoassay (RIA) .For the measurements of the hormonal metabolites comercial kits were used and validated for *C.penicillata*. The results showed two females with ovarian cyclicity and three females that were pregnant. For the females that presented ovarian cyclicity the duration of the ovarian cycle had an average of 23.5 ± 9.9 days , where the duration of the luteal and follicular phases were of 13.25 ±9.46 days and 10.25±7.2 days, respectively. Of the other three females, two had their pregnancy's confirmed by the birth of their young and one was suspected to have suffered abortion. For the females that had their pregnancy's confirmed , the mean of the fecal progesterone metabolites concentration was of 4527.19 ± 3667.8 ng/g for the second trimester, as where for the third trimester it was of 2974 ±2471.9 ng/g. The means for the estrogen fecal metabolites concentrations for the second and third trimester were of 1401.41 ± 1034.4 ng/g and 1546.67 ± 1227.2 ng/g. For the female that was suspected to have had an abortion graphs were used with values obtained from both fecal metabolites concentrations from before and after the presumed date of the event and the means were compared. The mean of progesterone fecal metabolites concentrations before the abortion was of 1466.22 ± 784.36 ng/g and for the period after the abortion it was of 813 ± 614.66 ng/g. For the estrogen fecal metabolites concentration mean, the results obtained were of 745.65 ± 747.39 ng/g for the before period and 212.42 ±331.84 for the after period. The analysis of the fecal metabolites

steroids hormone concentration, showed to be an efficient tool for the studies of the ovarian cycle and gestation period in the *C.penicillata*.

Keywords: *Callithrix penicillata*. Fecal steroids. Ovarian cycle. Gestation. Animal reproduction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fêmea de Sagui-de-Tufos-Pretos (*Callithrix penicillata*) – Sorocaba – 2008..... 34

Figura 2 - Gaiolas individuais medindo 1m x 0.50m x 1m com galhos de árvores e redes do tipo “ninho” utilizadas durante todo o período de estudo para os sagüis-de-tufos-pretos(*Callithrix penicillata*) - Sorocaba – 2008.....41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para metabólitos fecais de progestinas 46

Gráfico 2 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtido para metabólitos fecais de estrógeno.....47

Gráfico 3- Representação gráfica das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) da fêmea F01 de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentou ciclicidade ovariana durante todo o período de estudo - São Paulo – 2008.....50

Gráfico4- Representação gráfica das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) da fêmea F02 de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentou ciclicidade ovariana durante todo o período de estudo - São Paulo – 2008.....51

Gráfico 5 - Representação gráfica das médias e desvios-padrões dos dias das fases foliculares e lúteas das duas fêmeas de saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana - São Paulo – 2008.....52

Gráfico6- Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de progesterona (ng/g de fezes secas), em cada fase do ciclo, das fêmeas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*), que apresentaram ciclicidade ovariana - São Paulo – 2008.....54

Gráfico7 -Representação gráfica das medias diárias das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) das fêmeas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana, considerando o dia 0 como o dia estimado da ovulação - São Paulo – 2008..55

Gráfico 8 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de estrógeno (ng/g de fezes secas) das fêmeas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana - São Paulo – 2008.....56

Gráfico 9- Representação gráfica das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de progesterona (ng/g de fezes secas) das duas fêmeas gestantes de sagüis-de-tufos-

pretos (*Callithrix penicillata*), nos terços médio e final da gestação - São Paulo – 2008.....57

Gráfico 10-Representação gráfica das médias e desvios-padrões das concentrações de metabólitos fecais de estrógeno (ng/g de fezes secas) de duas fêmeas gestante de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*), nos terços médio e final da gestação - São Paulo – 2008.....58

Gráfico11-Representação gráfica das médias e desvios-padrões de metabólitos fecais de progesterona antes e depois do presumido abortamento da fêmea 3 de sagui-de-tufos- pretos (*C. penicillata*) - São Paulo – 2008.....60

Gráfico12-Representação gráfica das medias de metabólitos fecais de estrógeno antes e depois do presumido abortamento da fêmea 3 de sagui-de-tufos- pretos (*C. penicillata*) - São Paulo - 2008...61

Gráfico13-Representação gráfica das concentrações dos metabólitos fecais de progesterona e estrógenos da fêmea 3 de sagui-de-tufos-pretos (*C. penicillata*) com suspeita de ter abortado - São Paulo - 2008. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Controle de qualidade dos ensaios de metabólitos de progestinas em amostras fecais de fêmeas de Saguis-de-tufos-pretos (Callithrix penicillata) - São Paulo – 2009.....47

Tabela 2 - Controle de qualidade dos ensaios de metabólitos de estrógenos em amostras fecais de fêmeas de Saguis-de-tufos-pretos (Callithrix penicillata) - São Paulo – 2009.....48

Tabela 3- Média de concentração dos metabolitos fecais de progesterona e estrógeno das fêmeas gestantes de saguis-de-tufos-pretos (*C.penicillata*), até o momento do parto (fêmeas 4 e 5), ou até o momento do presumido abortamento (fêmea 3) - São Paulo - 2008 59

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 18

2 **REVISÃO DE LITERATURA** 20

2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS CALLITHRICHIDEOS 20

2.1.1 Aspectos Gerais 20

2.1.2 **Sistemas de Acasalamento** 22

2.1.3 **Fisiologia Reprodutiva dos Callithrichideos** 23

2.1.4 **Gestação, Parto e Lactação** 24

2.1.5 **Quimerismo nos Callithrichideos:** 27

2.1.6 **Comportamento Reprodutivo** 28

2.1.7 **Supressão Reprodutiva** 29

2.1.8 **Cuidado Parental** 32

2.2 MANEJO REPRODUTIVO EM CATIVEIRO 33

2.3 O SAGÜI-DE-TUFOS-PRETOS (*C.penicillata*) 34

2.4 MÉTODOS NÃO INVASIVOS 35

3 **OBJETIVOS** 39

4 MATERIAL E MÉTODOS 40

4.1 ANIMAIS 40

4.2 COLETAS DE FEZES 42

4.3 EXTRAÇÃO FECAL 42

4.4 VALIDAÇÃO 43

4.4.1 Validação Biológica 43

4.5 DOSAGEM HORMONAL 43

4.5.1 Controles de qualidade 44

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 46

5.1 VALIDAÇÃO LABORATORIAL 46

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO ENSAIO HORMONAL 47

5.3 PERFIS HORMONAIS DE METABÓLITOS FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTERONA 49

5.3.1 **Fêmeas que apresentaram ciclicidade ovariana** 49

5.3.2 **Fêmeas Gestantes** 56

5.3.2.1 **Fêmea gestante suspeita de ter sofrido abortamento** 59

6 **CONCLUSÕES** 63

REFERÊNCIAS 64

ANEXOS 76

1 INTRODUÇÃO

O destino da grande maioria de primatas não humanos está intimamente relacionado ao homem. Hoje, sabemos que muitas espécies de primatas do Novo Mundo estão em perigo devido à caça e à destruição de seu habitat natural, além do comércio clandestino da fauna e flora, fazendo com que 26 espécies e subespécies de primatas não humanos no Brasil sejam consideradas ameaçadas de extinção (VALLE, 2007).

Além da conservação dos habitats, programas de reprodução em cativeiro são necessários para proteger as espécies. Institutos de primatologia vêm direcionando seus programas de pesquisa para a fisiologia e o comportamento reprodutivo, numa tentativa de obter conhecimentos básicos de reprodução nessas espécies (JURKE, 1996). Em alguns casos, a reprodução de animais em cativeiro poderá ser a única alternativa, o que torna ainda mais importante o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas apropriadas para a obtenção do sucesso reprodutivo no cativeiro (SNOWDON, 1989). Infelizmente muitas espécies de primatas não se reproduzem bem em cativeiro, o que faz com que técnicas de reprodução assistida sejam ferramentas necessárias para aumentar o número de indivíduos e também facilitar o manejo genético das populações, de forma a evitar o aumento da consangüinidade (MORREL, 1996).

Os primatas do Novo Mundo são considerados animais de grande relevância na área de pesquisa, não somente pela sua ocorrência no ecossistema tropical da América Central e do Sul, mas também devido a sua grande diversidade e sua proximidade filogenética com o homem. Alguns destes primatas são muito utilizados em pesquisas na área de reprodução, entre eles o sagüi- de tufo- branco (*Callithrix jacchus*), mico de cheiro (*Saimiri sciureus*), macaco da noite (*Aotus, spp*), e macaco prego (*Cebus, spp*), porém , atualmente, estudos com inúmeros outras espécies estão em andamento para verificação de seu potencial para uso em pesquisa biomédicas (VALLE, 2007).

Nenhum primata não humano pode ser considerado um animal ideal e análogo para os estudos relacionados à reprodução humana. Alguns primatas, como os chimpanzés (*Pan troglodytes*), orangotangos (*Pongo pygmaeus*) e gorilas (*Gorilla gorilla*) podem ser considerados “modelos” ideais, mas, muitos deles, encontram-se

1 INTRODUÇÃO

O destino da grande maioria de primatas não humanos está intimamente relacionado ao homem. Hoje, sabemos que muitas espécies de primatas do Novo Mundo estão em perigo devido à caça e à destruição de seu habitat natural, além do comércio clandestino da fauna e flora, fazendo com que 26 espécies e subespécies de primatas não humanos no Brasil sejam consideradas ameaçadas de extinção (VALLE, 2007).

Além da conservação dos habitats, programas de reprodução em cativeiro são necessários para proteger as espécies. Institutos de primatologia vêm direcionando seus programas de pesquisa para a fisiologia e o comportamento reprodutivo, numa tentativa de obter conhecimentos básicos de reprodução nessas espécies (JURKE, 1996). Em alguns casos, a reprodução de animais em cativeiro poderá ser a única alternativa, o que torna ainda mais importante o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas apropriadas para a obtenção do sucesso reprodutivo no cativeiro (SNOWDON, 1989). Infelizmente muitas espécies de primatas não se reproduzem bem em cativeiro, o que faz com que técnicas de reprodução assistida sejam ferramentas necessárias para aumentar o número de indivíduos e também facilitar o manejo genético das populações, de forma a evitar o aumento da consangüinidade (MORREL, 1996).

Os primatas do Novo Mundo são considerados animais de grande relevância na área de pesquisa, não somente pela sua ocorrência no ecossistema tropical da América Central e do Sul, mas também devido a sua grande diversidade e sua proximidade filogenética com o homem. Alguns destes primatas são muito utilizados em pesquisas na área de reprodução, entre eles o sagüi- de tufo- branco (*Callithrix jacchus*), mico de cheiro (*Saimiri sciureus*), macaco da noite (*Aotus, spp*), e macaco prego (*Cebus, spp*), porém , atualmente, estudos com inúmeros outras espécies estão em andamento para verificação de seu potencial para uso em pesquisa biomédicas (VALLE, 2007).

Nenhum primata não humano pode ser considerado um animal ideal e análogo para os estudos relacionados à reprodução humana. Alguns primatas, como os chimpanzés (*Pan troglodytes*), orangotangos (*Pongo pygmaeus*) e gorilas (*Gorilla gorilla*) podem ser considerados “modelos” ideais, mas, muitos deles, encontram-se

ameaçados e, conseqüentemente, a exploração de suas colônias em vida livre para pesquisa biomédica é considerada antiética (HEARN, 1983).

Os primatas da família Callithrichidae são hoje, animais importantes para questões cientificas relacionadas a muitos aspectos da biologia de desenvolvimento e reprodutivo, como por exemplo, imunologia, teratologia, câncer, cognição, comportamento e neuroendrocrinologia (HEARN, 1983).

Muitas espécies animais são consideradas de grande importância para pesquisas biomédicas, porém a família Callithrichidae é alvo de interesse nos aspectos de regulação social de fertilidade da fêmea (ABBOTT, 1984) e também na preocupação do status de ameaça de várias espécies em vida livre (MITTEREIER et al., 1988). Técnicas de reprodução assistida, como por exemplo, inseminação artificial possibilitam um intercâmbio de material genético entre colônias, com um risco menor de transmissão de doenças ou acidentes inerentes no transporte dos animais (MORREL, 1996). O sucesso da aplicação desta e de outras técnicas de reprodução assistida depende de conhecimentos básicos de fisiologia reprodutiva, ainda escassos, para muitas espécies de primatas (WILDT,1986).

Informações referentes aos perfis endócrinos dos ciclos ovarianos, assim como características da espermatogênese, do sêmen, o local exato e ideal para uma inseminação, são de vital importância para um programa de reprodução assistida (WILDT, 1986). A falta de sinais externos de estro e da ovulação em muitos dos primatas do Novo Mundo, torna ainda mais difícil a determinação do momento adequado para a inseminação artificial (HEARN, 1983). A monitoração rotineira de ovulação e prenhes em sagüis muitas vezes é essencial: por exemplo, para regular a taxa de reprodução em grandes colônias e para estudos sobre muitos aspectos de reprodução (NIEVERGELT; PRYCE, 1995).

Diante disto, o acesso ao estado fisiológico do animal é indispensável, tanto para a utilização rotineira deste como modelo biológico em pesquisas na área de reprodução, como para evitar a extinção de várias espécies. Informações precisas relacionadas com fisiologia reprodutiva nos primatas do novo mundo ainda são extremamente limitadas, enfatizando assim, a necessidade de mais estudos reprodutivos para estes animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Sistemática

Os primatas da família Callitrichidae pertencem à subordem Antropoidea. Esta é dividida em duas infraordems: Platirrinos e Catarrinos. Os Platirrinos são conhecidos como primatas neotropicais ou do Novo Mundo e se encontram na América do Sul. Os Catarrinos são comumente chamados de primatas do Velho Mundo e se encontram na África e na Ásia (ROWE, 1999).

O Brasil é o país com o maior número de espécies e subespécies de primatas do novo mundo, com 17 gêneros, 85 espécies e 126 espécies e subespécies (AURICCHIO, 1995; RYLANDS; MITTERMEIER; RODRIGUEZ-LUNA, 1995; RYLANDS et al., 2000).

A família Callitrichidae abriga os menores primatas antropóides do mundo (AURICCHIO, 1995). Existem 4 gêneros de Callitrichideos : *Callimico sp., Callithrix sp., Saguinus sp., Leontopithecus sp.* (ROWE, 1999).

O gênero Callithrix é composto atualmente por 6 espécies reconhecidas, *Callithrix jacchus, C. penicillata, C.kuhlii, C.geoffroyi, C.aurita* e *C. flaviceps* (RYLANDS et al., 2000). Destas, 50% encontram- se ameaçadas de extinção, são elas: *C.kuhli, C.aurita* e *C.flaviceps* (VALLE, 2007).

2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS CALLITHRICHIDEOS

2.1.1 Aspectos Gerais

Os Callitrichideos são caracterizados por uma combinação única de traços que os distingue de outros primatas e da maioria das outras espécies mamíferas. Normalmente eles vivem em grupos pequenos de 1 a 19 indivíduos (NEYMAN, 1977) com vários adultos de machos e fêmeas que pode conter tanto indivíduos com parentesco como sem parentesco (NIEVERGELT et al., 2000).

Por causa do seu pequeno tamanho, estes animais são vulneráveis a um grande número de predadores (NEYMAN, 1977). Seu corpo pequeno é considerado resultado de nanismo filético, provavelmente por causa de competição por alimento com outras espécies e a ocupação de um nicho insetívoro-frugívoro-gomívoro (EISENBERG, 1977; FORD, 1980).

São primatas de caudas compridas e que exibem várias características morfológicas raras entre os primatas antropóides. Apresentam tendência a gestação gemelar, unhas semelhantes a garras em todos os dígitos, exceto o dedão do pé e uma morfologia tritubercular nos molares superiores (SUSSMAN; KINZEY, 1984). Todas estas características típicas evoluíram como resultado de seleção pelo tamanho corporal pequeno. (FORD, 1980; MARTIN 1992).

Nos sagüis-de-tufos-brancos (*C.jacchus*) o tamanho de esqueleto adulto é alcançado por volta dos 12 meses (HEARN, 1983) e as fêmeas atingem a maturidade sexual em média aos 12-13 meses de idade, quando ocorre a primeira ovulação (ABBOTT et al., 2003; TARDIF et al., 2003). Nos machos, este processo ocorre aos 14-15 meses de idade, com o desenvolvimento da habilidade para copular e a ejaculação de espermatozóides móveis (ABBOTT et al., 2003; TARDIF et al., 2003).

Independentemente do número de fêmeas adultas em um grupo, a reprodução geralmente é restrita a uma única fêmea, que dá a luz a gêmeos relativamente pesados (ultrapassando 10% do peso corporal da mãe) e de desenvolvimento rápido (GARBER; LEIGH, 1997). Filhotes crescem com uma ajuda cooperativa de todos os membros do grupo, e especialmente dos machos que investem intensivamente em carregar os filhotes (GOLDIZEN, 1988; SAVAGE; GIRALDO; SNOWDON, 1996; GARBER, 1997), o que impõe a eles altos gastos energéticos (ACHENBACH; SNOWDON, 2002). Como em cativeiro as fêmeas exibem um estro pós-parto, geralmente 2-4 semanas após o nascimento (FRENCH et al., 2002), a gestação, a lactação e o cuidado com os filhotes, podem ocorrer simultaneamente (LOTTKER et al., 2004).

2.1.2 Sistemas de Acasalamento

Recentes estudos demonstraram que os Callitrichideos eram geralmente considerados monogâmicos, vivendo em unidades familiares estáveis, com um par reprodutivo e várias ninhadas. Este conceito foi baseado principalmente em evidências de estudos em cativeiro, que mostraram que estes grupos eram as formações mais estáveis, com altos níveis de agressão dos pares frente a indivíduos estranhos (EPPLE, 1975; KLEIMAN 1977; SAVAGE; BAKER, 1996).

No entanto, evidências mais recentes mostram que um padrão de acasalamento monogâmico não é estritamente mantido nem em vida livre nem em cativeiro (CARROLL, 1992). Uma organização social e sistemas de acasalamentos parecem ser caracterizados por variáveis flexíveis (CAINE, 1993; SAVAGE; BAKER, 1996). Há uma flexibilidade considerável mesmo dentro da mesma espécie: Goldizen (1990) encontrou grupos monogâmicos, poliândricos e poligínicos de *S. fuscicollis* e sugere que essa variabilidade esteja associada a fatores demográficos e à necessidade de ajudantes para cuidar dos filhotes com sucesso.

Para Rylands (1982), o cuidado com filhotes é uma estratégia do macho para cortejar a fêmea, e a poliginia facultativa é resultante da incerteza dos machos pela paternidade. Acredita-se que a explicação para a inibição reprodutiva é a monopolização da cooperação do grupo no cuidado com os filhotes (RYLANDS, 1982; ABBOTT; BARRETT; GEORGE,1993).

Estudos feitos em vida livre e em cativeiro revelaram que poliandria e poliginia também ocorrem com outros Callitrichideos, e pode levar a grupos mais estáveis (TERBORGH; GOLDIZEN, 1985; PRICE; MCGREW, 1991; ROTHE; KOENIG, 1991; DIETZ; BAKER, 1993).

Para Saltzman (1997), poligamia no *C.jacchus* e em outros Callitrichideos, muitas vezes, foi considerada uma condição não estável ou de transição (TERBORGH; GOLDIZEN, 1985; PRICE; MCGREW, 1991; DIETZ; BAKER, 1993). Se essa hipótese for correta, então alguns mecanismos devem efetivamente operar para retornar à monogamia em grupos previamente polígamos. Uma possibilidade é o surgimento de uma segunda fêmea reprodutiva causando uma série de comportamentos agressivos entre as duas fêmeas, levando a uma alteração da relação de dominância entre elas e possivelmente resultando em uma imposição de

supressão reprodutiva na fêmea subordinada. Este fenômeno foi descrito em roedores com reprodução cooperativa (PAYMAN; SWANSON, 1980). Outra possibilidade é de uma fêmea reprodutiva ser expulsa do grupo, ou por periferalização ou por agressão de outro membro (SALTZMAN et al., 1997).

2.1.3 Fisiologia Reprodutiva dos Callithrichideos

Os estudos experimentais mais detalhados sobre o ciclo ovariano e comportamento sexual em um primata do novo mundo têm como modelo o *C.jacchus*. (KENDRICK; DIXSON, 1983), onde a progesterona aparece primeiramente aumentada no plasma da fêmea em torno de 300 dias de idade, mas o padrão não sugere ovulação normal até 6-12 meses depois (HEARN,1983).

Da mesma forma que a maioria dos primatas do novo mundo, as fêmeas dos Callithrichideos não menstruam. Não há sinais externos aparentes, que permitam uma previsão ou detecção de ovulação (HEARN, 1983).

Várias considerações em relação à duração do ciclo ovariano do *C. jacchus* foram relatadas. Hearn e Lunn (1975) descreveram um ciclo com duração media de 16.4 dias enquanto Harding et al. (1982) observaram um ciclo ovariano de 30.4 dias. Por mais que os dois relatos sejam oriundos da mesma colônia, os sagüis usados no primeiro estudo foram capturados da natureza e haviam sido introduzidos na colônia há pouco tempo. No segundo estudo, os animais utilizados eram nascidos na colônia. Anos depois Hearn (1983) relatou um ciclo ovariano no *C.jacchus* de 28.6 +/- 10 dias. O ciclo pode ser dividido numa fase folicular de 8.3 +/- 0.3 dias e uma fase lútea de 19.2 +/- 0.6 dias (HEARN, 1983).

Como em outros primatas, a fase folicular é caracterizada por níveis basais de progesterona circulante, aumentos nos níveis de estradiol e um pico pré-ovulatório de LH (GILCHRIST et al., 2001). Os valores absolutos dos níveis de esteróides ovarianos secretados durante o ciclo são considerados muito altos (8 a 10 vezes), quando comparados com os primatas do velho mundo e humanos (HEARN, 1983; MOHAN, 2005).

No plasma do *C.jacchus,* a fase lútea de cada ciclo ovariano foi definida a partir do aumento sustentado dos níveis de progesterona plasmática acima de

10ng/ml, até sua redução a níveis basais. A ovulação deve ocorrer aproximadamente 24 horas antes do aumento de progesterona acima de 10ng/ml. A fase folicular consiste no restante do ciclo, onde níveis de progesterona estão abaixo de 10ng/ml (KENDRICK; DIXSON , 1983).

No *C.jacchus,* os perfis de metabólitos de estrógeno urinário ou fecal não revelam pico destes metabólitos antes da ovulação, como encontrado nos primatas no velho mundo. Os metabólitos de estrógenos apresentam aumento semelhante ao encontrado para os metabólitos de progesterona, com uma elevação mantida durante a fase lútea presumida dos ciclos ovulatórios, padrão este típico de primatas do novo mundo (ZIEGLER et al., 1996).

Alguns Callitrichideos como, por exemplo, o *C. jacchus*, apresentam características reprodutivas singulares que o tornam um interessante modelo biológico para estudar a dinâmica da foliculogênese. Nestas espécies, ao contrário de outros primatas, ocorre a ovulação de mais de um folículo por ciclo, sendo possível que até quatro folículos cheguem à ovular em um mesmo ciclo, potencialmente gerando até quatro filhotes da mesma gestação (GILCHRIST et al., 2001).

O *C.jacchus* apresenta ciclos ovarianos contínuos durante todo o ano, não havendo portanto sazonalidade reprodutiva como em outras espécies primatas como o rhesus (*Macaca mulatta*) (HEARN, 1983). O estro pós-parto pode ser observado 5 dias após o nascimento dos filhotes (CHAMBERS; HEARN, 1979).

2.1.4 Gestação, Parto e Lactação

Fêmeas de *C.Jacchus*, em cativeiro, conseguem conceber com 13 meses e dar a luz com 18 meses (SUSSMAN; KINZEY, 1984).

O tempo médio de duração da gestação nos *Callithrix sp* é de 144 dias (CHAMBERS; HEARN, 1979; FRENCH et al., 1996). O *C. jacchus* tem um período médio de gestação de 148 +- 4.3 dias, calculado do dia do pico de LH ovulatório ao dia do parto e, normalmente produz gêmeos (80%), trigêmeos (15%) ou filhote único (5%) (HEARN, 1983). Ovulações de 2,3 ou 4 óvulos por ciclo são normalmente vistos no *C. jacchus* de cativeiro, e por esta razão, crias de 1 a 4 filhotes são

comumente observadas. Não se sabe o número de óvulos ovulados por ciclo em *C.jacchus* de vida livre, mas crias com 1 a 2 filhotes são as mais observadas (TARDIF; JAQUISH,1997). Segundo Tardif e Jaquish (1997), a idade materna não afeta o número de óvulos por ciclo, nem o número final de produtos nos Callithrichideos. Dados de colônias de reprodução em cativeiro de primatas da família Callitrichidae, sugerem que tanto o tamanho médio quanto o tamanho máximo de crias pode aumentar com melhorias na nutrição e que a variação da produção de óvulos por ciclo, pode estar relacionada com diferenças na disponibilidade energética, estimadas pelo peso corporal (TARDIF; JAQUISH, 1997).

O número alto de filhotes nos Callitrichideos pode provocar problemas para as fêmeas, pois o peso destes pode ultrapassar 10 % do peso corporal da mãe. Em casos extremos, o peso dos filhotes pode chegar a aproximadamente 28 % do peso da mãe (EISENBERG, 1977).

No *C.jacchus,* o padrão de variação dos níveis séricos de progesterona é semelhante ao da mulher, onde os níveis da fase lútea são mantidos no primeiro terço da gestação, seguidos por um aumento gradual no terço seguinte (TULCHINSKY et al., 1972). Isso também é demonstrado pelo fato do corpo lúteo ser essencial apenas no terço inicial da gestação (HEARN, 1978) e o desenvolvimento embrionário não estar completo até o 84º dia (PHILIPS, 1976). O aumento relativo dos níveis de progesterona observados durante a gestação do *C.jacchus* apresenta menor magnitude do que na mulher, devido possívelmente, aos comparativamente mais altos níveis da fase lútea do Calithrichideo (TULCHINSKY et al., 1972).

Diferente dos outros primatas, onde é evidente que uma queda dos níveis de progesterona plasmática no sangue periférico não seja um pré-requisito para o início do parto (DAVIES; RYAN, 1972), o *C.jacchus* mostra uma queda clara na progesterona plasmática durante as últimas semanas da gestação. Os perfis de estradiol são similares aos descritos na mulher (RADO; CRYSTLE; TOWNSLEY, 1970), rhesus (*Macaca mulatta*), (CHALLIS et al., 1974) e chimpanzés (*Pan troglodytes*) (REYES et al., 1975), onde as concentrações máximas são encontradas na última semana da gestação (CHAMBERS; HEARN, 1979).

Nos últimos 3 a 4 dias antes do nascimento, os níveis de estrógeno aumentam significativamente para alcançar um pico no parto e depois diminuir a níveis não detectáveis no dia seguinte após o parto (HEARN, 1983). Resultados do

monitoramento dos níveis plasmáticos de cortisol e de progesterona evidenciaram que os níveis destes hormônios no plasma sanguíneo das fêmeas de *C. jacchus* diminuem logo após o parto (SALDANHA et al., 2005).

Em populações de *C.jacchus* mantidas em cativeiro, nascimentos ocorrem o ano todo, com freqüência maior no período de dezembro-março, que corresponde à segunda metade da estação seca e o inicio da estação de chuva. (SOUSA et al., 1999).

Dados de campo sugerem que nascimentos podem ocorrer em qualquer mês do ano, mas são mais comuns de setembro a novembro, com um possível segundo pico em março-maio (RYLANDS, 1982; HUBRECHT, 1984; STEVENSON; RYLANDS, 1988; COUTINHO; CORREA, 1995; MENDES PONTES; MONTEIRO DA CRUZ, 1995). O pico de nascimentos coincide com o inicio da estação seca, por volta de outubro-novembro, enquanto o segundo pico ocorre no inicio da estação de chuva (março-abril) (HUBRECHT, 1984).

Há algumas evidências sugestivas de sazonalidade para picos de nascimento (dois por ano) nos estudos com Callitrichideos em vida livre. No entanto, essa distribuição de picos bimodal não parece ser consistente, principalmente em cativeiro. Logo, o incremento nutricional das dietas tem sido discutido como fator importante no aumento da produtividade de algumas espécies (KLEIMAN et al., 1988).

Em contraste com o homem e demais primatas do velho mundo, a lactação dos Callitrichideos não inibe o crescimento folicular (HEARN, 1983) e não interfere com a ovulação nos *C.jacchus* (SALDANHA et al., 2005). Os intervalos de nascimentos de 5 a 8 meses relatados para *C.aurita, C.flaviceps, C.humeralifer* e *C.jacchus* indicam que a concepção pode ocorrer na primeira ovulação pós-parto (RYALNDS, 1982; HUBRECHT, 1984; MENDES PONTES; MONTEIRO DA CRUZ, 1995). Em cativeiro, a primeira ovulação ocorre em torno de 10 dias após o parto em *C.Kuhli*: 13.6 +/- 1.2 dias , amplitude de variação de 9-24 (FRENCH et al., 1996); em *C.Jacchus* : 7.6 dias +/- 6.7 dias, amplitude de variação de 0-47 (LUNN; MCNEILLY, 1982); 13.8 +/- 1.3 dias , amplitude de variação de 10 -18 (DIXSON; LUNN, 1987); 10.5 +/- 0,7 dias, amplitude de variação de 5-17 (CHAMBERS; HEARN,1979). A porcentagem de fêmeas que concebem na sua primeira ovulação pós-parto é em torno de 80% em *C. Kuhli* (FRENCH et al., 1996) 91.7 % em *C. Jacchus*

(CHAMBERS; HEARN, 1979). Hearn e Lunn (1975) reportaram que o *C.jacchus* copula 3 a 10 dias após o parto.

Os filhotes são amamentados normalmente, por um período de aproximadamente 70 dias após o nascimento, embora alguns filhotes possam mamar por até 100 dias. O desmame se inicia 30 dias após o nascimento, quando os filhotes já conseguem segurar os alimentos com suas próprias mãos ou receber alimentos oferecidos pelos seus pais (HEARN, 1983).

2.1.5 Quimerismo nos Callithrichideos

Mesmo com relatos de nascimentos de filhotes únicos e trigêmios em todos os gêneros de Callitrichideos (KLEIMAN; HOAOE; GREEN, 1988; SNOWDON; SOINI, 1988; SOINI, 1988; STEVENSON; RYLANDS, 1988), os gêmeos representam o tipo de ninhada mais freqüente.Como os gêmeos de Callitrichideos desenvolvem-se a partir de diferentes oócitos, a gestação gemelar pode ter induzido algumas especializações, como por exemplo, mecanismos de prevenção da masculinização de um feto feminino, através de uma possível liberação de testosterona pelo feto masculino dentro da circulação da placenta compartilhada (MARTIN, 1992).

Quimerismo genético - a mistura de duas ou mais linhas genômicas dentro de um individuo - é rara nos mamíferos, mas é prevalente nos tecidos hematopoiéticos dos *C.jacchus* e outros de Callitrichideos. Nessas espécies, gêmeos fraternos trocam linhas celulares pela fusão coriônica durante o desenvolvimento inicial (ROSS; FRENCH; ORTI, 2006).

Células de ambos os produtos de concepção colonizam a medula óssea de ambos os gêmeos. Como resultado, amostras de sangue de *C.jacchus* adultos com um gêmeo do sexo oposto contem linfócitos com cariótipo XX e XY. No *C.jacchus* , normalmente existem mais células XY do que XX no sangue de ambos os gêmeos. Mesmo com esse quimerismo não há evidencias de intersexualidade ou subfertilidade (HAIG, 1999).

No *S.geoffroyi*, Wislocki (1939) observou que as artérias da placenta dos gêmeos se sobrepõem livremente dentro do seu território de distribuição, e não é

possível achar nenhum limite definitivo dentro dos discos da placenta que separe as células de um gêmeo do outro. Não somente a circulação dos gêmeos fica intimamente misturada, mas também conectadas por anastomoses vasculares, claramente visíveis na superfície da placenta (HAIG, 1999).

Estudos indicaram que durante o final da gestação, fetos de machos e fêmeas apresentam níveis de testosterona circulante similar ao do sangue; a fêmea parece não ser afetada no seu desenvolvimento gonadal ou comportamental (HEARN, 1983).

2.1.6 Comportamento Reprodutivo

Há poucos estudos sobre Callithrichideos que associem comportamento reprodutivo com a fase do ciclo ovariano. Em cativeiro, no *Callithrix jacchus*, a fase peri-ovulatória foi associada com um aumento na freqüência do comportamento proceptivo da fêmea, como também, com uma diminuição da agressividade desta (DIXSON, 1993).

A cópula nos Callithrichideos ocorre de forma semelhante à de todos os primatas. A fêmea fica em posição quadrupedal, com as pernas flexionadas e o macho a monta enquanto ela se mantém agachada, por menos de um minuto. Geralmente, várias penetrações precedem uma ejaculação (EISENBERG, 1961).

Entre os primatas do novo mundo algumas espécies têm comportamentos sócio-sexuais diferentes dos descrito para os primatas do velho mundo. Fêmeas de Callithrichideos, como por exemplo o *C. jacchus*, não exibem “apresentação das patas traseiras” como um comportamento proceptivo. Ambos os sexos demonstram uma “apresentação genital característico da espécie” com as patas traseiras enrijecidas e a cauda arqueada sobre as costas. Esta demonstração ocorre normalmente quando o parceiro dominante apresenta a genitália a um animal de hierarquia mais baixa (EPPLE, 1975).

O *C. jacchus* pode copular durante todo o ciclo ovariano, como o macaco – da - noite (*A. trivirgatus boliviensis*) (DIXSON, 1983). Já nos micos-de-cheiro (*Saimiri vanzolinii),* a cópula ocorre somente durante o período peri-ovulatório (WILSON, 1977).

Fêmeas de *C.jacchus* convidam o macho para a cópula permanecendo imóvel, encarando o macho, e fazendo movimentos rítmicos de protrusão da língua. A proceptividade aumenta significantemente durante a fase peri-ovulatória e diminui ou desaparece completamente na maioria das fêmeas, quando a fase lútea se inicia (KENDRICK; DIXSON, 1983).

Segundo Kendrick e Dixson (1983) não há variação significativa nos seguintes comportamentos: freqüências de cópulas, cheirar/lamber a região ano-genital, catação social, convites de catação, marcação genital ou comportamentos de apresentação do genital, demonstrados pela fêmea durante o ciclo ovariano. A atividade sexual dos machos de *C. jacchus* aumentada durante a fase peri-ovulatória está correlacionada com a apresentação de movimentos rápidos de exteriorização da língua, que caracterizam um comportamento proceptivo da fêmea, como já citado, e que é exibido quase que exclusivamente neste período. Nos estudos de Kendrick e Dixson (1983) quando há ausência ou diminuição da freqüência do comportamento de expor a língua em movimentos rápidos pela fêmea durante a fase peri-ovulatória, o desempenho do macho diminui indicando que a mudança de odor urinário ou genital não é o suficiente para justificar o aumento de cópulas observado neste período. Porém, acredita-se que tais sinais não comportamentais possuem influência, mesmo não sendo o responsável pelo aumento de cópula no período peri-ovulatório, visto que as cópulas ocorrem durante todo o ciclo (KENDRICK; DIXSON, 1983).

O *C. jacchus* exibe um sistema de reprodução cooperativo, onde os indivíduos permanecem com seus grupos nativos até serem adultos, ajudando a cuidar dos filhotes mais novos, do macho e fêmea dominantes, enquanto eles mesmos não se reproduzem (SALTZMAN et al., 1997).

2.1.7 Supressão de Reprodutiva

Vários autores relataram a ocorrência da inibição fisiológica e/ou comportamental da atividade reprodutiva nos callitrichideos, pelo menos em cativeiro (KLEIMAN; HOAOE; GREEN, 1988; SNOWDON; SOINI, 1988; SOINI, 1988;

STEVENSON; RYLANDS, 1988; FRENCH; INGLETT, 1989; ABBOTT; BARRET; GEORGE, 1993).

A supressão da ovulação das fêmeas subordinadas pela fêmea dominante é comportamental e endócrina; já nos machos a supressão é apenas comportamental, o que possibilita aos machos subordinados, a capacidade de se reproduzir com fêmeas dominantes (STEVENSON; RYLANDS, 1988). Nos gêneros *Callithrix sp., Saguinus sp.* e *Cebuella sp.,* isso ocorre por supressão fisiológica do ciclo ovariano (ABBOTT, 1984; FRENCH; ABBOTT; SNOWDON 1984). No *Leontopithecus sp.* e *Callimico sp.,* fêmeas subordinadas ciclam, mas são presumidamente inibidas por comportamento (FRENCH; INGLETT; DETHLESS, 1989; CARROLL et al., 1990; ABBOTT; BARRET; GEORGE, 1993).

Normalmente, em cativeiro, somente uma fêmea se reproduz em grupos de *C.jacchus*, com as outras fêmeas demonstrando vários graus de supressão ovariana devido à secreção inadequada de LH (O'BRYNE; LUNN; DIXSON, 1987). A anovulação em filhas de *C.jacchus* parece ser causada pela supressão da liberação do hormônio luteinizante (LH) da glândula pituitária: níveis circulantes de LH nas filhas são baixos e tônicos, comparados aos das fêmeas dominantes que estão ciclando (ABBOTT, 1993). As fontes de variação inter-animal na supressão de ovulação e da liberação de LH não são conhecidas (SALTZMAN et al., 1997).

No *Callithrix jacchus* a maioria das filhas mantidas junto com sua família e a maioria das fêmeas subordinadas mantidas em grupos sociais de adultos sem parentesco não ovulam (ABBOTT, 1984; EVANS; HODGES, 1984). Mas segundo Jurke (1996), a supressão fisiológica do ciclo das fêmeas não é um fenômeno absoluto, como demonstrado por Abbott (1984) para o *Callithrix Jacchus* e por Carroll (1986) para o *Callimico sp.*, onde filhas podem ovular na presença de suas mães, se ambas estiverem com machos sem parentesco. Como parte da explicação de supressão de ovulação em grupos familiares, foi sugerido que um mecanismo preventivo de consangüinidade esteja envolvido (JURKE, 1995). No *Leontopithecus sp.*, não há evidência de supressão de ovulação, nem em filhas, nem nas mães ou em alguma fêmea subordinada por fêmeas dominantes sem parentesco. Nenhuma filha foi observada copulando com machos (pai ou irmão) no seu grupo de família, indicando uma inibição comportamental de interação sexual (ABBOTT; BARRET; GEORGE, 1993).

No *C.jacchus,* a marcação por cheiro, também parece estar envolvida com inibição reprodutiva entre fêmeas (BARRET; ABBOTT; GEORGE, 1990; SMITH; ABBOTT, 1998). Estudos demonstraram que a fêmea dominante inibe o ciclo ovariano de fêmeas subordinadas, provavelmente por meio de sinalização odorífera (SOUSA et al., 1999). Pesquisadores relataram possíveis usos da marcação dentro de um contexto reprodutivo pelo *C.jacchus* em duas formas: da fêmea dominante para a fêmea subordinada, como parte dos mecanismos envolvidos na inibição reprodutiva (ABBOTT, 1984; SMITH; ABBOTT, 1998) e também por fêmeas subordinadas de vida livre para os machos, para sinalizar seu "status" reprodutivo (LAZARO; SNOWDON; ARRUDA, 1999).

Em várias espécies de primatas, fêmeas subordinadas em grupos sociais podem não exibir ciclicidade ovariana ou apresentar fertilidade reduzida (ABBOTT, 1984). Nos machos, a redução na concentração plasmática de testosterona pode ocorrer como resultado de posição social baixa (O'BRYNE; LUNN; DIXSON, 1987).

Segundo Hearn (1983) no *C. jacchus,* estudos mostram que em vida livre, somente uma fêmea no grupo reproduz. As outras podem carregar seu filhote, mas são inibidas de reproduzir. No laboratório foi possível testar este fenômeno que não é comumente observado em outros primatas, mas os mecanismos pelo qual isto é controlado, ainda não são compreendidos (HEARN, 1983). Hearn (1983) mostrou que a fêmea dominante cicla regularmente, mas as outras permanecem acíclicas, e assim inférteis, enquanto a fêmea dominante está presente. Se a fêmea dominante for removida do grupo, a próxima fêmea na hierarquia começa a ciclar.

Outro fator que foi implicado na supressão de ovulação nas fêmeas de Callitrichideos é a relação dominante entre irmãs. Por exemplo, Heistermann et al. (1989) demonstraram que em quatro famílias de sagüi-de-topete *(Saguinus oedipus)* onde a mãe faleceu, somente a filha mais velha ovulava.

Tanto a supressão comportamental, quanto a fisiológica podem ser revertidas quando filhas que não estão se reproduzindo são retiradas de seu grupo familiar e pareadas com um macho desconhecido. Neste caso, elas passam a copular, podendo ovular dentro de algumas semanas, tornando-se gestantes (ABBOTT, 1984; EVANS; HODGES, 1984; FRENCH; ABBOTT; SNOWDON, 1984; ZIEGLER; BRIDSON; SNOWDON, 1987; HUBRECHT, 1989). Como em outros mamíferos que se reproduzem cooperativamente, o fracasso reprodutivo entre as fêmeas subordinadas de Callitrichideos nem sempre é absoluto (CREEL; WASSER, 1996).

Tanto em grupos de vida livre, quanto em cativeiro de várias espécies de Callitrichideos, duas fêmeas, muitas vezes sabidas ou presuntivamente tidas como mãe e filha, foram identificadas como estando prenhes simultaneamente ou parindo dentro de um mesmo período de tempo (ABBOTT, 1984; TERBORGH; GOLDIZEN, 1985; RODA; RODA, 1987; ROTHE; KOENING, 1991; PRICE; MCGREW, 1991; DIETZ; BAKER, 1993; COUTINHO; CORREA, 1995; MENDESPONTES; MONTEIRO DA CRUZ, 1995; SAVAGE; GIRALDO; SNOWDON, 1996).

Diversos estudos com *C.jacchus* mantidos em cativeiro, também indicaram que pode ser relativamente comum para filhas escaparem da supressão de ovulação enquanto mantidas junto com suas famílias. Assim, dados de campo e de laboratório sugerem juntos que, pelo menos entre os *C.jacchus*, um número substancial de filhas pode fugir da supressão de ovulação enquanto mantidas junto com suas famílias e que sob certas circunstâncias, algumas dessas filhas podem até dar a luz. A supressão reprodutiva dentro de famílias tem sido freqüentemente descrita como inibição relacionada à hierarquia imposta às filhas, pelas mães (ROTHE, 1975). Em laboratórios, nos grupos sociais com adultos sem parentesco, as fêmeas subordinadas apresentaram anovulação em resposta a introdução de uma fêmea dominante (ABBOTT, 1984).

As conseqüências sociais da não supressão de ovulação, assim como as suas causas, ainda não são conhecidas (SALTZMAN et al., 1997).

2.1.8 Cuidado Parental

Entre os mamíferos, o cuidado paternal não é relativamente comum e tem sido observado em carnívoros, roedores e primatas (KLEIMAN; MALCOM ,1981). A participação de machos reprodutivos parece estar relacionada com a disponibilidade de fêmeas, acesso a elas durante o período fértil, à presença de predadores e defesa de recursos específicos (KLEIMAN, 1977).

Cuidado extra-maternal de filhotes é um comportamento característico dos Callitrichideos, normalmente ocorrendo entre o 1º e 11º dia do pós-parto na forma de carregar o filhote (JURKE; PRYCE, 1994). O aumento de gasto energético na mãe lactante provavelmente criou uma seleção positiva para aumento de cuidado

parental por parte do macho e de filhotes mais velhos (EISENBERG, 1961). O grau de cuidado exibido pelos pais e pelos irmãos mais velhos nos Callitrichideos é considerado único entre os primatas (SNOWDON; SOINI, 1988).

Os filhotes de Callitrichideos são carregados extra-maternalmente, durante alguns dias após o nascimento, sendo a mãe a sua a principal carregadora nas primeiras 2-3 semanas (SOINI, 1982). O primeiro contato com o pai é até certo ponto relacionado ao peso corporal dos adultos e dos filhotes, como por exemplo, no *Cebuella sp*, o mais leve dentre os Callitrichideos, que apresenta um peso corporal de 110g (SOINI, 1982) transfere seus filhotes aos pais antes do que os *Leontopithecus sp*, que são mais pesados 710 g (KLEIMAN; HOAOE; GREEN, 1988).

Goldizen (1990) argumentou que o cuidado parental co-evolui com a gestação gemelar para dar conta do aumento de demanda em cuidar de dois recém nascidos. Outros autores têm sugerido o papel de fatores ecológicos como a pressão de predadores e a disponibilidade restrita por um habitat para reproduzir (HAIG, 1999).

2.2 MANEJO REPRODUTIVO EM CATIVEIRO

O *Callithrix jacchus* reproduz mais rápido em cativeiro do que qualquer outro primata. Por causa do seu pequeno tamanho (peso corporal de um adulto 400g) é fácil a manutenção de grupos familiares em cativeiro, assim eliminando problemas de estresse associados a indivíduos mantidos sozinhos, como no caso de babuínos (HEARN, 1983).

O *C.jacchus* se adapta bem ao cativeiro, ao manejo e aos procedimentos experimentais, ainda mais se um sistema de recompensa for oferecido. São econômicos para manter, geralmente produzem gêmeos e por causa de seus intervalos de gestação curtos, podem ser fácilmente estabelecidas colônias em cativeiro, que se reproduzem e se auto sustentam em menos tempo e a um custo inferior se comparado a outras espécies de primatas maiores, que são comumente utilizados em laboratórios (HEARN, 1983).

2.3 O SAGÜI-DE-TUFOS-PRETOS (*Callithrix penicillata*)

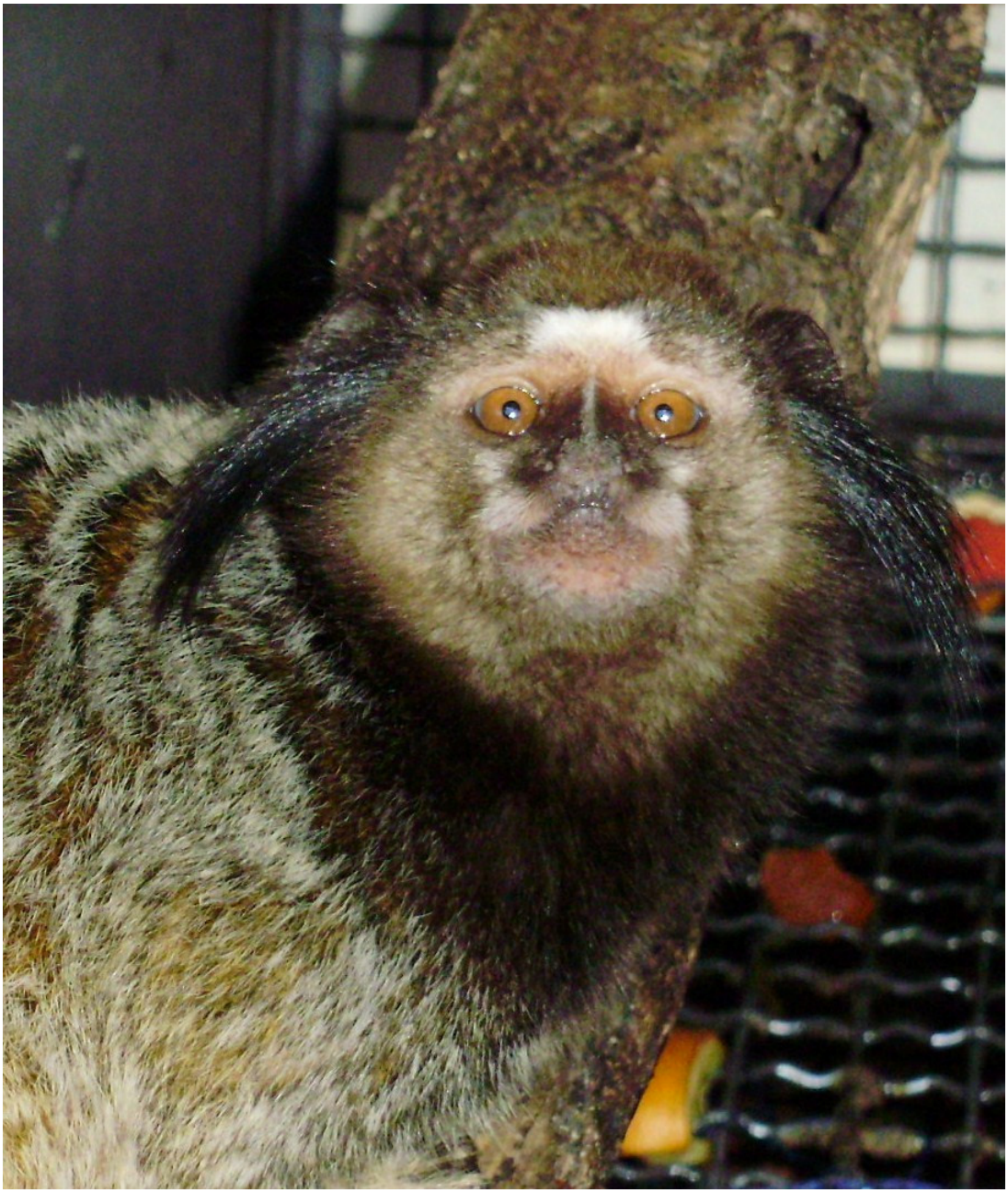

Figura 1 - Fêmea de Sagui-de-Tufos-Pretos (*Callithrix penicillata*) – Sorocaba - 2008

O *Callithrix penicillata* (Figura 1) também conhecido como sagüi-de-tufos-pretos, pertence à família Callitichidae (STEVENSON; RYLANDS, 1988; FARIA, 1989; AURICCHIO, 1995), tem por volta de 20 cm de altura e pesa entre 350 a 500 gramas (STEVENSON; RYLANDS, 1988; FARIA,1989). É um animal de hábitos diurnos e arbóreos. O *C.penicillata* esta distribuído pelo estado de Goiás, Tocantins,

Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, Norte do Rio de Janeiro e Oeste da Bahia. Esta espécie, assim como as demais do gênero *Callithrix sp.*, demonstra grande diversidade de habitats que pode ocupar (KINZEY, 1997; SUSSMAN, 2000). Vive em grupos de 3 a 13 indivíduos que ocupam amplas áreas (AURICHIO, 1995; ROWE, 1996). A dieta deste pequeno primata consiste de frutas, insetos, néctar, exsudato de plantas, insetos e folhas (SANTEE; FARIA, 1985). O padrão de nascimento é de duas vezes ao ano coincidindo com a estação das chuvas, agosto a outubro e de janeiro a fevereiro. Assim, a ocorrência de nascimentos seria mais provável de acontecer durante períodos de maior abundância de recursos naturais (VILELA; FARIA, 2003).

O período gestacional é em torno de 150 dias, quando normalmente, nascem dois filhotes, que recebem cuidados do grupo todo, principalmente do pai e dos irmãos mais velhos. Os filhotes são amamentados até os 6 meses e com 18 meses estão aptos à reprodução (FEDIGAN, 1992).

2.4 MÉTODOS NÃO INVASIVOS

Históricamente, o primeiro método não-invasivo aplicado para estudos endócrino-comportamentais em primatas foi a mensuração de metabólitos hormonais urinários (CZEKALA et al., 1981; MCARTHUR et al., 1981). A mensuração de metabolitos de esteróides na urina fornece informações importantes para a caracterização da ciclicidade ovariana e da gestação em uma grande variedade de mamíferos. Entretanto, o uso de metabolitos fecais em estudos reprodutivos tornou-se o mais usado em várias espécies de primatas pela maior facilidade de obtenção das amostras (LASLEY, 1985) e diferentemente da urina, a colheita de fezes é relativamente fácil quando os animais estão mantidos em grupos ou encontrados em vida livre (WASSER; RISLER; STEINER, 1988). Nos últimos anos, a mensuração de metabólitos de hormônios esteróides ovarianos em fezes e urina tem sido aplicada com sucesso em várias espécies de primatas (CAROSI et al., 1999).

O diagnóstico realizado em fezes para determinar uma condição interna de um individuo, não é uma ciência nova, mas apenas nos últimos 30 anos, passou-se

a utilizar a extração, análise e mensuração de metabólitos fecais de hormônios esteróides, como ferramenta para estudos de fisiologia reprodutiva. A primeira extração a partir de fezes humanas para determinar perfis de metabólitos de esteróides reprodutivos foi relatada por Adlercreutz et al. (1976). Mais de uma década se passou antes que esteróides fossem extraídos de fezes de primatas não humanos. Risler et al. (1987) foram os primeiros a desenvolver métodos de acesso não invasivo da condição reprodutiva de um animal. Estes métodos agora são amplamente usados para investigar as relações endócrino - comportamentais e também as questões sobre reprodução, bem estar animal, biologia da conservação e biomedicina (KENDRICK; DIXSON, 1983; WASSER; RISLER; STEINER, 1988; HEISTERMANN; TARI; HODGES, 1993; ZIEGLER et al., 1996).

Como os callitrichideos não exibem sinais claros e visíveis de seu status reprodutivo e, como eles copulam durante todo o ciclo, a cópula não é um indicativo da ocorrência da ovulação (HEARN, 1983). Portanto, a aplicação de métodos de monitoramento endócrino se faz necessária para determinar as fases do ciclo ovariano e o período peri-ovulatório (HEISTERMANN; TARI; HODGES, 1993). A detecção de metabólitos de hormônios reprodutivos em urina e fezes permite um monitoramento reprodutivo não invasivo, que além de não produzir reações estressantes, não promove alterações sociais ou comportamentais que afetem a fertilidade (ZIEGLER et al., 1996).

A caracterização sistemática de ciclos ovarianos de primatas não humanos pela mensuração de hormônios esteróides tradicionalmente requeria a colheita diária ou quase diária de amostras sanguíneas. Devido o tamanho pequeno de, por exemplo, a fêmea de mico-de-cheiro (*Saimiri vanzolini*), tal regime de amostra sanguínea se torna inadequado e comprometedor à saúde do animal (MOORMAN et al., 2002).

Vários estudos mostraram a presença de quantidades mensuráveis de metabólitos de esteróides sexuais em fezes de primatas (RISLER; WASSER; SACKETT, 1987; WASSER; RISLER; STEINER, 1988). O acesso por urina ou fezes possui uma grande vantagem em permitir monitoramentos de longo prazo da função reprodutiva de animais em que a colheita diária de sangue é impraticável. A concentração metabólica hormonal na excreção é duas a quatro vezes maior do que a do esteróide no sangue (SHIMIZU, 2005).

Metabólitos de estrógenos e progesterona foram mensurados em amostras de urina (HODGES et al., 1983) e em amostras fecais (HEISTERMANN; TARI; HODGES, 1993). A mensuração de esteróides em fezes parece ser tão informativa quanto a análise de urina para a determinação retrospectiva de ovulação em Callitrichideos (NIEVERGLET; PRYCE, 1995). O uso de análise de esteróide fecal para verificar função gonadal e adrenal em primatas cresceu acentuadamente nos últimos anos devido à facilidade de se coletar fezes de primatas não humanos em cativeiro e vida livre. Essas técnicas oferecem um novo potencial animador para aprimorar nosso conhecimento do status endócrino em animais de vida livre (SOUSA; ZIEGLER, 1998).

Segundo Heisterman (1993), a maior parte dos metabólitos fecais é eliminada sob a forma não-conjugada,também chamada de forma livre. Isto se dá pela ação enzimática nas fezes e de bactérias fecais sobre os metabólitos que foram conjugados no fígado e eliminados no duodeno através da bile. Esta proporção é descrita como sendo de 65 a 85%, variando de acordo com a espécie, com o hormônio e com a fase do ciclo ovariano (HEISTERMANN, 1993). Por sua vez, na urina a maior parte dos metabólitos é eliminada na forma conjugada e portanto mais hidrossolúvel (HODGES et al., 1983).A principal rota de excreção (fezes ou urina), o principal metabólito excretado e sua forma (se conjugado ou livre) e o intervalo de tempo entre uma alteração sérica dos níveis do esteróide e a sua correspondente excreção nas fezes ou urina, podem variar consideravelmente entre as espécies e entre os esteróides em uma mesma espécie animal (GRAHAM, 2004). Assim, estes métodos não invasivos têm que ser rigorosamente validados para cada espécie antes da sua aplicação (PALME, 2005).

O intervalo de tempo entre um pico hormonal sérico e o correspondente aumento de seus metabólitos na urina é curto (horas) e esta relacionado com a taxa metabólica do animal (PALME, 2005). Já o mesmo intervalo de tempo, medido para o correspondente aumento de metabólitos fecais, além da relação com a taxa metabólica, também sofre influência do tempo de trânsito intestinal, sendo mais longo que o dos metabólitos urinários, variando de horas a dias (HEISTERMANN, 1993; PALME, 2005). Desta forma, os esteróides são excretados nas fezes em tempos diferentes devido às características de sua metabolização no fígado e conseqüente reabsorção nos intestinos e eliminação nas fezes e na urina. Alguns

esteróides, como o estradiol, são altamente conjugados no fígado e podem ter retardado seu tempo de excreção nas fezes (ZIEGLER et al.,1996).

Heisterman (1993) relatou um intervalo de médio de 48 horas entre um aumento em progesterona plasmatica e um aumento significativo nos metabólitos fecais, já Ziegler et al. (1996) reportou que o início de aumento de progesterona fecal no *C.jacchus* ocorre 1 dia após o aumento de progesterona circulante. Portanto, as quantidades mensuradas de esteróides fecais refletem um evento que aconteceu há certo tempo atrás (PALME, 2005).

Mesmo considerando o atraso na excreção fecal de esteróides, metabólitos fecais de estrógenos não demonstraram um aumento de concentração durante a fase folicular do ciclo ovariano para o *C.jacchus* (ZIEGLER et al., 1996).

Amostras fecais em sagüis devem ser coletadas de preferência no início da manhã por duas razões: Primeiro, a probabilidade de coleta de fezes logo que os animais acordam, é de quase 100% (SOUSA; ZIEGLER, 1998). Segundo, para haver uma padronização nas coletas de amostras, uma vez que podem ocorrer variações nas concentrações de alguns metabólitos de esteróides entre o período da manhã e da tarde. Este procedimento evitaria a ocorrência de falsos resultados. Por exemplo: o perfil de metabólitos fecais de progesterona de *C. jacchus* mostra um padrão de variação diurna com valores mais altos pela manhã (SOUSA; ZIEGLER, 1998). Já em relação aos metabólitos fecais de estradiol, segundo Sousa e Ziegler (1998), não há variação significante entre intervalos de 2 horas durante toda a fase de luz do estudada. Este fato pode estar associado às características de um metabolismo mais complexo ou a um limite pequeno de variação durante esta fase, ou a ambos. Também não foi encontrada diferença de valores entre os períodos de manhã e tarde (SOUSA; ZIEGLER, 1998).

Na literatura inexistem informações básicas sobre a fisiologia reprodutiva do sagüi-de-tufos-preto (*Callithrix penicilatta*). O conhecimento destas características é essencial para a compreensão dos mecanismos reprodutivos desta espécie, assim como para a futura aplicação de técnicas de reprodução assistida, sendo, portanto, imperativo um estudo que esclareça estes aspectos da biologia desta espécie.

3 OBJETIVOS

- Descrever os perfis de metabólitos fecais de esteróides sexuais, progesterona e estrógenos, caracterizando as fases folicular e lútea do ciclo ovariano de *Callithrix penicillata*.
- Mensurar a duração do ciclo ovariano e suas fases em dias e estimar o período peri-ovulatório.
- Analisar a aplicabilidade e confiabilidade da técnica não invasiva aqui empregada no estudo da fisiologia reprodutiva dos sagüis-de-tufos-pretos.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir serão descritos o material e a metodologia empregada no estudo.

4.1 ANIMAIS

Foram estudadas cinco fêmeas adultas de sagüi-de-tufos-pretos *(Callithrix penicillata)* pertencentes ao Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros – Sorocaba – São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais medindo 1m x 0.50m x 1m contendo galhos de árvores e uma rede tipo “ninho” (Figura 2). As gaiolas foram concebidas tendo em sua parte inferior, bandejas removíveis, que permitiam colher as fezes de cada fêmea e obter material livre da contaminação por urina ou restos alimentares.

Durante todo o período do experimento, as fêmeas tiveram apenas contato visual, auditivo e olfativo com seus respectivos parceiros, que eram mantidos, separados na gaiola ao lado. Os animais foram submetidos a condições naturais de temperatura, umidade e luminosidade. O manejo alimentar era coordenado pela Instituição e a alimentação era ofertada em dois momentos, pela manhã quando recebiam uma mistura de ração para primatas da (MegaZoo®,Betim, Minas Gerais, Brasil) misturado com bananas , água , leite de soja e uvas passas e à tarde os animais recebiam frutas da estação. Água era oferecida *ad libitum*.

Figura 2 - Gaiolas individuais medindo 1m x 0.50m x 1m com galhos de árvores e redes do tipo "ninho" utilizadas durante todo o período de estudo para os sagüis-de-tufos-pretos(*Callithrix penicillata*) - Sorocaba - 2008

4.2 COLETAS DE FEZES

As coletas de fezes foram realizadas diariamente, entre os meses de setembro e dezembro de 2008, sempre no período da manhã, entre 8:00-9:00 h. As amostras foram homogeneizadas, identificadas e acondicionadas em criotubos

plásticos (NALGENE® ,Rochester, NY, USA). Após a identificação com o número do animal e a data da colheita, as amostras foram mantidas em freezer à -20°C até serem processadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.3 EXTRAÇÃO FECAL

As extrações dos metabólitos foram realizadas segundo técnica preconizada por Brown et al. (1994), modificada conforme descrito abaixo.

As amostras fecais foram liofilizadas com o auxílio do aparelho evaporador giratório tipo *Speed vac* (*Speed vac* – Sc110, Savant), com o objetivo de remover a água e desta forma impedir as ações enzimáticas e bacterianas sobre os metabólitos fecais dos hormônios estudados e simultaneamente padronizar com maior precisão o peso do material fecal.

Uma alíquota de 0,2 g de fezes secas foram fervidas em 5 ml de etanol absoluto (Ethanol P.A,Merck) 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 (Centrifuga TDL 80-2B, Centribio) por 15 minutos a 500g, o sobrenadante foi recuperado e o *pellet* resultante foi ressuspendido em 5 ml de etanol absoluto, homogeneizado em aparelho de vórtex (PHOENIX, MOD AT 56) e centrifugado. Os dois sobrenadantes foram combinados e secos completamente sob ar comprimido e, então dissolvidos em 1 ml de metanol absoluto.

Para as dosagens de metabólitos de estradiol e progesterona, as amostras foram diluídas 1:100, 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 mensurações por radioimunoensaio.

4.4 VALIDAÇÃO

Realizou-se a validação laboratorial do radioimunoensaio para uso em extrato de fezes em sagüi-tufos-pretos (*C.penicillata*), utilizando-se o método de paralelismo com o uso de matriz íntegra.

Esse teste possibilita verificar se a matriz fecal utilizada esta interferindo na ligação do antígeno-anticorpo. Foi utilizado um “pool” de amostras de alta concentração hormonal com valores próximos ao limite superior da curva-padrão fornecida pelo conjunto diagnóstico comercial. Este “pool” foi então diluído nas mesmas proporções da curva-padrão do conjunto comercial e ambas as curvas obtidas foram comparadas pelo teste de Regressão Linear, com $p < 0,05$, para observar a existência de paralelismo.

4.4.1 Validação Biológica

A validação biológica foi obtida pela caracterização hormonal da existência de ciclicidade ovariana, demonstrada pelos perfis dos metabólitos fecais de progesterona e estrógenos.

4.5 DOSAGEM HORMONAL

As dosagens dos metabólitos hormonais de estrógenos e progesterona foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida com a utilização de conjuntos diagnósticos comerciais (*Coat-a-Count*® Siemens Los Angeles, CA, USA) para dosagem de hormônios séricos em humanos, utilizando o I^{125} como elemento traçador. Os ensaios hormonais foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e as tabelas com as porcentagens de reações cruzadas para cada hormônio, encontram-se nos anexos A e B.

4.5.1 Controles de qualidade

Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina empregada no LDH, ou seja, foram calculados os Coeficientes de Variação (CV) intra-ensaio, utilizando valores altos e baixos, no início e final de cada ensaio. Foi também calculada a porcentagem de ligação B/B0, a sensibilidade e a dose mínima detectada para cada ensaio. Em todos os ensaios realizados foi também mensurado um “pool” de amostras, o que possibilitou o cálculo do CV inter-ensaio.

As concentrações determinadas primariamente por RIE foram expressas em ng/ml para metabólitos de progesterona ou progestinas e em pg/ml para os metabólitos de estrógenos. Para ambos os metabólitos hormonais, os resultados finais foram expressos em ng/g de fezes liofilizadas, sendo realizadas as seguintes conversões:

Para conversão dos valores de progestinas:

$$CF = \frac{C \times Vfe \times D}{Pi}$$

Para a conversão dos valores dos metabólitos de estrógenos:

$$CF = \frac{C \times Vfe \times D}{Pi} / 1000$$

CF = concentração final;

C = concentração fornecida pelo RIE;

Vfe = volume das fezes ao final da etapa de extração;

D = diluição empregada;

Pi = peso inicial

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas analises estatísticas descritivas, com o cálculo de média e desvios - padrão para as concentrações de ambos os metabólitos hormonais nas fases foliculares e lúteas.Também foram calculadas a média e os desvios-padrão para a duração de cada fase, medidas em dias.

As concentrações médias dos metabólitos foram comparadas entre as duas fases, assim como as durações destas medidas em dias. Quando as médias foram paramétricas o teste utilizado foi o Teste T pareado ($p< 0,005$) e quando as médias eram não paramétricas o teste utilizado foi o Teste de Willcoxon ($p< 0,005$).

No caso das gestantes, foi realizada analise estatística descritiva das concentrações dos metabólitos hormonais nos terços médio e final da gestação e comparadas as médias entre os dois terços. Como todos os testes eram não paramétricos o teste utilizado para a analise estatística foi o Kruskal – Wallis ($p<0,005$).

Para as análises das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno entre as três fêmeas gestantes foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com complemento do teste de Dunn.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são descritos os resultados obtidos neste estudo e a discussão dos mesmos.

5.1 VALIDAÇÃO LABORATORIAL

Os valores das curvas obtidas a partir das diluições do hormônio marcado em um “pool” de amostras fecais para os metabolitos de estrógenos e progestinas apresentaram alta e significativa correlação com as curvas padrões dos conjuntos diagnósticos (Gráficos 1 e 2). Os valores de $r=R^2$ foram 0,96 para os metabólitos (p= 0,004) fecais de estrógenos e 0,95 (p=0,0052) para as progestinas fecais.

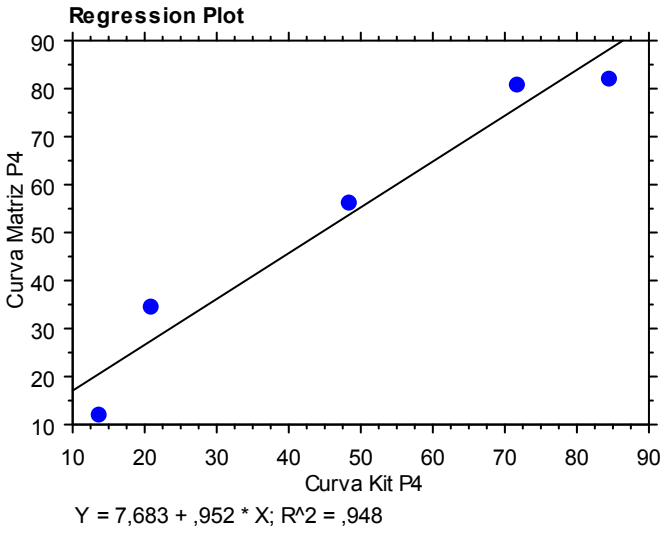

Gráfico 1 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para metabólitos fecais de progestinas

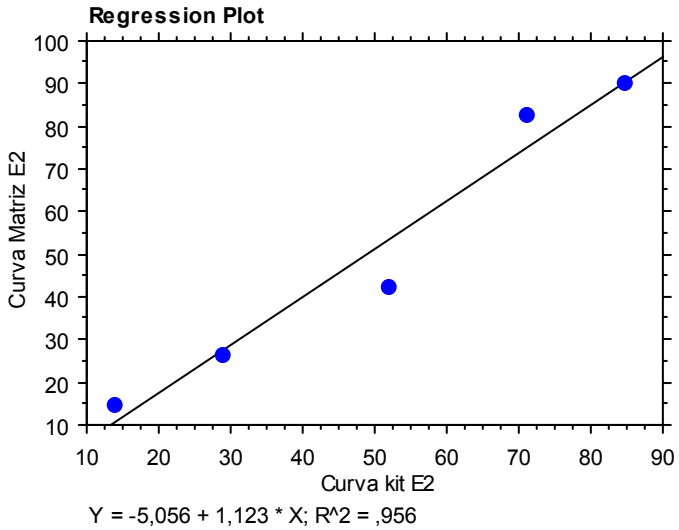

Gráfico 2 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtido para metabólitos fecais de estrógenos

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DO ENSAIO HORMONAL

O controle de qualidade dos ensaios realizados para dosagem de metabólitos fecais de estrógenos e progestinas 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 de metabólitos de progestinas todos os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 8,92 % e o inter-ensaio inferior a 5,56%. A concentração mínima detectada foi de 0,004pg/ml (Tabela 1).

Tabela 1 - Controle de qualidade dos ensaios de metabólitos de progestinas em amostras fecais de fêmeas de Saguis-de-tufos-pretos (Callithrix penicillata) - São Paulo - 2009

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	45391,5	54%	0,36%	96(0,005)	8,92%	3,64%
2	45391,5	54%	0,36%	96(0,005)	7,38%	3,18%

3	43869	54%	0,47%	92(0,004)	1,83%	5,56%
4	42557	54%	0,46%	92(0,004)	5,89%	4,93%
CV Inter ensaio					5,41%	4,27%

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 estrógenos fecais, os coeficientes intra-ensaios foram inferiores a 10% e o inter-ensaio a 2,82%. A concentração mínima detectada foi de 1,69ng/ml (Tabela 2).

Tabela 2 - Controle de qualidade dos ensaios de metabólitos de estrógenos em amostras fecais de fêmeas de Saguis-de-tufos-pretos (Callithrix penicillata) - São Paulo - 2009

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	27208,5	50%	0,40%	92(1,69)	9,98%	8,60%
2	24984	53%	0,39%	90(2,69)	1,61%	0,79%
3	27339	51%	0,89%	90(2,51)	2,76%	3,98%
4	24802	53%	0,43%	91(2,83)	9,56%	9,28%
CV Inter ensaio					0,53%	2,82%

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

5.3 PERFIS HORMONAIS DE METABÓLITOS FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTERONA

No total foram extraídas e dosadas 399 amostras fecais, sendo 96 para F1, 97 para F2, 94 para F3, 57 para F4 e 55 para F5. No decorrer do experimento, duas fêmeas apresentaram ciclicidade ovariana e três fêmeas estavam gestantes, das quais uma evoluiu para um abortamento indo à óbito.

5.3.1 Fêmeas que apresentaram ciclicidade ovariana

No gráfico 3 observa-se para a fêmea F01 a presença de duas fases lúteas, com duração de 27 e 7 dias cada uma e duas fases foliculares, com duração 10 e 8 dias cada.

No gráfico 4 também observa-se a presença de duas fases foliculares para fêmea F04, com duração de 13 e 10 dias cada uma e duas fases lúteas, com duração de 12 e 7 dias cada.

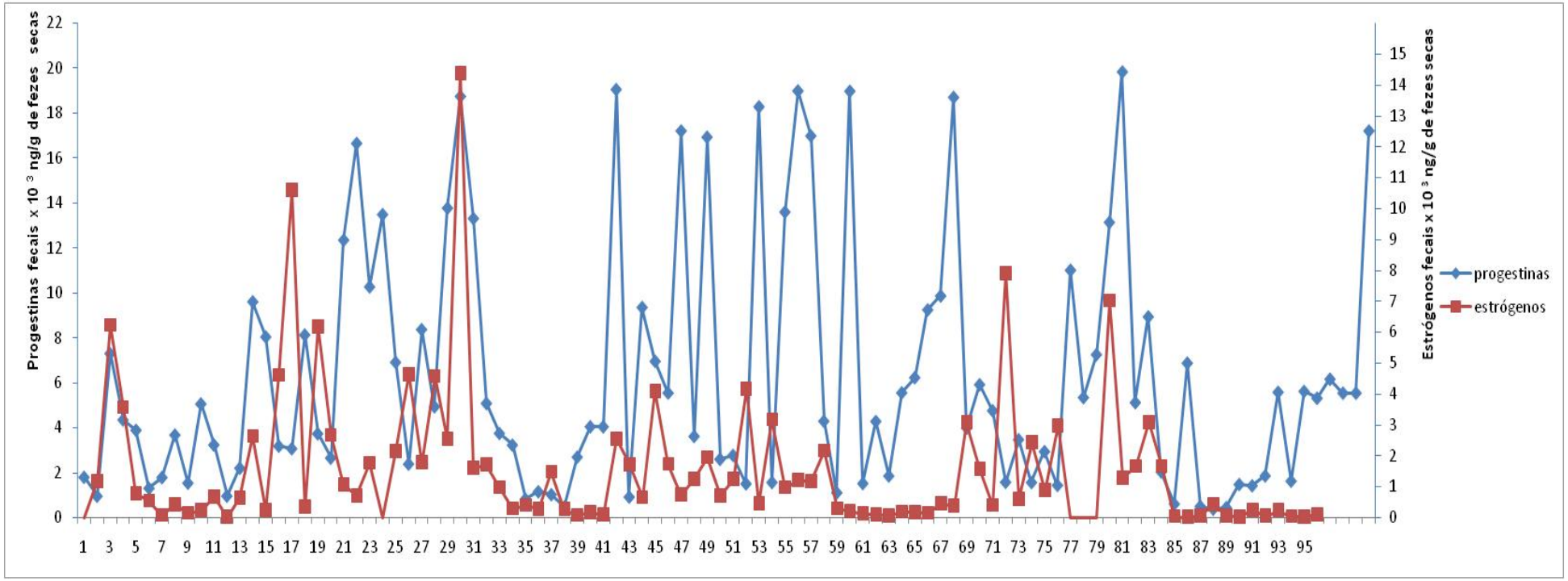

Gráfico 3 – Representação gráfica das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) da fêmea F01 de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentou ciclicidade ovariana durante todo o período de estudo - São Paulo - 2008

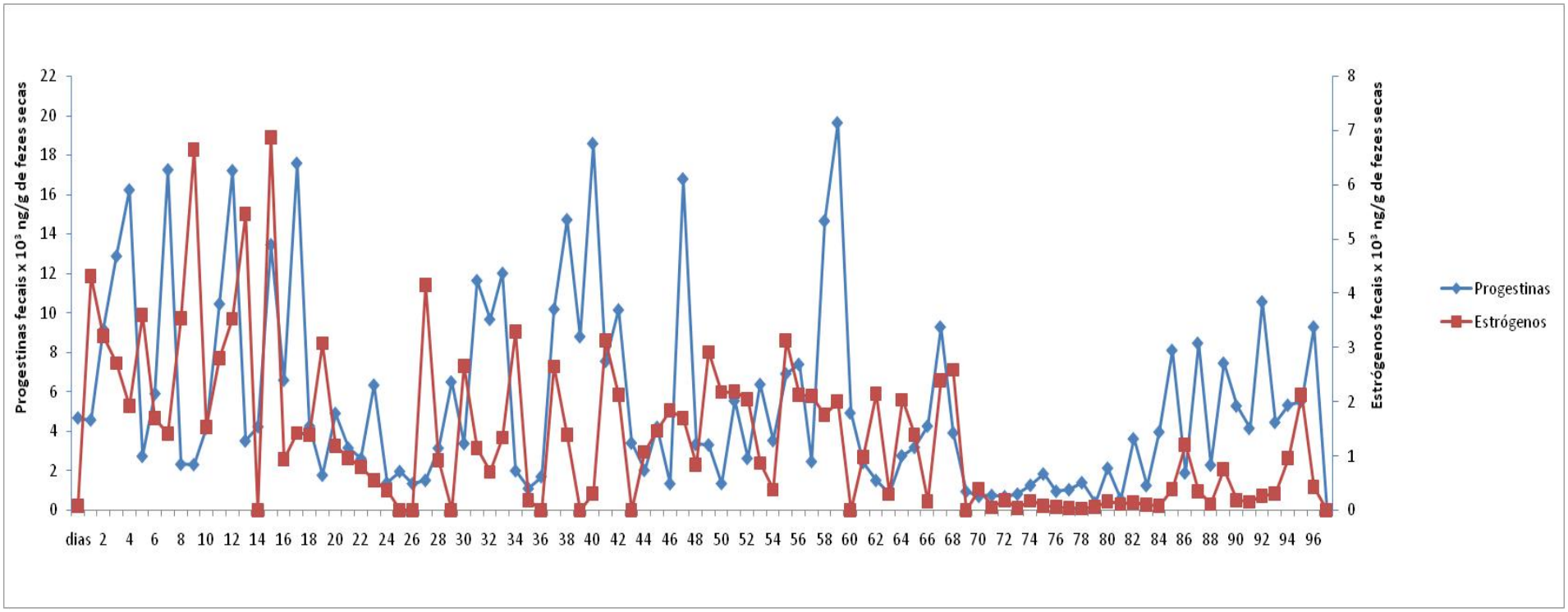

Gráfico 4 – Representação Gráfica das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) da fêmea F02 de sagüi-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentou ciclicidade ovariana durante todo o período de estudo. São Paulo, 2008.

Os resultados obtidos para as médias e desvios-padrões das durações, em dias, das fases foliculares e lúteas das duas fêmeas de saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana, estão expressos no gráfico 5. Dado ao reduzido número amostral, não foi possivel realizar analise estatistica, sendo por esta razão, apenas descritos os resultados.

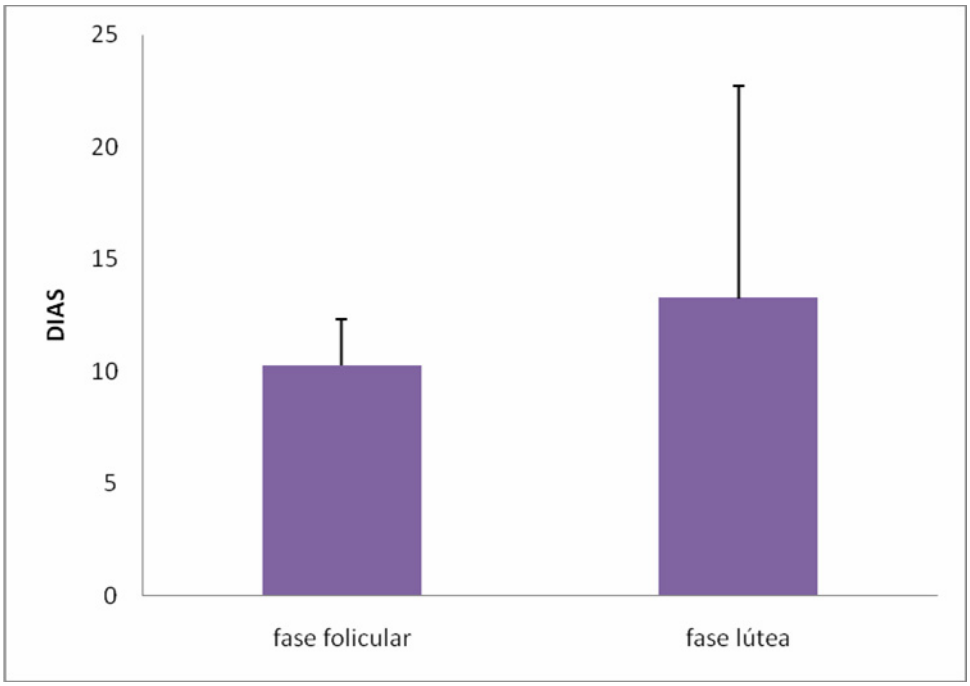

Gráfico 5 – Representação gráfica das médias e desvios-padrões dos dias das fases foliculares e lúteas das duas fêmeas de saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana - São Paulo - 2008

A soma das durações das fases folicular e lútea caracteriza a duração do ciclo ovariano (HEARN, 1983). Logo, os valores encontrados, em ambas as fases, para as fêmeas 1 e 2, nos levam a estimar que a média do ciclo ovariano para a espécie de *Callithrix penicillata* é de 23.5 ± 9,9dias, informações estas que vêm de encontro aos achados de Hearn (1983), que determinou 28.6 ± 10 dias para o ciclo ovariano de *Callithrix jacchus.*

Já o período da fase folicular, com média de 10, 25 ± 7,2 dias e o da fase lútea com 13,25 ± 9,46 dias (Gráfico 5) diferem dos descritos por Hearn (1983),para *C.jacchus*, como sendo períodos de 8.3 ± 0.3 dias e de 19.2 ± 0.6, respectivamente.Há uma diferença, porem os valores estão muito próximos, sendo

assim possível que essa diferença se da em razão da espécie estuda ser diferente dos dados encontrados em literatura para o *C. jacchus*.

Uma certa irregularidade na ciclicidade ovariana é, de certa forma, esperada por conta da condição experimental dos animais. Estudos mostram que animais em fase de adaptação a novas condições ambientais, apresentam irregularidades em seu ciclo ovariano (HARDING et al.,1982), assim como o notado em nossos achados. Apesar dos animais estarem separados, as fêmeas mantiveram entre si contacto visual, olfativo e auditivo, podendo por esta razão ter existido alguma interferência em função de relações de dominância e subordinação, levando não a uma supressão, mas neste caso, a uma alteração da ciclicidade ovariana (ABBOTT, 1984). Ainda segundo os mesmos autores, esta condição pode ser reversível, mas é difícil precisar o tempo que levaria para o completo restabelecimento da função ovariana.

Outros fatores podem estar relacionados a estas irregularidades, como a composição da dieta alimentar, condições de manejo como as instalações, os contactos com o tratador e com o próprio pesquisador. Enfim, o cativeiro cria uma série de condições que podem interferir com as funções fisiológicas em função da adaptação dos indivíduos a estas condições.

No gráfico 6, observa-se as médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de progesterona, em cada fase do ciclo, das fêmeas 1 e 2 que apresentaram ciclicidade ovariana.

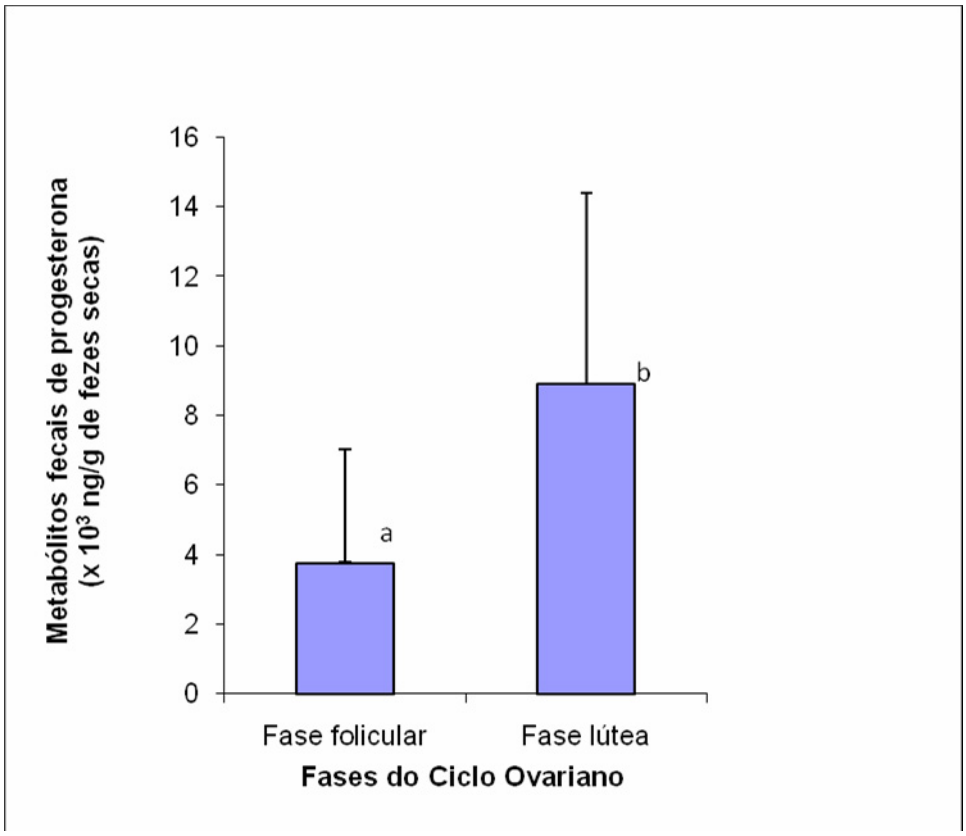

Gráfico 6 - Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de progesterona (ng/g de fezes secas), em cada fase do ciclo, das fêmeas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*), que apresentaram ciclicidade ovariana - São Paulo - 2008.

Os resultados obtidos demonstraram haver uma diferença marcada e significativa (p= 0,0018) entre as concentrações médias de metabólitos de progesterona das fases folicular e lútea. Os valores das médias para a fase folicular e lútea foram de 3761,69 ±3240,5 ng/g e 8910,21 ± 5485,4 ng/g respectivamente. A fase folicular foi caracterizada por valores basais de metabólitos de progesterona e a fase lútea, por valores elevados, concordando com as informações descritas na literatura para outras espécies de Callithrichideos (HARDING et al., 1982; HEARN, 1983; GILCHRIST et al., 2001) e caracterizando fisiológicamente as duas fases. Também foi observada a ocorrência destes aumentos de progestinas de forma cíclica, caracterizando a presença de ciclos ovarianos com ovulações. Desta forma, os resultados possibilitam afirmar que os ensaios realizados para mensurar as progestinas fecais foram validados biológicamente.

Os valores encontrados para os metabólitos fecais de estradiol estão demonstrados nos gráficos 7 e 8 e vêm de encontro aos dados de literatura. No gráfico 7 observa-se as médias diárias das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) onde o dia 0 foi considerado como o dia estimado da ovulação assim os valores que se encontram antes do dia 0 (-27 a 0) são referentes a fase folicular e os que se encontram após o dia 0 (1 a 27) são referentes a fase lútea. De acordo com Harlow (1984) o período peri-ovulatorio ocorre aproximadamente 24 horas antes do dia estimado da ovulação. Assim no gráfico o período peri-ovulatorio estimado é o dia -1.

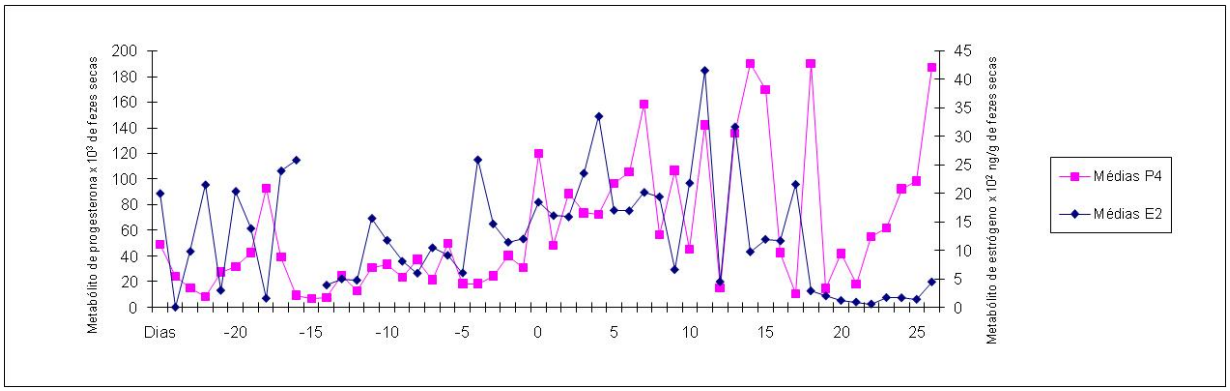

Gráfico 7- Representação gráfica das medias diárias das concentrações de metabólitos fecais de progesterona e estrógeno (ng/g de fezes secas) das fêmeas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana, considerando o dia 0 como o dia estimado da ovulação - São Paulo - 2008.

No gráfico 8 observa-se as médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de estrógeno. As médias para a fase folicular e lútea foram de 1153,74 ± 935,17 ng/g e 1619,23 ±1010,4 ng/g respectivamente. Não houve diferença significativa entre as duas fases (p=0,1177).

Para Heisterman et al. (1993), estudando *C. jacchus*, um pico de estradiol ocorre antes da ovulação e os valores continuam oscilando em níveis mais altos, após ela ter ocorrido. Segundo Ziegler et al. (1996) mesmo considerando o atraso de excreção de esteróides fecais, estrógenos fecais não demonstraram um aumento de concentração durante a fase folicular do ciclo ovulatorio dos *C.jacchus*, estando de acordo com outros achados de primatas do novo mundo. Os valores mais baixos de concentração dos metabolitos de estradiol estão de acordo com Ziegler et al. (1989) onde ele relata que estrógenos circulantes nos Callithrichideos aparentam ser preferencialmente excretados na urina em vez das fezes.

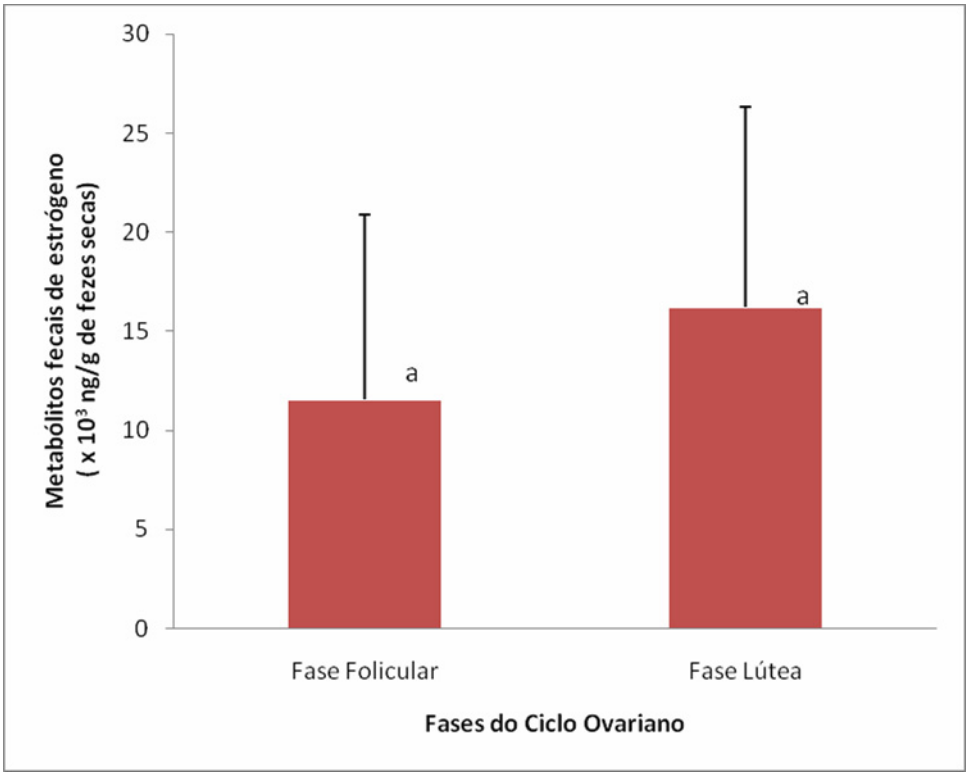

Gráfico 8 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de estrógeno (ng/g de fezes secas) das fêmeas de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) que apresentaram ciclicidade ovariana - São Paulo - 2008

5.3.2 Fêmeas Gestantes

Durante o período de estudado, três fêmeas se mostraram suspeitas de estar gestantes, sendo que duas, as de número 4 e 5, o confirmaram parindo filhotes. No caso da terceira, a número 3, existiu a suspeita de ter ocorrido abortamento. Como a fêmea 3 apresentou valores de metabólitos fecais de estrógenos e progesterona muito baixos durante o período do estudo, diferindo significativamente do perfil apresentado pelas demais fêmeas gestantes, optou-se por apresentar e discutir seus resultados em separado.

No gráfico 9 estão descritos os resultados obtidos da mensuração dos metabólitos fecais de progesterona das fêmeas 4 e 5, gestantes que pariram durante o experimento, durante os terços médio e final da gestação. Observa-se que houve

diferença significativa entre as concentrações médias nas duas fases da gestação (p=0,0287), sendo maiores as do terço médio. A média to terço medio foi de 4527,19 ± 3667,8 ng/g enquanto a media do terço final foi de 2974 ± 2471,9. Os perfis encontrados para as concentrações de metabólitos fecais de progesterona vêm de encontro aos dados de literatura para o *C.jacchus*, onde é descrito que o terço médio da gestação apresenta concentrações maiores de progesterona do que o terço final, havendo marcada queda nas últimas semanas que antecedem o parto (HEARN, 1978).

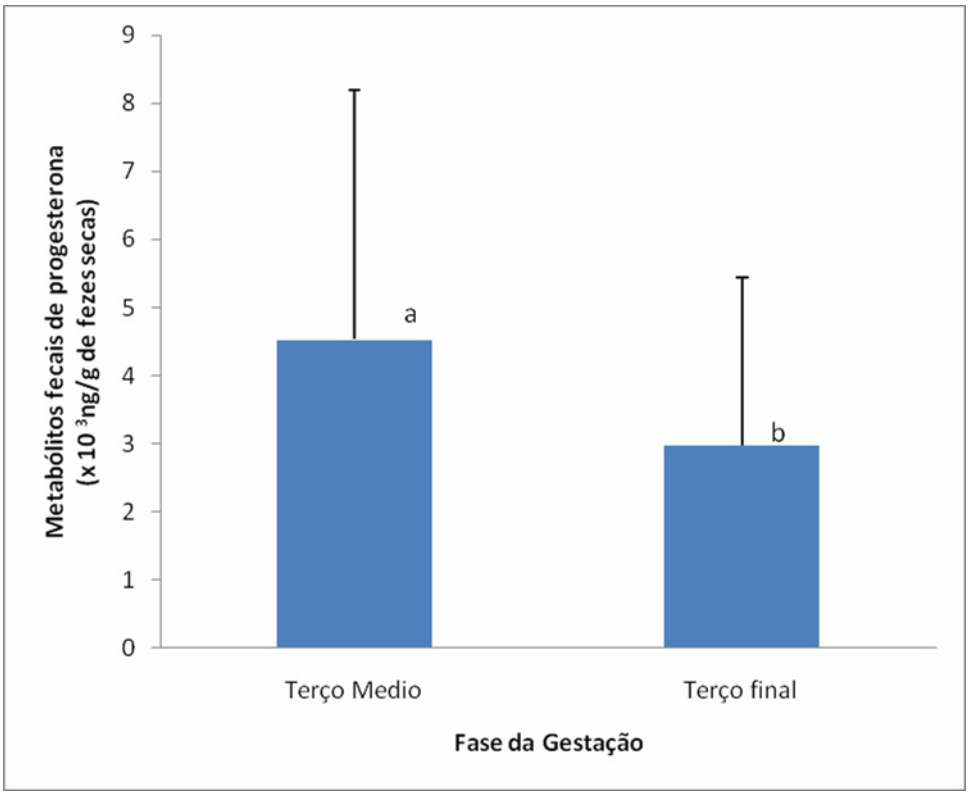

Gráfico 9 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de progesterona (ng/g de fezes secas) das duas fêmeas gestantes de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*), nos terços médio e final da gestação - São Paulo - 2008

O gráfico 10 apresenta as médias e desvios-padrão das concentrações obtidas de metabólitos fecais de estrógenos, nos terços médio e final da gestação. As medias para o terço medio e terço final foram respectivamente de 1401,41 ±1034,4 e 1546,67 ±1227,2 ng/g. Os resultados encontrados apresentaram diferença não significativa entre as concentrações das duas fases da gestação (P=0,3475).

Segundo Hearn (1983), a concentração máxima de estrógeno ocorre nas ultimas semanas da gestação e esta declina para níveis não detectáveis no dia seguinte após o parto para o *C.jacchus*. Assim, a esperada maior concentração de metabólitos de estrógenos que era esperada para o terço final, não foi encontrada em nossos resultados. Uma das razões para essa diferença pode estar associada ao reduzido número de gestações estudadas, apenas duas. Outra possível causa dessa diferença poderá estar no fato que os dados de literatura são todos referentes ao *C.Jacchus*, que apesar de pertencer ao mesmo gênero, é uma espécie diferente, podendo por esta razão, apresentar algumas diferenças fisiológicas com *C.penicilatta*.

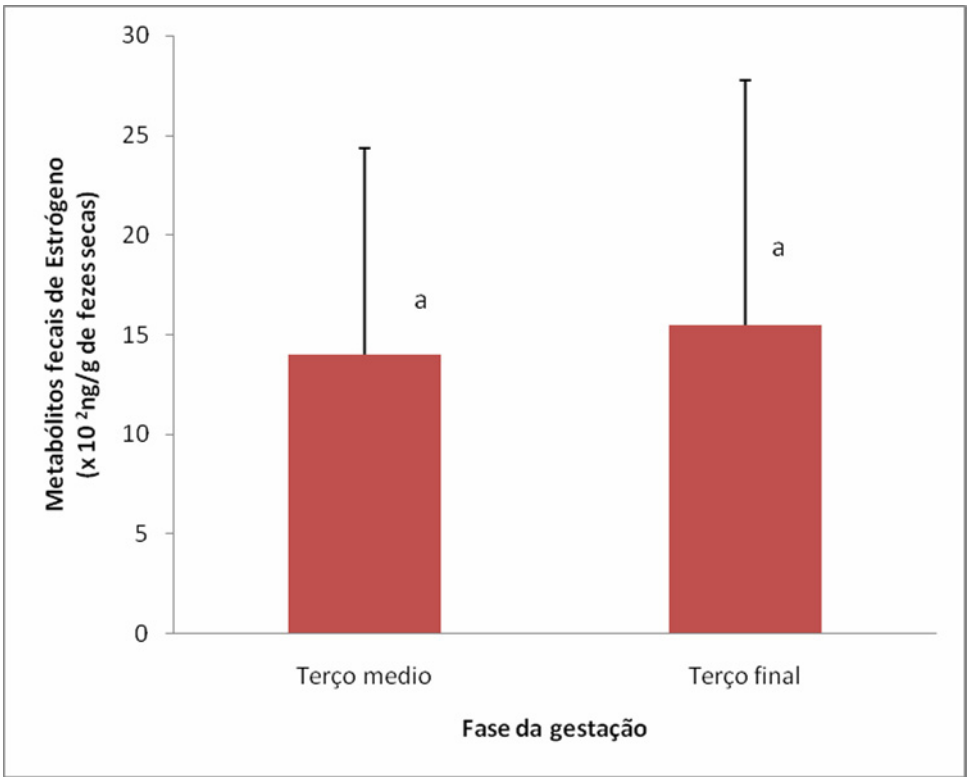

Gráfico 10 - Representação gráfica das médias e desvios-padrões das concentrações de metabólitos fecais de estrógeno (ng/g de fezes secas) de duas fêmeas gestante de sagüis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*), nos terços médio e final da gestação - São Paulo - 2009

5.3.2.1 Fêmea gestante suspeita de ter sofrido abortamento

A fêmea 3 apresentou um histórico de suspeita (não confirmada) de gestação. Esta fêmea possuia pronunciado aumento abdominal e 61 dias após o inicio do estudo ela amanheceu apática e com marcada diminuição do volume abdominal.Foi constatada a presença de restos orgânicos cinzentos no fundo da gaiola sugerindo uma possivel expulsão de feto e anexos, que teriam sido quase totalmente devorados pela mãe. Este animal veio à óbito 20 dias após o término do estudo. Infelizmente, não foi possivel verificar a causa do obito.

Na tabela 3 estão tabuladas as médias e desvios-padrão das concentrações dos metabolitos fecais de progesterona e estrógeno das duas fêmeas gestantes, números 4 e 5 e da fêmea suspeita de ter sofrido abortamento, a número 3. Para compor esta tabela foram utilizados todos os valôres obtidos até o dia do parto (fêmeas 4 e 5) ou até o dia da observação da acentuada redução de volume abdominal (fêmea 3). Observa-se que para fêmea 3 as concentrações de ambos os metabóltios fecais é inferior ao das duas outras fêmeas que levaram suas gestações a termo. A analise comparativa das concentrações das médias dos metabólitos fecais de progesterona demonstrou-se ser altamente significativas ($p < 0,0001$) as diferenças encontradas entre as fêmeas que levaram a gestação a termo e a fêmea que sofreu abortamento.

Tabela 3 - Média de concentração dos metabolitos fecais de progesterona e estrógeno das fêmeas gestantes de saguis-de-tufos-pretos (*C.penicillata*), até o momento do parto (fêmeas 4 e 5), ou até o momento do presumido abortamento (fêmea 3) - São Paulo - 2008

Animal	Met. de Progesterona	Met. de Estrógeno
F05	3914,86± 3441,8 ng/g[a]	1850,20± 1181,6 ng/g[a]
F04	3396,20± 3095,6 ng/g[a]	1123,39± 1033,1 ng/g[a,b]
F03	1466,30± 746,14 ng/g[b]	742,20± 784,34[b]

Considerando a data em que foi observada a redução de volume abdominal, como sendo o dia do presumido abortamento, foram confeccionados gráficos dos valôres obtidos de ambos os metabólitos hormonais para o período anterior e posterior a esta data e comparadas as médias das concentrações encontradas (Gráficos 11 e 12). A média e desvio-padrão das concentrações de metabolitos fecais de progeterona antes do suposto abortamento foi de 1466,22 ± 784,36ng/g e para o período posterior ao suposto evento foi 813 ±616,54 ng/g. Para as médias e desvios-padrão das concentrações de metabólitos fecais de estrógenos, os resultados obtidos foram de 745,65 ± 747,39 ng/g antes e 212,42 ± 331,84 ng/g depois do suposto evento. Observa-se pelos gráficos 11 e 12 que as concentrações médias de ambos os metabólitos hormonais sofrem marcada e significativa(p<0,0001) redução após a data do suposto abortamento.

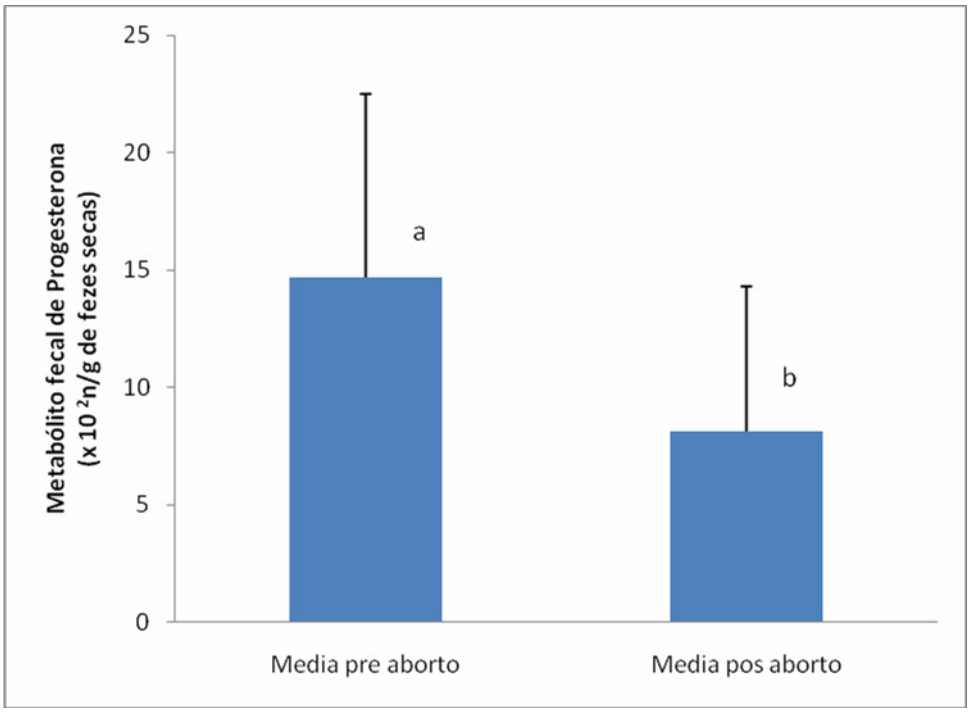

Grafico 11- Representação gráfica das médias e desvios-padrões de metabólitos fecais de progesterona antes e depois do presumido abortamento da fêmea 3 de sagui-de-tufos- pretos (*C. penicillata*) - São Paulo - 2008

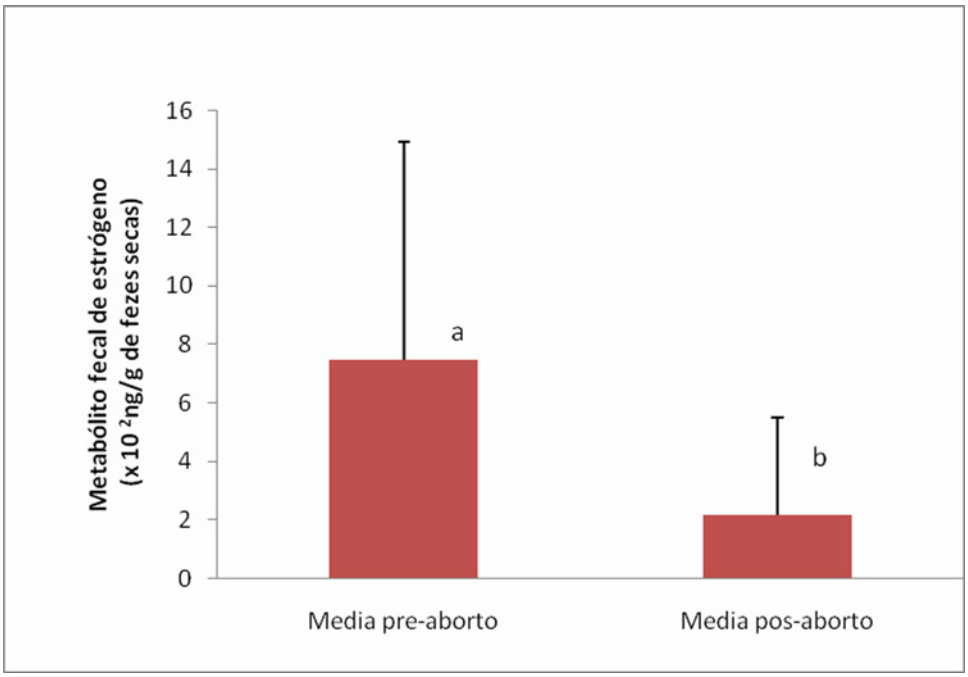

Gráfico 12 - Representação gráfica das medias de metabólitos fecais de estrógeno antes e depois do presumido abortamento da fêmea 3 de sagui-de-tufos- pretos (*C. penicillata*) - São Paulo - 2008

Embora os valores das concentrações de metabólitos fecais de progesterona estivessem proximos dos valores encontrados para a fase folicular das fêmeas que apresentaram ciclicidade ovariana, o perfil dos níveis de metabólitos sugeriram a existência de um estado gestacional na fêmea 3, que não foi a termo, confirmando a suspeita de ter ocorrido um abortamento. A partir da data presumida deste fato, esta fêmea não apresentou perfis de metabólitos hormonais que sugerissem a presença de ciclicidade ovariana pelo restante do periodo estudado (Gráfico 13).

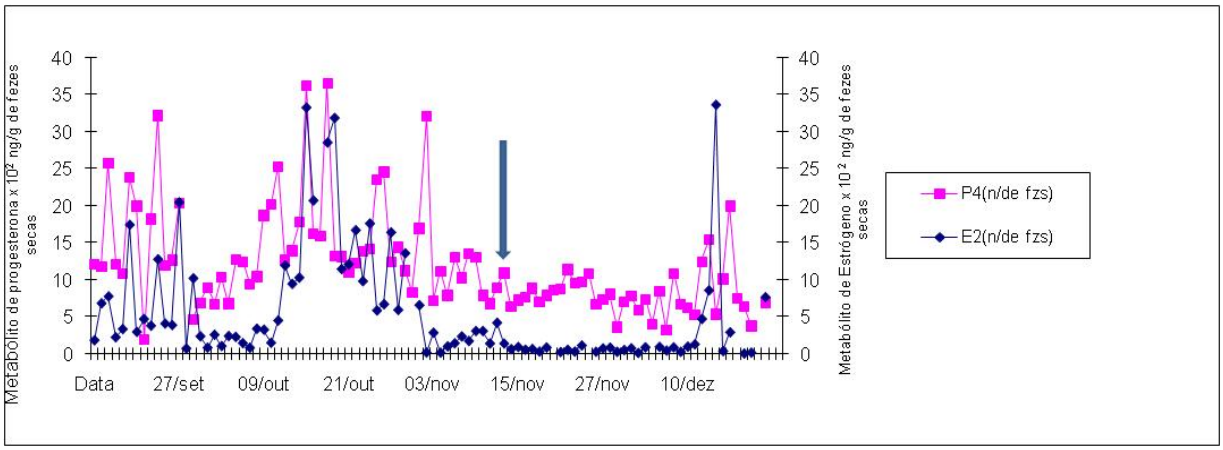

Gráfico 13 - Representação gráfica das concentrações dos metabólitos fecais de progesterona e estrógenos da fêmea 3 de sagui-de-tufos- pretos (*C. penicillata*) com suspeita de ter abortado - São Paulo - 2008. **Seta indicando data de possivel aborto**

Analisando o gráfico 13, nota-se que aproximadamente 12 dias (do dia 3/11 ao dia 15/11) antes da data presumida do abortamento, a fêmea 3 apresentou uma marcada redução das concentrações de ambos os metabólitos fecais, sinalizando já a esta altura, algum problema na manutenção da gestação estava ocorrendo.

Como a progesterona é o principal hormonio responsável pela manutenção da gestação, uma das possiveis causas pela qual essa gestação não foi a termo, poderia ter sido a insuficiencia de produção de progesterona, uma vez que os valores foram significamente inferiores aos encontrados nas outras duas fêmeas gestantes.Por estes valores serem acentuadamente inferiores aos das outras gestantes, uma hipotese tambem seria de que em algum momento da gestação houve morte fetal, com conseqüente luteólise e queda dos niveis de progesterona, levando à expulsão do produto. Pode-se especular apenas, que o óbito da fêmea 3 teria sido decorrente de um quadro toxêmico ou de outras complicações pós abortamento.

Comentários Finais

Existe na literatura uma marcada carência de informações sobre a fisiologia reprodutiva do *Callithrix penicillata*. Este fato limita as possibilidades de melhorias no manejo reprodutivo,assim como na futura aplicação de técnicas de reprodução assistida comom ferramentas para a conservação da espécie.

Pelo número reduzido de fêmeas e conseqüente reduzido número de ciclos ovarianos e gestações estudados, alguns resultados aqui obtidos careceram de significânacia estatística. Apesar disto, foram gerados dados relevantes, significativos e inéditos que marcam o início do conhecimento da endocrinologia reprodutiva da *C. penicilatta.*

Assim mais experimentos são necessarios para avançar nesta investigação, analisando um maior número de ciclos ovarianos e gestações nesta especie.

6 CONCLUSÕES

- Foi possÍvel descrever os perfis de metabólitos fecais de esteróides sexuais de progesterona e estrógeno, caracterizando as fases folicular e lútea do ciclo ovariano do *C.penicillata.*
- Os resultados possibilitaram a mensuração da duração do ciclo ovariano e suas respectivas fases folicular e lútea, assim como estimar o período peri-ovulatório.
- Embora não fosse objetivo desse trabalho, a metodologia empregada possibilitou o estudo de três gestações.
- A técnica não invasiva utlizada mostrou-se eficiente e adequada para o estudo da ciclicidade ovariana e gestação nessa espécie.

REFERÊNCIAS

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. Behaviorally mediated suppression of reproduction in female primates. **Journal of Zoology**, v. 231, p. 455-470, 1987.

ABBOTT, D. H.; BARRETT, J.; GEORGE, L. M. Comparative aspects of the social suppression of reproduction in female marmosets and tamarins. In: RYLANDS, A. B. et al. **Marmosets and tamarins**: systematics, behaviour, and ecology. Oxford: Oxford Science Publications, 1993. p. 152-163.

ABBOTT, D. H.; SALTZMAN, W.; SHULTZ-DARKEN, N. J.; TANNENBAUM, P. L. Adaptions to subordinate status in female marmoset monkeys. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 261-274, 1998.

ABBOTT, D. H.; BARNET, D. K.; COLMAN, R. J.; YAMAMOTO, M. E.; SCHULTZ-DARKEN, N. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 339-350, 2003.

ACHENBACH, G. G.; SNOWDON, C. T. Costs of care giving: Weight loss in captive adult male cotton-top tamarins (*Saguinus Oedipus*) following the birth of infants. **International Journal of Primatology**, v. 23, p. 179-189, 2002.

ADLERCRUETZ, H.; MARTIN, F.; PULKKINE, M.; DENCKER, H.; RIMER, U.; SJOBERG, N. O.; TIKKANEN, M. J. Intestinal metabolism of estrogens. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v. 43, p. 497-505, 1976.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil.** São Paulo: Livraria Triângulo 1995. 168 p.

BARRET, J.; ABBOTT, D. H.; GEORGE, L. M. Extension of reproductive suppression by pheromonal cues in subordinate female marmoset monkeys, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 411-418, 1990.

CAINE, N. G. Flexibility and co-operation as unifying themes in *Saguinus* social organization and behaviour: The role of predation pressures. In: RYLANDS, A. B. **Marmosets and tamarins:** systematics, behaviour, and ecology. Oxford: Oxford Science Publications, 1993. p. 200-219.

CAROLIS,M,;HEISTERMANN,M.;VISALBERGHI,E.Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progestin levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys. **Hormones and Behavior** , v. 36 , p. 252-265, 1999.

CARROLL, J. B. Social correlates of reproductive suppression in captive callitrichid family groups. **The Dodo: Journal of the Jersey Wildlife Preservation Trust,** v. 23, p. 80-85, 1986.

CARROLL, J. B.; ABBOTT, D. H.; GEORGE, L. M.; HINDLE, J. E.; MARTIN, R. D. Urinary endocrine monitoring of the ovarian cycle and pregnancy in Goeldi's monkey *(Callimico goeldii).* **Journal of Reproduction and Fertility***,* v. 89, p. 149-161, 1990.

CARROLL, J. B. The stability of multi-female breeding groups of Goeldi's monkey, Callimico goeldii, at Jersey Wildlife Preservation Trust. **The Dodo: Journal of the Jersey Wildlife Preservation Trust,** v. 25, p. 37-43, 1992.

CHALLIS, J. R. G.; DAVUS, I. J.; BENIRSCHKE, K.; HENDRICKX, A. G.; RYAN, K. J. The effect of dexamethasone on the peripheral plasma concentrations of androstenedione, testosterone and Cortisol in the pregnant rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 96, p. 185-192, 1975.

CHAMBERS, P. L.; HEARN, J. P. Peripheral plasma levels of progesterone, oestradiol-17~ oestrone, testosterone, androstenedione and chorionic gonadotrophin during pregnancy in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus.* **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 23-32, 1979.

COUTINHO, P. E. G.; CORREA, H. K. M. Polygyny in a free-ranging group of buffy-tufted-ear marmosets, *Callithrix aurita*. **Folia Primatologica**, v. 65, p. 25-29, 1995.

CREEL, S.; WASER, P. M. Variation in reproductive suppression among dwarf mongooses: Interplay between mechanisms and evolution. In: SOLOMON, N. G.; FRENCH, J. A. **Cooperative breeding in mammals**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 150-170.

CZEKALA ,N.M.; HODGES, J.K.; LASLEY, B.L. Pregnancy monitoring in diverse primate species by estrogen and bioactive luteinizing hormone determinations in small volumes of urine. **Journal of Primatology**, v.10, p.1-15, 1981.

DAVIES, I. J.; RYAN, K. J. Comparative endocrinology of gestation. **Vitamins and Hormones,** v. 30, p. 223-277, 1972.

DIETZ, J. M.; BAKER, A. J. Polygyny and female reproductive success in golden lion tamarins, *Leontopithecus rosalia*. **Animal Behaviour**, v. 46, p. 1067-1078, 1993.

DIXSON, A. F.; LUNN, S. F. Post-partum changes in hormones and sexual behavior in captive groups of marmosets (*Callithrix jacchus*). **Physiology and Behaviour,** v. 41, p. 577-583, 1987.

DIXSON, A. F. Callithricid mating systems: laboratory and field approaches to studies of monogamy and polyandry. In: RYLANDS, A. B. **Marmosets and tamarins:** systematics, behaviour, and ecology. Oxford: Oxford University Press, 1993. p. 164-175.

EISENBERG, J. F. Comparative ecology and reproduction of New World monkeys. In: KLEIMAN, D. G. **The biology and conservation of Callitrichidae.** Washington, D.C.: Smithsonian Institute Press, 1961. p.13-22.

EISENBERG, J. F. Comparative ecology and reproduction of New World monkeys. In: KLEIMAN, D. G. **The Biology and conservation of Callitrichidae.** Washington, D.C.: Smithsonian Institute Press,1977. p. 39-71.

EPPLE, G. The behavior of marmoset monkeys (callitrichidae). In: ROSENBLUM, L. A. **Primate behavior**. 4 ed. New Work: Academic Press, 1975. p. 195-239.

EVANS, S.; HODGES, J. K. Reproductive status of adult daughters in family groups of common marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*).**Folia Primatologica,** v. 42, p. 127-134, 1984.

FARIA, D. S. **Grupo em Callithrix penicillata, o mico-estrela do Planalto Central Brasileiro**: estudo realizado na floresta de galeria do córrego Capetinga, Brasília. 1989. 2 v. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 1989.

FEDIGAN, L. M. **Primate paradigms**: sex roles and social bonds. Chicago: University of Chicago Press, 1992. 386 p.

FORD, S. M. Callitrichids as phyletic dwarfs, and the place of the Callitrichidae in Playtyrrhini. **Primates ,** v. 21, n.1, p. 31-43, 1980.

FRENCH, J. A.; ABBOTT, D. H.; SNOWDON, C. T. The effect of social environment on estrogen excretion, scent marking, and sociosexual behavior in tamarins (*Saguinus oedipus*). **American Journal of Primatology**, v. 6, p. 155-167, 1984.

FRENCH, J. A.; INGLETT, B. J. Female-female aggression and male indifference in response to unfamiliar intruders in lion tamarins. **Animal Behaviour***,* v. 37, p. 487-497, 1989.

FRENCH, J. A.; INGLETT, B. J.; DETHLEFS, T. M. The reproductive status of nonbreeding group members in captive golden lion tamarin social groups. **American Journal of Primatology**, v. 18, p. 73-86, 1989.

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. 231-245, 1996.

FRENCH, J. A.; DE VLEESCHOUWER, K.; BALES, K.; HEISTERMANN, M. Lion tamarin reproductive biology. In: KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Lion Tamarins**: biology and conservation. Washington: Smithsonian Institution Press, 2002. p.133-156.

GARBER, P. A.; ENCARNACION , F.; MOYA, L.; PRUETZ , J. D. Demographic and reproductive patterns in moustached tamarin monkeys (*Saguinus mystax*): Implications for reconstructing Platyrrhine mating systems. **American Journal of Primatology**, v. 29, p. 235-254, 1993.

GARBER, P. A.; LEIGH,S. R. Ontogenetic variation in small-bodied New World primates: Implication for patterns of reproduction and infant care. **Folia Primatology,** v. 68, p. 1-22, 1997.

GARBER, P.A. One for all and breeding for one: cooperation and competition as a tamarin reproductive strategy. **Evolution Anthropology**, v. 6, p 187-199, 1997.

GILCHRIST, R. B.; WICHEREK, M.;HEISTERMANN, M.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset. **Biology of Reproduction***,* v. 64, p. 127-135, 2001.

GOLDIZEN, A. W. Tamarin and marmoset mating systems: unusual flexibility. trends. **Ecology and Evolution**, v 3, p 36-40, 1988.

GOLDIZEN, A. W. A comparative perspective on the evolution of tamarin and marmoset social systems. **International Journal of Primatology,** v. 11, p. 63-83, 1990.

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

HARDGING, R. D.; HOLMES ,M. J.; LUNN, S. F.;HENDERSON, C.; AITKEN, R. J**.** Plasma progesterone levels throughout the ovarian cycle of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Medicine Primatology**, v. 11, p. 43-51, 1982.

HARLOS , C.R.; HEARN, J.P.; HODGES, J.K. Ovulation in the marmoset monkey : endocrinology,prediction and detection. **Journal of Endocrinology**, v. 103,p 17-24, 1984

HEARN, J. P.; LUNN, S. F. The reproductive biology of the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. **Laboratory Animal Handbook**, v. 6, p. 191-202, 1975.

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 Institute,1978. p. 163-171.

HEARN, J. P. The Common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: HEARN, J. P. **Reproduction in New world primates**. Lancaster: MTP Press, 1983. p. 181-215.

HEISTERMANN, M.; KLEISS, E.; PROVE, E.;WOLTERS, H. J. Fertility status, dominance, and scent marking behavior of family-housed female cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) in absence of their mothers. **American Journal of Primatology**, v. 18, p. 177-189, 1989.

HEISTERMANN, S.; 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.

HODGES, J.K.; BRAND, H.M.;HENDERSON, C.; KELLY, R.W.Levels of circulating and urinary oestrogens during pregnancy in the marmoset monkey, Callithrix jacchus. **Journal of Reproduction and Fertilty**,v 67,p 73-82, 1983.

HUBRECHT, R. C. Field observations on group size and composition of the common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*) , at Tapacura, Brazil. **Primates,** v. 25, p. 13-21, 1984.

JURKE, M. H.; PRYCE, C. R. Parental and infant behaviour during early periods of infant care in Goeldi's monkey *(Callimico goeldii).* **Animal Behaviour**, v. 48, p. 1095-1112, 1994.

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.

KENDRICK, K. M.; DIXSON, A. F. The effect of the Ovarian Cycle on the sexual behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Physiology and Behaviour**, v. 30, p. 735-742, 1983.

KINZEY, W. G. Synopsis of New World primates (16 genera). In: KINZEY, W. G. **New World primates**: ecology , evolution and behavior. New York: Aldine de Gruyler, 1997. p. 169-324.

KLEIMAN, D. G. Monogamy in mammals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 52, p. 36-69, 1977.

KLEIMAN, D. G.; HOAOE, R. J.; GREEN, K. M. The lion tamarins, genus *Leontopithecus.* In: MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA FILHO, A.; FONSECA , G. A. B. **Ecology and behavior of Neotropical primates.** Washington: World Wildlife Fund, 1988. p. 299-347.

KLEIMAN, D. G.; MALCOM, J. R. The evolution of male parental investment. In: GUBERNICK, D. J.; KLOPFER, P.H. **Parental care in mammals**. New York: Plenum, 1981. p. 347-387.

LASLEY, B. L. Methods for evaluating reproductive function in exotic species. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 30, p. 209-228, 1985.

LAZARO-PEREA, C.; SNOWDON, C. T.; ARRUDA, M. F. Scent marking behavior in wild groups of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Behaviour Ecology and Sociobiology***,* v. 46, p. 313-324, 1999.

LOTTKER, P.;HUCK, M.; HEYMANN, E. W.; HEISTERMANN, M. Endocrine correlates of reproductive status in breeding and nonbreeding wild female moustached tamarins. **International Journal of Primatology**, v. 24, n. 4, p. 919-937, 2004.

LUNN, S. F.; MCNEILLY, A. S. Failure of lactation to have consistent effect on interbirth interval in common marmoset *(Callithrix jacchus*) **. Folia Primatologica**, v. 37, p. 99-105, 1982.

MCARTHUR ,J.W.; BEITINS, I.Z.; GORMAN, A.; COLLINS, D.C.; PREEDY, J.R.K.; GRAHAM, C.E. The interrelationships between sex skin swelling and the urinary excretion of gonadotropins, estrone and pregnanediol by the cycling female chimpanzee. **American Journal of Primatology,** v.1, p.265-276, 1981.

MARTIN, R. D. Goeldi and the Dwarfs: the evolutionary biology of the small New World monkeys. **Journal of Human Evolution**, v. 22, p. 367-393,1992.

MENDES PONTES, A. R.; MONTEIRO DA CRUZ, M. A. O. Home range, intergroup transfers, and reproductive status of common marmosets *Callithrix jacchus* in a forest fragment in Northeastern Brazil. **Primates**, v. 36, p. 335-347, 1995.

MITTERMEIR, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F. Distribution and conservation of New World primates used in biomedical research. In: HEARN, J. P. (Ed.). **Reproduction in new world primates.** Lancaster: MTP Press, 1983. p. 3-37.

MOORMAN, E. A.; MENDOZA, S. P.; SHIDELER, S. E. ; LASLEY, B. L. Excretion and Measurement of Estradiol and Progesterone Metabolites in the Feces and Urine of Female Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). **American Journal of Primatology**, v. 57, p. 79-90, 2002.

MORREL, J. M.; NOWSHARL, M.; ROSENBUSCH, J.; NAYUDU, P.L.; HODGES, J.K. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. **American Journal of Primatology**, v. 41, p. 37-43, 1997.

NEYMAN, P. F. Aspects of the ecology and social organization of the free-ranging cotton-top-tamarins *Saguinus Oedipus* and the conservation status of the species. In: KLEIMAN, D. G. **The biology and conservation of Callitrichidae.** Washington, D.C.: Smithsonian Institute Press, 1977. p. 39-71.

NIEVERGELT, C. M.; DIGBY, L. J.; RAMIAKRISHNAN, U.; WOODRUFF, D. S. Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (Callithrix jacchus) population. **International Journal of Primatology**, v. 21, p. 1-20, 2002.

NIEVERGELT, C.; PRYCE, C. R. Monitoring and controlling reproduction in captive common marmosets on the basis of urinary oestrogen metabolites. **Laboratory Animals**, v. 30, p.162-170, 1996.

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, p. 259-264, 1988.

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

PAYMAN , B. C.; SWANSON, H. H. Social influence on sexual maturation and breeding in the female Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Animal Behaviour,** v. 28, p. 528-535, 1980.

PHILLIPS, I. R. The embryology of the common marmoset *Callithrix jacchus*. **Advanced Anatomy and Embryology and Cell Biology**, v. 52, p. 1-47, 1976.

PRICE, E. C.; MCGREW, W. C. Departures from monogamy in colonies of captive cotton-top tamarins. **Folia Primatologica**, v. 57, p. 16-27, 1991.

RADO, A.; CRYSLTE, C. D.; TOWNSLEY, J. D. Concentration of estrogens in maternal peripheral plasma in late pregnancy during labor and post partum. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 30, p. 497-503, 1970.

REYES, F. I.J. J. D.; WINTER, C.; FAIMAN; HOBSON, W. C. ; W. C. Serial serum levels of gonadotrophins, prolactin and sex steroids in the nonpregnant and pregnant chimpanzee. **Journal of Endocrinology**, v.96 p.1447–1455, 1975.

RISLER, L.; WASSER, S. K.; SACKETT, G. P. Measurement of excreted steroids in *Macaca nemestrina*. **American Journal of Primatology**, v. 12, p. 91-100, 1987.

RODA, S. A.; RODA, S. Infanticide in a natural group of Callithrix jacchus (Callithrichidae-Primates). **International Journal of Primatology**, v. 8, p. 497, 1987.

ROSS, C. N.; FRENCH, J. A.; ORTI, G. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets*(Callithrix kuhlii*). ***Proceedings of the National Academy of Sciences**,* v. 104, n. 15, p. 6278-6282, 2006***.***

ROTHE, H. Some aspects of sexuality and reproduction in groups of captive marmosets (*Callithrix jacchus*). **Zeitschrift Fuer Tierpsychologie**,v. 37, p. 255-273, 1975.

ROTHE, H.; KOENIG, A. Variability of social organization in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Folia Primatologica**, v. 57, p. 28-33, 1991.

ROWE, N. **The pictorial guide to the living primates.** Charlestown, Rhode Island: Pogonias Press, 1996. p. 66.

RYLANDS ,A. B. Preliminary field observations on the marmoset, Callithrix humeralifer intermedius at Dardanelos, Rio Aripuana, Mato Grosso. **Primates**, v. 22, p. 46-59, 1982.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-LUNA, E**.** A species list for the New World primates (Platyrrhini): Distribution by Country Endemism and conservation status according to the Mace- Land System. **Neotropical Primates**, v. 3, p. 113-160, 1995. Supplement.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. An assessment of the diversity of new world primates**. Neotropical Primates**, v. 8, n. 2, p. 61-93, 2000.

SALDANHA, D. M.; NASCIMENTO, H. G.; BARBOSA, M. F. P. P.; SOUSA, M. B. C. Monitoramento hormonal do par reprodutor de sagui comum (*Callithrix jacchus*) antes e após o nascimento dos filhotes. **PublICa** ,v. 1, p. 32-41, 2005.

SALTZMAN, W.; SEVERIN, J. M.; SCHULTZ-DARKEN, N.; ABBOTT, D. A. Behavioral and social correlates of escape from suppression of ovulation in female common marmosets housed with the natal family. **American Journal of Primatology,** v. 41, p. 1-21,1997.

SANTEE, D. P.; FARIA, D. S. Padrões de comportamento utilizados pelos Saguis (*Callithrix jacchus penicillata*) na retirada de exsudato. **Psicologia**, v. 11, n. 1, p. 65-74, 1985.

SAVAGE, A.; GIRALDO, L. H.; SNOWDON, C. T. Demography, group composition, and dispersal in wild cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*) groups. **American Journal of Primatology**, v. 38, p. 85-100, 1996.

SAVAGE, A.; BAKER, A. J. Callithricid social structure and mating system: evidence from field studies. **American Journal of Primatology**, v. 38, p. 1-3, 1996.

SAVAGE, A.; SHIDELER, S. E.; SOTO, L. H.; CAUSADO, J.; GIRALDO, L. H.; LASLEY, B. L.; SNOWDON, C. T. Reproductive events of wild cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) in Columbia. **American Journal of Primatology**, v. 43, n. 4, p. 329-337, 1997.

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

SMITH, T. E.; ABBOTT, D. H. Behavioral discrimination between circumgenital odor from peri-ovulatory dominant and anovulatory female common marmosets (*Callithrix jacchus*). **American Journal of Primatology** , v. 46, p. 265-284, 1998.

SNOWDON, C. T.; SOINI, P. The tamarins, genus *Saguinus.* In: MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A.; FONSECA, G. A. B. **Ecology and behavior of Neotropical primates***.* Washington*:* World Wildlife Fund, 1988. p. 223-298.

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

SOINI, P. Ecology and population dynamics of the pygmy marmoset, *Cebuella pygmaea*. **Folia Primatologica**, v. 39, p.1-21,1982.

SOINI, P. The pygmy marmoset, genus *Cebuella.* In: MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A.; FONSECA, G. A. B. **Ecology and behavior of Neotropical primates***.* Washington*:* World Wildlife Fund, 1988. p. 79-129.

SOUSA, M. B. C.; PEREGRINO, H. P. A.; CIRNE, M. F. C.; MOTA, M. T. S. Reproductive patterns and birth seasonality in a South-American breeding colony of common marmosets, *Callithrix Jacchus*. **Primates**, v. 40, p. 327-336, 1999.

STEVENSON, M. E.; RYLANDS, A. B. The marmosets, genus *Callithrix.* In: MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A.; FONSECA, G. A. B. **Ecology and behavior of Neotropical primates***.* Washington*:* World Wildlife Fund, 1988. p. 131-222.

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

SOUSA, M. B.; ALBURQUERQUE, A. C. S. R.; ALBURQUERQUE, F. S.; ARAUJO, A.; YAMAMOTO, M. E.; ARRUDA, M. F. Behavioral strategies and hormonal profiles of dominant and subordinate common marmoset (Callithrix jacchus) females in wild monogamous groups. **American Journal of Primatology**, v. 67, p. 37-50, 2005.

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.

SUSSMAN, R. W. **Primate ecology and social structure:** New World monkeys. Needham Heights (MA): Pearson Custom, 2000. v. 2, p. 207.

TARDIF, S. D.; JAQUISH, C. E. Number of ovulations in the marmoset monkey (Callithrix jacchus) : Relation to body weight , age, and repeatability**. American Journal of Primatology**, v. 42, p. 323-329, 1997.

TARDIF, S. D.; SMUCNY, D. D.; ABBOTT, D. H.; MANSFIELD, K.; SCHULTZ-DARKEN, N.; YAMAMOTO, M. E. Reproduction in captive common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 364-368, 2003.

TERBORGH, J.; GOLDIZEN, A. W. On the mating system of the cooperatively breeding saddle-backed tamarin (*Saguinus fuscicollis*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** , v. 16, p. 293-299, 1985.

TULCHINSKY, D.; HOBEL, C. J.;YEAGER, E.; MARSHALL , J. R. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in humanpregnancy. I. Normal pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 112, p. 1095-1110, 1972.

VALLE, R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui–de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*).** 2007. 169 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2007.

VILELA , S. L.; FARIA, D. S. Seasonality of the activity pattern of *Callithrix penicillata* (Primates, Callithricidae) in the cerrado (scrub savanna vegetation). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 2, p. 363-370, 2004.

WASSER, S. K.; RISLER, L.; STEINER, R. A. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 862-872, 1988.

WILDT, D. E. Spermatozoa, collection, evaluation, metabolism, freezing and artificial insemination. In: DUKELOW, W. R. **Comparative primate biology**: reproduction and development. New York: A.R Liss.,1986. v. 3, p. 171-193.

WISLOCKI, G. B. Observations on twinning in marmosets. **American Journal of Anatomy,** v. 64, p. 445-483, 1939.

WILSON, M. I. Characterisation of the oestrous cycle and mating season of squirrel monkeys from copulatory behavior. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p 57-63, 1977.

ZIEGLER, T. E.; BRIDSON, W. E.; SNOWOON, C. T.; EMAN, S. Urinary gonadotropin and estrogen excretion during the postpartum estrus, conception, and pregnancy in the cotton-top tamarin *(Saguinus oedipus oedipus).* **American Journal of Primatology**, v. 12, p. 127-140, 1987.

ZIEGLER,T. E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D.; SHULTZ-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.

ANEXOS

Anexo A - Percentual de reações cruzadas do conjunto diagnóstico comercial para Radioimunoensaio para dosagem de progesterona Coat a Count da marca Siemens®

% de reação cruzada	Esteróide
100	Progesterona
9,0	5αPregnanediona
3,4	17α Hidroxiprogesterona
3,2	5β Pregnanediona
2,2	11-Deoxicorticosterona
0,9	Corticosterona
0,1	Pregnenolona
0,05	5β-pregnane-3α-ol-20-one
0,05	5-pregnane-3β-ol-20-one-sulfato

Anexo B - Percentual de reações cruzadas dos conjuntos diagnósticos comerciais para Radioimunoensaio para dosagem de estradiol Coat a Count da marca Siemens®

% de reação cruzada	Esteróide
100	Estradiol 17β
10,0	Estrona
4,4	*d* – Equilenina
1,8	Etrona-β-D-glucoronide
0,80	Equilina
0,58	Sulfato de estrona