

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PERFIL DE PROGESTERONA EM MACACOS-DA-NOITE
(*Aotus azarai infulatus*) EM CATIVEIRO

Leandro Nassar Coutinho
Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL DE PROGESTERONA EM MACACOS-DA-NOITE
(*Aotus azarai infulatus*) EM CATIVEIRO**

Leandro Nassar Coutinho

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)

2014

C871p Coutinho, Leandro Nassar
Perfil de progesterona em macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) em
cativeiro / Leandro Nassar Coutinho. – Jaboticabal, 2014
iv, 39 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Co-orientador: Frederico Ozanan Barros Monteiro, Marcus Antonio Rossi
Feliciano

Banca examinadora: Priscila Viau Furtado, Rodrigo del Rio do Valle, Maria
Emília Franco Oliveira, Lindsay Unno Gimenes

Bibliografia

1. Enzimaimunoensaio, 2. Esteroides, 3. Primatas, 4. Ciclo estral, 5.
ultrassom. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.97

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: lnassarc@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leandro Nassar Coutinho – Nascido em Belém (PA), 08 de Abril de 1986. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural da Amazônia (2009). Mestre em reprodução Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal (2012). Tem experiência na área de ultrassonografia e fisiologia Reprodutiva. Atuando em reprodução e diagnóstico por Imagem de primatas e animais domésticos.

**"Não está ocioso apenas aquele que não faz nada, mas também aquele que
poderia fazer algo melhor."
(Sócrates)**

DEDICATÓRIA

Dedico à minha namorada, Marina Botelho Soares de Brito,
doce, fiel, companheira e indispensável pra minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, eles sempre primeiro. Grande parte do orgulho que sinto hoje por essa conquista profissional só faz sentido porque eles estão aqui vendo isso acontecer.

À minha irmã Luciana. Sei que ela mais que ninguém torce por mim. E essa força vem acompanhada pelo maior presente do mundo, meu afilhado, Daniel.

À Marina, a quem agradeço e dedico esta obra. A sorte persegue aqueles que têm garra e dedicação e ela é a própria sorte. Ela é tudo o que eu admiro. A maior das conquistas, é a minha... sorte.

Ao professor Wilter Ricardo Russiano Vicente, um verdadeiro e dedicado pai, grande líder, o convívio durante esses 4 anos com a sua experiência e caráter são o maior presente profissional.

Ao Professor Frederico Ozanan Barros Monteiro. Sinto enorme orgulho de ao concluir esta etapa passar a ser seu companheiro de trabalho. Tenho grande admiração por um grande mestre.

Ao Professor Marcus Antônio Rossi Feliciano, parceiro especial de trabalho, focado, produtivo, incentivador, coorientador e acima de tudo um amigo que deixo em Jaboticabal e carrego pra vida.

Amigos são incontáveis, Jaboticabalenses de coração, paulistas de nascimento, ou simplesmente brasileiros longe de casa. Todos me fizeram um médico veterinário melhor e fizeram de mim um amigo.

À diretoria do Centro Nacional de Primatas (CENP), Dr. Carlos Jorge Costa Faro, e aos queridos amigos, “Dona Rosa”, “Seu Miguel”, “Paulo X”, Ivanilson, Luciene,

Fabio jr., Paulo Castro, José Muniz e todos que auxiliaram na realização deste trabalho.

À UNESP de Jaboticabal, por me aceitar como estudante de Pós-graduação, oferecendo uma estrutura excelente para a construção de ótimos profissionais.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e institucional à essa pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

Agradeço aos membros da banca, Prof. Dra. Lindsay Unno Gimenez, Prof. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira, Dra. Priscila Viau Furtado e Prof. Dr. Rodrigo del Rio do Valle por todo o suporte científico dedicado a esta tese. Esse trabalho reflete toda a vontade de transmitir seus conhecimentos e dedicação ao ensino.

Aos animais, que estão por último para que sejam primeiro lembrados assim que a última página for virada. São eles e não os cientistas os que fazem a humanidade caminhar.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Taxonomia	3
3.2. Comportamento reprodutivo e fisiologia ovariana	4
3.3. Síntese e metabolismo da Progesterona.....	6
3.4. Avaliação hormonal não invasiva em primatas.....	7
3.5. Enzimaimunoensaio	9
3.6. Ultrassonografia reprodutiva em Aotus	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Colheita, armazenamento e extração das amostras fecais	14
4.2. Dosagem hormonal.....	15
4.2.1. Imobilização do anticorpo em fase sólida	16
4.2.2. Teste de Titulação	16
4.2.3. Reação de competição -	17
4.2.4. Separação das frações de anticorpos livres e unidos a anticorpos na fase sólida	18
4.2.5. Adição do substrato-cromógeno.	18
4.2.6. Leitura das placas	18
4.2.7. Análise estatística.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Ultrassonografia	20
5.2 Perfil de progesterona.....	21
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

PERFIL DE PROGESTERONA EM MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarai infulatus*) EM CATIVEIRO

RESUMO – Macacos-da-noite são tidos como excelentes modelos experimentais, que podem contribuir com o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução em primatas. O monitoramento do ciclo é um procedimento básico, porém complexo em animais selvagens. Tem-se desenvolvido métodos não invasivos para avaliar o perfil hormonal reprodutivo desses animais expandindo o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de primatas em cativeiro e vida livre. O presente estudo visa monitorar a atividade folicular e as concentrações fecais de metabólitos de progesterona para ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva dessa espécie. Foram utilizadas 12 fêmeas adultas, pertencentes à colônia de reprodução de macacos-da-noite do CENP. O estudo foi realizado a partir do exame ultrassonográfico do ovário e colheita de fezes para monitoramento dos níveis de metabólitos de progesterona dos animais por enzimaímunoensaio. Por meio da dosagem de metabólitos de progesterona foi possível apenas sgerir o ciclo da espécie para o período estudado. Porém, os níveis basais ($2,1 \pm 0,8$ ng/g de fezes secas), a médio do pico ($36,6 \pm 8,6$ ng/g fezes secas), os níveis médios ($4,7 \pm 1,8$ ng/g de fezes secas) e os valores mínimo ($0,4$ ng/g de fezes secas) e máximo ($49,9$ ng/g de fezes secas) de metabólitos de progesterona foram determinados para espécie em cativeiro sob estas condições. A determinação do pico e concentrações basais de metabólitos de progesterona, conjuntamente a avaliação ultrassonográfica são ferramentas não invasivas e factíveis na avaliação do ciclo estral de macacos-da-noite.

Palavras-chave: Enzimaímunoensaio, esteroides, primatas, ciclo estral, ultrassom

PROGESTERONE PROFILE IN OWL MONKEYS (*Aotus azarai infulatus*) IN CAPTIVITY

ABSTRACT – Owl Monkeys are considered excellent experimental models and can contribute to the development of biotechnologies of reproduction in primates. Monitoring the reproductive cycle is a basic procedure, however complex in wild animals. Noninvasive methods has been developed to assess the reproductive hormonal profile of these animals expanding knowledge on reproductive physiology of primates in captivity and the wild. This study aims to monitor follicular activity and fecal progesterone levels to increase knowledge about reproductive physiology of this species. 12 adult females belonging to the breeding colony of owl monkeys of CENP were used. The study was performed using the ultrasound examination of the ovaries and feces collection for monitoring the levels of metabolites of progesterone by enzymeimmunoassay. By progesterone assay we may suggest the cycle of the species for the period studied. However, the baseline levels (2.1 ± 0.8 ng/g), mean peak (36.6 ± 8.6 ng/g), mean levels (4.7 ± 1.8 ng/g) and the minimum (0.4 ng/g) and maximum (49.9 ng/g) metabolites of progesterone were determined for the specie in captivity. The determination of the peak and basal levels of progesterone together to the sonographic evaluation are noninvasive and feasible in the evaluation of the estrous cycle in owl monkeys.

Keywords: Enzymeimmunoassay, Steroids, Primates, Estrous, Ultrasound

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac - Anticorpo

CENP – Centro Nacional de Primatas

CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais

CL – Corpo lúteo

EIE – Enzimaimunoensaio

EUA – Estados Unidos da América

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GC – Gonadotrofina Coriônica

HRP – “Horseradish Peroxidase”

IUCN – international union for conservation

LDH – Laboratório de Dosagens Hormonais

MHz – Mega Hertz

P4 – Progesterona

PBS – “Phosphate Buffer Solution”

PN – Primatas neotropicais

PNH – Primatas não humanos

PNM – Primatas do novo mundo

PVM – Primatas do velho mundo

USP – Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta e possui ainda um grande número de espécies de primatas. Segundo Machado et al. (2005) o país possui 133 espécies e subespécies de primatas, sendo que 80 espécies são endêmicas da região amazônica, e 11 estão ameaçadas de extinção.

Considerando a grande quantidade de espécies primatas ameaçados de extinção em nosso país, torna-se fundamental o desenvolvimento de pesquisas sobre a fisiologia reprodutiva e biotécnicas para reprodução e conservação desses animais. Jurke et al. (1994) e Guimarães (2001) consideram que pesquisas com primatas neotropicais em cativeiro auxiliam o aumento do desempenho reprodutivo e contribuem para o desenvolvimento de estudos biomédicos, em medicina e veterinária, sem ser necessária a utilização de animais de vida livre.

Neste contexto, macacos-da-noite são tidos como excelentes modelos experimentais, que podem contribuir com o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução em primatas (FERNANDEZ-DUQUE, 2012). COUTINHO et al. (2011), COUTINHO et al. (2013) e MONTEIRO et al. (2009, 2011a, 2011b), conseguiram estabelecer parâmetros biométricos reprodutivos e importantes aspectos sobre a dinâmica folicular para os macacos-da-noite, utilizando a ultrassonografia transabdominal modo-B e Doppler. Ademais, ainda são necessários novos estudos, a fim de descrever a biologia reprodutiva da espécie e utilizá-la para o avanço nas biotécnicas reprodutivas em primatas ameaçados de extinção. Para a maioria das espécies e subespécies de *Aotus*, pouca ou nenhuma informação sobre a fisiologia reprodutiva está disponível em literatura.

O monitoramento do ciclo é um procedimento básico, porém complexo em animais selvagens. A ultrassonografia é uma técnica de imagem que permite o acompanhamento não invasivo de órgãos internos (ORTIZ et al., 2005). Com o advento de equipamentos cada vez mais modernos, tem se tornado uma excelente ferramenta no estudo ginecológico em primatas (MONTEIRO et al., 2009; COUTINHO et al., 2011; COUTINHO et al., 2013). Somado a esta técnica, nos últimos anos, tem-se desenvolvido métodos não

invasivos para avaliar o perfil hormonal reprodutivo desses animais, expandindo o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de primatas em cativeiro e vida livre (LASLEY; SAVAGE, 2007). A utilização e desenvolvimento da técnica são justificados por minimizar os efeitos deletérios causados pela contenção física ou química, devido ao estresse que interfere direta ou indiretamente no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal dos animais.

O presente estudo visou monitorar o ciclo ovariano de macacos-da-noite a partir da atividade folicular e as concentrações fecais de metabólitos de progesterona para ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva dessa espécie, por meio da ultrassonografia e da técnica de dosagem hormonal em fezes por enzimaímunensaio.

2. OBJETIVOS

Monitorar o ciclo ovariano em macacos-da-noite por meio de ultrassonografia da atividade folicular e dosagem fecal de metabólitos de progesterona.

2.1. Objetivos Específicos

Determinar o perfil de metabólitos de progesterona em fezes por EIE;

Conhecer a concentração de metabólitos de P4 em fêmeas adultas;

Definir a duração do ciclo ovariano na espécie em cativeiro

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Taxonomia

Os primatas pertencem à ordem Primates e estão divididos em duas subordens: Strepsirhini e Haplorhini. Os Haplorhini constituem as infra-ordens Tarsii, Catharrhini, os Primatas do Velho Mundo (PVM) e Platyrrhini, os Primatas do Novo Mundo (PNM) ou Primatas Neotropicais (PN), que são os primatas que habitam as Américas Central e do Sul (BRASIL, 2008). Rylands et al. (2012), propuseram uma nova classificação taxonômica para PN. Esses autores identificaram 152 espécies (204 espécies e subespécies) de PNM (Platyrrhini), que foram classificados em 20 gêneros e quatro ou cinco famílias.

Nessa classificação, os macacos-da-noite foram considerados os únicos integrantes da família Aotidae. Anteriormente eram pertencentes à família Cebidae, mas em função dos avanços recentes na filogenética e o estudo molecular foram descritos com características únicas e com diferenças marcantes dos cebídeos (PERELMAN et al., 2011).

HersHKovitz (1983) descreveu o gênero Aotus como sendo constituído por dois grupos baseados na coloração ao redor do pescoço: acinzentados, no norte do rio Amazonas e avermelhados ao sul do rio Amazonas. Entretanto, após estudos moleculares a divisão mostrou-se equivocada ou não conclusiva (ASHLEY; VAUGHN, 1995; PLAUTZ et al., 2009 e MENEZES et al., 2010).

Estudos citogenéticos e morfológicos (PIECZARKA et al., 1993; FORD, 1994; PLAUTZ et al., 2009) apresentaram novas alternativas e outras

descrições para o gênero. Os estudos de Rylands et al. (2012) e Svesson et al. (2010), demonstraram a existência de 11 espécies e 13 subespécies: *Aotus trivirgatus*, *A. vociferans*, *A. nancymae*, *A. lemurinus*, *A. griseimembra*, *A. zonalis*, *A. azarae* (subespécies – *Aotus azarae azarae*, *Aotus azarae bolivienses* e *Aotus azarae infulatus*) (Figura 1), *A. miconax* e *A. nigriceps*. Outra espécie, *A. jorgehernandezii*, foi descrita por Defler e Bueno (2007) e os mesmos autores propuseram, baseado na variabilidade cariotípica conclusiva, que a espécie *A. brumbacki*, não pode ser uma subespécie de *A. lemurinus*, definindo assim uma nova espécie.

Amplamente utilizado em pesquisas biomédicas, os macacos-da-noite foram recomendados como excelentes modelos experimentais pelo “World Health Organization”. Foram amplamente utilizados em estudos sobre câncer (ABLASHI et al., 1972; BARAHONA et al., 1976), trabalhos relacionados à fisiologia visual (ALLMAN; KAAS, 1974), enfermidades cardiovasculares (SÁNCHEZ et al., 2006), estudos sobre hepatite A e E (LEDUC et al., 1983; TICEHURST et al., 1992, ASHER et al., 1995), sobre dengue em *Aotus nancymae* (MAVES et al., 2011), produção de vacinas (ESPINOSA et al., 2009; ROJAS-CARABALLO et al., 2009) e para estudos sobre a malária em testes pré-clínicos de sua vacina, assim como pesquisas básicas de seu sistema imune (AYRES; DEUTSCH, 1982; JORDÁN-VILLEGAS et al., 2011).

Atualmente, quatro espécies, *A. brumbacki*, *A. griseimembra*, *A. lemurinus* e *A. miconax*, estão na lista IUCN (2008), como espécies na categoria Vulnerável, as demais espécies não correm riscos ou possuem dados deficientes.

3.2. Comportamento reprodutivo e fisiologia ovariana

Os *Aotus* são considerados animais de atividade noturna, sendo os únicos antropóides com esse tipo de comportamento. Porém, algumas espécies possuem uma conhecida atividade “cathemeral”, determinada pela intensidade da luz da Lua. Essa influencia sobre a atividade noturna estaria em direta relação com o período reprodutivo (FERNANDEZ-DUQUE, 2012; KHIMJI; DONATI, 2014).

Dentre as espécies de primatas, as espécies do Novo Mundo, criadas em cativeiro, não sofrem influência marcante do ambiente em regiões tropicais (BRONSON, 1988). Porém, já foram descritas mudanças no fotoperíodo em função da temperatura ambiente interferindo na atividade reprodutiva da fêmea de *Aotus spp* (FERNANDEZ-DUQUE et al., 2008). Animais de cativeiro alojados em recinto ao ar livre, a 25° de latitude Norte, tornaram-se cada vez mais sazonais (HOLBROOK et al. 2004). E populações de vida livre na região do Chaco argentino, hemisfério sul, os nascimentos forma restritos ao período de março a junho, indicando a influência do fotoperíodo na atividade reprodutiva dos animais (FERNANDEZ-DUQUE; HUNTINGTON, 2002).

Os macacos-da-noite tem bom desempenho reprodutivo em cativeiro (GOZALO; MONTOYA, 1990). Para isso, é importante conservar práticas de manejo adequadas para manter o fotoperíodo constante e que estimulem a formação da estrutura social encontrada em populações de vida livre (MÁLAGA et al., 1997). Esse comportamento reprodutivo estável favorece os estudos reprodutivos na espécie (COUTINHO et al., 2013). Outros eventos, porém, ainda estão obscuros no estudo reprodutivo do gênero *Aotus*, a puberdade nos machos apesar de bem definida, não culmina com o início da atividade reprodutiva (FERNANDEZ-DUQUE, 2012), mais ainda, nas fêmeas não existe estudo que determine a ocorrência do evento. Sabe-se que o primeiro cio fértil define a ocorrência da puberdade, mas a literatura consultada apresentou informações escassas a esse respeito (FERNANDEZ-DUQUE; HUNTINGTON, 2002).

Os PN apresentam, em sua grande maioria, ciclo estral. Os *Aotus* fazem parte desse grupo, com duração média de 16 dias para o ciclo, segundo estudos hormonais de BONNEY et al. (1979). De acordo com Bonney e Setchell (1980) e Dixson (1994), a fase folicular do ciclo ovariano de macacos-da-noite dura, em média, seis dias, desde o pico de 17β estradiol e o aumento das concentrações de progesterona. A fase luteal dura em torno de 10 dias. Estudos mais recentes de Fernandez-duque et al. (2011), utilizando dosagem em fezes de animais de vida livre determinou um ciclo de 22 dias, o próprio autor admite que a faixa entre as espécies do gênero pode variar de 13 a 25 dias (FERNANDEZ-DUQUE, 2012). Já Coutinho et al. (2013) a partir de análise ultrassonográfica dos ovários e folículos, definiu o ciclo em 17 dias.

Os ovários, em *Aotus trivirgatus*, tanto de fêmeas adultas como de jovens, foram caracterizados por grande quantidade de tecido intersticial luteinizado na região medular, fazendo com que o córtex seja estreito (VERAS, 2004). Essa característica do estroma ovariano dificulta a identificação de corpo lúteo (CL), quer pela forma ou por estigmas, tanto na macroscopia quanto microscopia e ultrassonografia (HERTIG et al., 1976; MONTEIRO et al., 2009).

3.3. Síntese e metabolismo da Progesterona

A síntese dos hormônios esteroides da reprodução se dá em locais específicos do corpo, como os ovários, placenta e glândula adrenal (GUYTON; HALL, 2006). Os principais esteróides reprodutivos são formados a partir da molécula de colesterol, o mais abundante dos hormônios da classe e são formados por um anel estrutural denominado ciclopentanoperidrofenantreno. A progesterona (P4), o principal hormônio feminino, juntamente com os estrógenos, está enquadrada nessa categoria (FURTADO, 2007).

O principal responsável pela produção da progesterona em vertebrados é o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O estroma ovariano determina a produção de estrógeno e progesterona, tanto a partir das células da teca, quanto a partir das células da granulosa de folículos antrais (MAKRIS; RYAN, 1974, LANGE et al., 2002). Além dos folículos, a progesterona é principalmente produzida nos ovários pelo corpo lúteo, e ainda pela placenta, que se torna o principal sítio de produção de progesterona logo no início da gestação de primatas. Por se tratar de um hormônio esteroide, caracteristicamente, a progesterona é produzida e logo liberada na corrente sanguínea, onde se ligará a proteínas carreadoras que as torna biodisponível para as células-alvo. (LANGE et al., 2002, FURTADO, 2007).

O papel da progesterona em fêmeas primatas é manter a gestação, por meio do estímulo da luteotrofina, Gonadotrofina Corionica (GC) e estimular por meio de *feedback* negativo a indução de um novo ciclo. É a progesterona que determina a duração do ciclo na maioria dos vertebrados (BERTAN et al., 2006).

Após sua ação, a progesterona então é metabolizada no fígado, retornando posteriormente a corrente sanguínea para eliminação renal ou

sendo desviada para o intestino, onde será eliminada nas fezes (SCHWARZENBERGER et al., 1992). No curso de seu metabolismo a progesterona é transformada em hidroxiprogesterona-17 α ou outros 18 metabólitos diferentes (FURTADO, 2007) Os níveis plasmáticos de progesterona, serão detectados nas fezes cerca de 24-48 horas (SCHWARZENBERGER et al., 1992). PALME et al. (1996) em estudo realizado em ovinos e utilizando esteroides marcados com C14, identificou 77% da progesterona sendo eliminada nas fezes na sua forma livre e concluíram que a técnica é viável para o acompanhamento da endocrinologia reprodutiva de várias espécies, em especial animais selvagens.

3.4. Avaliação hormonal não invasiva em primatas

Realizar a avaliação hormonal de animais selvagens por meio do sangue constitui uma excelente forma de avaliação dos níveis de esteroides ovarianos em função dos dados obtidos, porém a colheita desse material exige, de modo geral, um manejo complexo, em função do estresse ao qual o animal é submetido, seja por contenção física e/ou química ou em função do maior tempo de treinamento dos animais a colheita, além do maior risco a acidentes, tornando assim a análise laboriosa e por vezes alterada. A avaliação de metabólitos de esteroides fecais é uma forma não invasiva e bastante sensível de avaliar a função ovariana, que tem dominado as técnicas de monitoramento hormonal e pesquisas em comportamento animal nas últimas décadas (BHEERNE; WHITTEN, 2004). Wasser et al. (1986) e Risler (1987) introduziram a técnica na avaliação de primatas e desde então as mais diversas espécies já foram estudadas quanto ao comportamento endócrino (SCHWANBERGER et al., 2007).

O uso das fezes como matriz para estudos reprodutivos contempla a mais fácil obtenção das amostras, fácil conservação e transporte, porém demanda um aparato laboratorial mais complexo e com técnicas mais laborais (SCHWANBERGER et al., 1996). Porém, o perfil analítico de metabólitos em fezes traça um padrão completo dos eventos hormonais de determinado órgão secretor (FURTADO, 2007)

A avaliação da produção de progesterona é fundamental para o acompanhamento do ciclo ovariano e do período peri-ovulatório, independente do substrato utilizado para sua dosagem (CAROSI et al., 1999). Estes mesmos autores, em estudo realizado em *Cebus apela*, confirmam que a atividade hormonal é marcadamente o principal fator de ciclicidade em primatas. Portanto o acompanhamento dos níveis hormonais pode determinar o comportamento reprodutivo.

A diferenciação entre a fase luteal e folicular é baseada na diferença entre os picos e as concentrações basais da progesterona e estrógenos. Cerda-molina et al. (2006), realizaram estudo hormonal em primatas a partir das fezes e consideram a dosagem válida para a determinação do ciclo, inclusive com altas concentrações de metabólitos e concentrações maiores de progesterona em fêmeas mais velhas. Portanto a dosagem de metabólitos da progesterona é diretamente o reflexo da função luteal (BONNEY; SETCHELL, 1980). As concentrações séricas de progesterona tendem a ser muito alta em primatas do novo mundo, quando comparada a primatas do velho mundo, conseqüentemente a concentração de metabólitos na urina e em fezes tende a ser também muito alta (BONNEY et al., 1979).

Em primatas neotropicais, o monitoramento reprodutivo por metabólitos fecais de esteróides é uma alternativa viável ao estudo do ciclo estral, também muito utilizada para determinar tempo de gestação, para comparação de níveis hormonais e comportamentais ou até para diagnóstico de anormalidades estrais (HEUGTEN et al., 2009, KUGELMEIER et al., 2011, KIM et al., 2012 e MARTIN, 2012).

A técnica exige que as fezes sejam rapidamente e corretamente armazenadas, em baixas temperaturas, para que não ocorra a deterioração dos esteroides pelas bactérias entéricas (KHAN et al., 2002). Para avaliação de animais em vida livre, este armazenamento torna-se mais crítico. Em cativeiro, o rápido armazenamento das amostras em freezer a -20°C é simples e viável, até a extração e dosagem (WHITTEN et al., 1998). Outros fatores como o momento do dia, hora da armazenagem e homogeneização da amostra podem influenciar a acurácia da detecção dos metabólitos de esteroides fecais (BHEERNE; WHITTEN, 2004). Os métodos de extração já foram descritos por vários autores para primatas, tanto realizados a partir de amostras secas ou

amostras úmidas (HEISTERMANN et al., 1993, HEISTERMANN et al., 1995, MATSUMURO et al., 1999, CAROSI et al., 1999, KULGEIMEIER, 2011, ZIEGLER; WITTNER, 2005).

Os primeiros estudos em *Aotus* utilizaram a Cromatografia em fase gasosa e espectrometria em massa, para dosagem de hormônios em urina (SETCHELL; BOONEY, 1979). Neste estudo, os autores conseguiram identificar mais de 40 esteróides diferentes sendo liberados na urina, onde em maior proporção estavam os metabólitos de progesterona. Fernandez-duque (2012) utilizaram amostras fecais e Wolovich et al. (2008) utilizaram urina, para o monitoramento da função reprodutiva de macacos-da-noite, a partir da análise de metabólitos de progesterona e estrógeno.

3.5. Enzimaimunoensaio

Os métodos mais utilizados para a detecção de hormônios em matrizes são o radioimunoensaio e o enzimaimunoensaio (EIE). Onde anticorpos monoclonais ou policlonais são utilizados para detecção de metabólitos de esteroides, sendo o método enzimáticos o mais utilizado na atualidade (FURTADO, 2007). Isso em parte, se dá em função da sua vantagem de não exposição a radioisótopos e mais consistentemente a sua grande sensibilidade, que leva a uma economia na utilização de reagentes, pois utiliza micro amostras (ZIEGLER; WITTNER, 2005). O ensaio pode ser analisado de forma competitiva ou não competitiva, e a leitura das placas é feita de forma automatizada (JOHANNSSON, 1991).

Os trabalhos utilizando dosagem hormonal em fezes são inúmeros em PVM (HEISTERMANN et al., 1993, WASSER et al., 1994, FUJITA et al., 2001), e tem se multiplicado para PN. Por isso, o método hoje, já está validado para um grande número de espécies, inclusive para *Aotus azarai* (FERNANDEZ-DUQUE, 2011).

3.6. Ultrassonografia reprodutiva em *Aotus*

Diante da biodisponibilidade da espécie em cativeiro, com grande potencial reprodutivo e da possível contenção, sem a utilização de substâncias químicas, apenas com o uso do treinamento e adaptação a contenção física

(Figura 1). A técnica ultrassonográfica passou a ser uma alternativa disponível para o estudo reprodutivo de *Aotus* spp. (MONTEIRO et al., 2009; COUTINHO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011b; COUTINHO et al., 2013). A ultrassonografia reprodutiva pode ainda servir de base para o desenvolvimento de biotécnicas, como o controle do ciclo estral a regimes de superovulação, programas de contracepção, na aspiração folicular e procedimentos de transplante ovariano, como também auxiliar a colheita de sêmen e técnicas de extração testicular do esperma, além da aplicação da inseminação artificial, colheita e transferência de embriões.



Figura 1: Contenção física de macaco-da-noite para a realização do exame ultrassonográfico, com a oferta de frutas no condicionamento e exame. (Coutinho et al., 2013)

Não existem relatos na literatura sobre o uso de da ultrassonografia auxiliando o desenvolvimento de biotecnologias em *Aotus*. Outras espécies neotropicais ocupam papel de maior destaque nessas pesquisas, como *Cebus apella* (DOMINGUES et al., 2007, ORTIZ et al., 2005, ALVES et al., 2007), *Callithrix jacchus* (OERKE et al., 1996 e 2002),

Em *Aotus*, os estudos ultrassonográficos são recentes e iniciaram com o trabalho de Monteiro et al. (2006), que descreveram a técnica para a realização

de exame na espécie, descrição morfológica do útero e ovário, avaliação renal e hepática (MONTEIRO et al., 2009; TAKESHITA et al., 2011, COUTINHO et al., 2011 e MONTEIRO et al., 2011a). Segundo Monteiro et al. (2011b), as frequências mais utilizadas para o estudo abdominal em PN são: 5, 7,5 e 10MHz, o mesmo autor verificou uma melhor visibilização das estruturas abdominais-pélvicas com transdutor de 12MHz, em *Aotus azarai infulatus*.

O útero e os ovários devem ser analisados em varreduras transversais e longitudinais. Em macacos-da-noite, o útero apresenta contornos regulares, ecotextura homogênea, localizado em posição medial à cavidade abdominal, com dimensões variando conforme o número de partos (MONTEIRO et al., 2006, MONTEIRO et al., 2009, COUTINHO et al., 2011). O endométrio e o miométrio são estruturas que também sofrem mudanças cíclicas detectáveis por ultrassonografia (MONTEIRO et al., 2009).

Em *Aotus*, a ecogenicidade do parênquima ovariano pode variar de homogêneo a heterogêneo, em função da presença ou não de folículos. Sua localização quase sempre está muito próxima ao útero, em função do curto ligamento do ovário, podendo variar em função de fatores como repleção de alças intestinais e vesícula urinária (WISLOCKI, 1932; MONTEIRO et al., 2009). A observação dos eventos cíclicos se mostra bastante difícil, principalmente devido ao fato do tecido lúteo e o estroma ovariano possuírem ecogenicidade semelhante (MONTEIRO et al., 2009).

Por meio do exame ultrassonográfico, ainda não foi possível identificar a presença do corpo lúteo em formação, desenvolvimento ou regressão, porém Coutinho et al. (2013) inferiram a ocorrência do fenômeno ovulatório, a partir da observação de estruturas foliculares em ovários de *Aotus azarai infulatus*. Esses autores definiram ainda a visibilização dos folículos como estruturas anecóicas, em comparação ao parênquima do ovário, de ecogenicidade homogênea e fina. O mesmo autor definiu uma relação entre esses achados e o ciclo reprodutivo da espécie, determinada pelo intervalo entre duas observações de folículos pré-ovulatórios maiores de 4 mm, que desapareciam no exame seguinte (após 48h), acompanhados de aumento no fluxo sanguíneo periovariano e periuterino (artéria íliaca interna).

O volume dos ovários parece variar consideravelmente em função da formação de folículos de volume e diâmetros desproporcionais para a espécie.

Com isso, estudos anteriores de Monteiro et al. (2009) afirmam que o volume do ovário direito é maior que o esquerdo ($p < 0,01$), e que quando acasaladas, as fêmeas tendem a ter os ovários maiores do que quando não acasaladas. Para esse estudo, foram observadas as seguintes medidas ovarianas para o ovario direito e esquerdo, respectivamente: comprimento do ovário de $0,90 \pm 0,12$ cm a $0,99 \pm 0,11$ cm, largura de $0,69 \pm 0,10$ cm a $0,79 \pm 0,11$ cm, espessura $0,55 \pm 0,09$ cm a $0,61 \pm 0,08$ cm e volume variando de $0,19 \pm 0,07$ cm³ a $0,26 \pm 0,06$ cm³. Porém, de acordo com Coutinho et al. (2013), ocorre o inverso, com volumes médios descritos de $0,32 \pm 0,05$ cm³ para o ovario direito e $0,38 \pm 0,09$ cm³ para o ovario esquerdo.

Novas tecnologias de imagem permitem, hoje, avaliar o processo de ovulação por meio do mapeamento Doppler. As influências hormonais geram respostas circulatórias que modificam o fluxo uterino e ovariano, causando a modificação no fluxo arterial ovariano, relacionado a dois fatores primordiais: o crescimento folicular e formação do corpo lúteo e ao fenômeno de neovascularização (CARVALHO et al. 2008). Estas técnicas tem tido boa aplicação em estudo de primatas, já tendo sido utilizada no estudo obstétrico em PVM (SANTOLAYA-FORGAS et al., 2006) e calitriquídeos (TCHIRIKOV et al., 1998). Em PN Domingues et al. (2007) e Coutinho et al. (2013) são os únicos trabalhos realizados com essa análise, realizados em *Cebus apella* e *Aotus azarai infulatus*, respectivamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Centro Nacional de Primatas (CENP), localizado no município de Ananindeua, estado do Pará, Brasil (latitude 1°38'26" e longitude 48°38'22"). O projeto foi aprovado pela Comissão de ética para o uso de Animais – CEUA, nº 025120/12.

Foram utilizadas 12 fêmeas adultas (sendo 2 nulíparas, 4 primíparas e 6 múltiparas), com idade entre 5 e 10 anos de idade, pertencentes à colônia de reprodução de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) do CENP (Figura 2). O estudo foi realizado a partir da colheita de fezes para monitoramento das concentrações de metabólitos de progesterona dos animais. As fêmeas estiveram durante todo o estudo, não acasaladas, mantendo apenas contato visual com o macho mantido em recinto similar a frente da sua respectiva parceira, durante três meses entre Junho e Agosto de 2011.

Para seleção dos animais, todas as fêmeas deveriam estar clinicamente saudáveis aos exames físico e laboratorial (hemograma com contagem de plaquetas, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama glutamil transferase). Ao exame ultrassonográfico prévio de órgãos do sistema reprodutor, os animais também se encontravam hípidos.

Os animais foram alimentados conforme o manejo adotado pelo CENP: diversos tipos de frutas, legumes, raízes, tubérculos, leite, ovos, ração comercial para cebídeos Megazoo[®] P18 (Rações Megazoo. Contagem, MG, Brasil), suplementos vitamínicos e minerais em água *ad libitum*. E mantidos em recintos no galpão de reprodução de primatas I e IV do CENP, medindo 3,85m x 1,20m x 2,40m e contendo caixa de contenção medindo 35cm x 30cm x 30cm (Figura 3).



Figura 2. Espécimes de macacos-da-noite mantidos em cativeiro no CENP. Fonte: CENP



Figura 3. (A) Galpão I de reprodução de *Aotus* no CENP. (B) Recintos com caixas de coleta no Galpão I. Fonte: CENP

4.1. Colheita, armazenamento e extração das amostras fecais

Durante o estudo realizou-se a colheita de amostras fecais frescas do recinto das fêmeas, para dosagem hormonal. As amostras de fezes foram colhidas no período matutino, entre 8 e 9 horas da manhã, a cada 48 horas. A coleta era sempre realizada após completa limpeza do recinto com jato de água sobre pressão e retirada de todo dejetos residual da noite anterior à coleta,

objetivando a coleta de fezes frescas para dosagem de metabólitos de P4, durante o período interovulatório determinado por ultrassom em estudo prévio (Coutinho et al. 2013). Cada amostra foi acondicionada em tubos de polipropileno para liofilização, identificadas, homogeneizadas e armazenadas em freezer a -20°C até o procedimento de extração no laboratório de Dosagens Hormonais - LDH/FMVZ/USP.

Primeiramente, as amostras foram liofilizadas em aparelho evaporador giratório (Savant Instruments INC, 100 Colin Drive Holbrook. NY, EUA), com o intuito de garantir a padronização do peso das amostras fecais e evitar a contaminação bacteriana das amostras. Posteriormente as amostras foram mantidas em refrigeração até serem extraídas.

Para a extração, 0,2g de fezes liofilizadas foram colocadas em tubos de 15ml e adicionados 5ml de Metanol 90% (Metanol, P.A. Synth[®]), Os tubos foram vedados e agitados em equipamento multivortexer (DVX-2500 VWR[®]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 RPM, por 15 minutos (centrifuga Universal 320 - Hettich[®]). O sobrenadante resultante foi armazenado em tubos de polipropileno e conservado a -20°C até os ensaios hormonais. Durante estudo teste, constatou-se que as amostras deveriam passar por diluição (1/100 e 1/200), para isso utilizou-se diluição em solução tampão fosfato salino (PBS).

4.2. Dosagem hormonal

Os metabólitos de progesterona foram dosados pela técnica de EIE “in house” baseado no método descrito para outros primatas (ZIEGLER et al., 1996; ZIEGLER & WITTNER, 2005), com a utilização de kits diagnósticos da Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA. Para quantificação da progesterona e seus metabólitos foi utilizado o anticorpo (Ac) monoclonal anti-progesterona clone 425 (CL 425), na diluição de 1/6000, a progesterona conjugada 3-O-carboximetiloxime, “Horseradish Peroxidase” (HRP) na diluição de 1/40000 e o padrão de progesterona (Progesterone – minimum 99%, cód P0130 – Sigma-Aldrich[®]) e a reação cruzada desse anticorpo descrito por Graham et al. (2001) é descrito na tabela (Tabela 1). O ensaio seguiu as

seguintes etapas descritas abaixo. E encontra-se validado pelo estudo de Fernandez-duque et al. 2011).

Tabela 1: Ocorrência de reações cruzadas (%) do anticorpo para progesterona CL-425, segundo GRAHAM et al. (2001). Fonte: FURTADO (2007)

Metabólitos de progesterona	Nome comum	Reação cruzada (%)
4- Pregnen-3,20-dione	Progesterona	100
4- Pregnen-3 α -ol-20-one		188
4- Pregnen -3 β -ol-20-one		172
4-Pregnenen - 11 α -ol-3,20-dione		147
5 α -Pregnan-3 β -ol-20-one		94
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-one		64
5 α -Pregnan-3,20-dione		55
5 β - Pregnan-3 β -ol-20-one		12,5
5 β -Pregnan-3,20-dione		8,0
4- Pregnen-11 β -ol-3,20-dione		2,7
5 β -Pregnan-3 α -ol-20-one		2,5
5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol	Pregnanediol	<0,1
5 α -Pregnan-3 α ,20 β -diol		<0,1
5 β -Pregnan-3,17-dione	Androstenediona	<0,1
5 β -Pregnan-11 β ,21-diol-3,20-dione	Corticosterona	<0,1

4.2.1. Imobilização do anticorpo em fase sólida

Microplacas com 96 poços de alta absorção (NUNC[®] maxisorb) foram marcadas com os anticorpos diluídos em solução tampão (“coating buffer”; Na₂CO₃, NaHCO₃, H₂O e pH 9,6) e 50 μ l do Ac foi adicionado em todos os poços da placa, com exceção do primeiro que foi deixado em branco. Após selar as placas com selador em acetato (Sarstedt[®]) as mesmas foram incubadas a 4^o C durante 16 horas.

4.2.2. Teste de Titulação

Para determinar a titulação ideal para o anticorpo (Ac) e do conjugado (HRP). Para esta etapa, realizamos um EIE direto confrontando distintas diluições de Ac (1/4000, 1/6000 e 1/8000) e HRP (1/20000 e 1/40000), tendo sido selecionado aquelas que obtivessem uma densidade óptica entre 0,8 e 1,0 OD em uma leitura de 450nm.

Para a montagem das placas para este teste foi utilizado o seguinte delineamento:

As amostras foram reconstituídas no volume de 150µl do conjugado HRP diluído, onde 50µl da solução amostra + conjugado e 50µl de tampão EIE e foram adicionados por poço. Esta reação ocorre entre o hormônio livre (padrão ou problema) e o conjugado a enzima. As amostras e os padrões foram determinados em duplicata e distribuídos na placa de acordo com a forma indicada. As placas foram novamente tapadas e incubadas agora por mais 2 horas em temperatura ambiente não controlada (15-25°C).

4.2.4. Separação das frações de anticorpos livres e unidos a anticorpos na fase sólida

As placas foram novamente esvaziadas por meio de lavagem em ciclo igual ao anterior, para separação agora dos hormônios livres e ligados aos anticorpos na etapa anterior.

4.2.5. Adição do substrato-cromógeno.

Foram adicionados 100µl de substrato-cromógeno (Enhance K-blue[®] TMB, Neogen Corporation), deixando reagir por 10 a 20 minutos, até que a densidade óptica dos poços B0 ficasse entre 0,8 e 1 OD. Para frear a reação enzimática é interrompida por uma solução de H₂SO₄ a 10%.

4.2.6. Leitura das placas

Uma vez passado o tempo de reação do substrato, foi realizada a leitura da densidade óptica da cor desenvolvida. Esta leitura foi feita em leitor automático (Modelo Multi Detector DTX 800, Beckman Counter[®]) utilizando o filtro 450nm. Os resultados obtidos foram corrigidos de acordo com a diluição, peso e volumes utilizados, sendo expressos em ng/g de fezes secas.

4.2.7. Análise estatística

Foram calculados parâmetros básicos da estatística descritiva para todas as variáveis analisadas, incluindo a média e desvio padrão do intervalo interovulatório observado e a análise descritiva dos dados hormonais,

baseados na normalização dos dados de acordo com o D0 do ciclo estral, definido com base no dia da observação da ovulação ao ultrassom (Coutinho et al., 2013) ou a partir do pico de metabólitos de progesterona.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estudo de dados hormonais em função do tempo é importante reduzir ao máximo a interferência do estresse na liberação dos hormônios reprodutivos, a liberação de ACTH, por exemplo, pode até levar o animal ao anestro ou aumentar a liberação de esteroides a partir da adrenal (RIVIER; RIVIER, 1991; GUYTON; HALL, 2006). Em função da utilização dos dados ultrassonográficos provenientes do trabalho de Coutinho et al. (2013) torna-se importante ressaltar que o tempo reduzido de exame ultrassonográfico, somado ao período de adaptação com a oferta de frutas, assim como a recompensa durante as sessões ultrassonográficas determinaram resultados positivos, com a observação de folículos e tempo médio de exame ultrassonográfico de 10 minutos. As imagens adquiridas apresentaram boa qualidade e uma mensuração das dimensões dos ovários foi suficiente para acompanhar a ocorrência de folículos.

5.1. Ultrassonografia

O ultrassom permitiu ótima visualização da estrutura ovariana, porém o CL não foi visível ao ultrassom e estudos histopatológicos descrevem o estroma ovariano bastante luteinizado (HERTIG et al., 1976, BONNEY et al., 1979), o que determina um pobre contraste entre a imagem do CL e o tecido, o que explica a provável não visualização da estrutura, Mayor (2014) em estudo ainda não publicado, identificou que os CL ocupam a maior parte do parênquima ovariano. Diante disso, os folículos maiores que 4 mm de diâmetro, que desapareceram no exame seguinte a sua última visualização e não retornavam com a imagem de um folículo maior ou em desenvolvimento foram considerados folículos ovulatórios. Alternativas como o controle por meio da citologia vaginal, poderiam ser úteis para validação fisiológica do exame ultrassonográfico, porém segundo Bonney e Setchell (1980) não encontraram variação na descamação do epitélio vaginal, como ocorre em carnívoros domésticos. Justificado pela baixa variação de estrógeno durante o estro em *Aotus spp.* Portanto, a melhor alternativa para realizar a avaliação fidedigna do ciclo na espécie é por meio da análise hormonal de esteroides reprodutivos.

5.2 Perfil de progesterona

Seguindo estudos já realizados em primatas neotropicais (SHIDELER et al., 1994; ZIEGLER et al., 1996) e em *Aotus azarai* (FERNANDEZ-DUQUE et al. 2011) observar o ciclo estral de primatas por meio dos metabólitos de progesterona é viável e nenhum estudo até hoje havia descrito o ciclo estral da espécie em função tanto da análise da progesterona, quanto de exame ultrassonográfico.

Foram extraídas e dosadas, 154 amostras fecais de todas as 12 fêmeas com base na análise ultrassonográfica (Figuras 3 a 14). Segundo Fernandez-duque et al. (2011), o ciclo de macacos-da-noite de vida livre está em torno de $22,2 \pm 2,7$ dias. Coutinho et al. (2013) utilizando a ultrassonografia modo-B e doppler sugeriu o ciclo em torno de $17 \pm 1,13$ dias, na mesma população, enquanto os primeiros estudos de Bonney et al. (1979), Bonney, Dixson e Fleming (1980) e Dixson et al (1983) sugerem um ciclo entre 15 e 16 dias, em animais de outra espécie (*Aotus trivigartus*) e também mantidos em cativeiro. Portanto, o período pretendido para realizar as análises mostrou-se curto para evidenciar a ocorrência de dois ciclos ou mais, o que permitiria afirmar com maior propriedade estatística a duração do ciclo na espécie em animais em cativeiro. O estudo conseguiu determinar parâmetros hormonais sintetizados na tabela 3. Entretanto, em função de não observarmos mais de um ciclo na maioria das fêmeas pelo tempo limitado de estudo, torna-se necessário a observação por dosagem hormonal durante os 90 dias, para determinar de forma completa o perfil de cada fêmea e que assim, os dados possam ser mais conclusivos quanto ao ciclo da espécie.

Tabela 2: Parâmetros do perfil de metabólitos de progesterona a partir da dosagem pelo método de enzimaímunoensaio (EIE) em fêmeas de macacos-da-noite.

	ng/g de fezes secas
P4 Máximo	49,9
P4 Mínimo	0,4
P4 médio	$4,7 \pm 1,8$
Média dos Picos de P4	$36,6 \pm 8,6$
Nível basal P4	$2,1 \pm 0,8$

As concentrações basais de metabólitos de progesterona ficaram em torno de $2,1 \pm 0,8$ ng/g de fezes secas. Esses valores divergem dos níveis observados por Fernandez-duque et al. (2011) em animais de vida livre, que observaram valores iguais a $1,1 \pm 0,8$ µg/g para os níveis basais. O método de diluição utilizado neste estudo e as características ambientais dos animais diferem consistentemente, o que pode determinar as diferenças observadas. Já os níveis mínimos e máximos de metabólitos de progesterona apresentaram ampla variação dentre as amostras (mínimo = 0,4ng/g de fezes e máximo = 49,9ng/g de fezes). O que segundo Palme (2005) e Monteiro et al. (2013) está diretamente envolvido com as variáveis ambientais, idade, sexo e o motivo do estudo em questão, que é o status reprodutivo. No caso do nosso estudo toda variação está relacionada ao status reprodutivo, já que as outras variáveis encontram-se controladas.

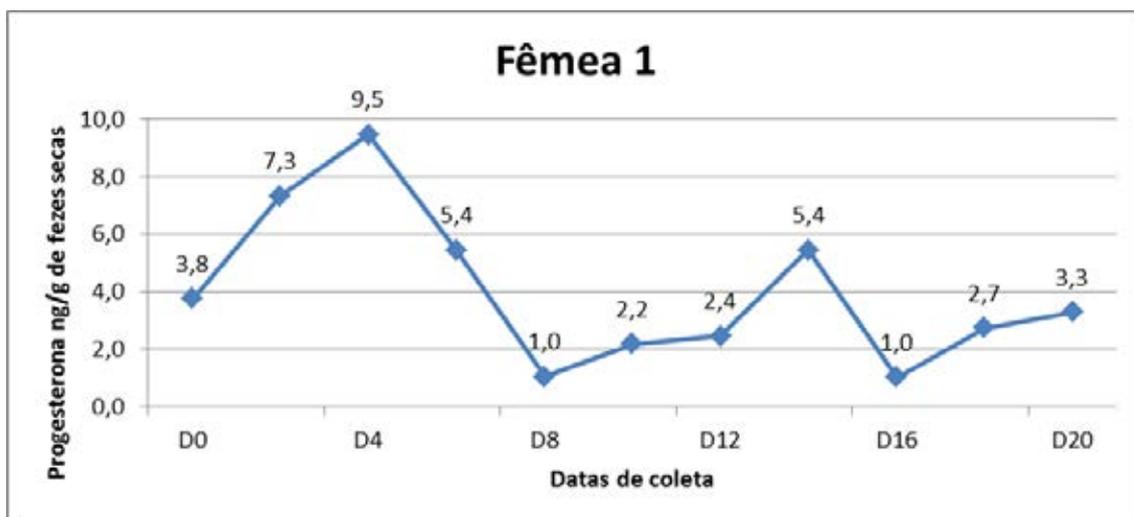


Figura 4. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 1, durante o intervalo de 20 dias.

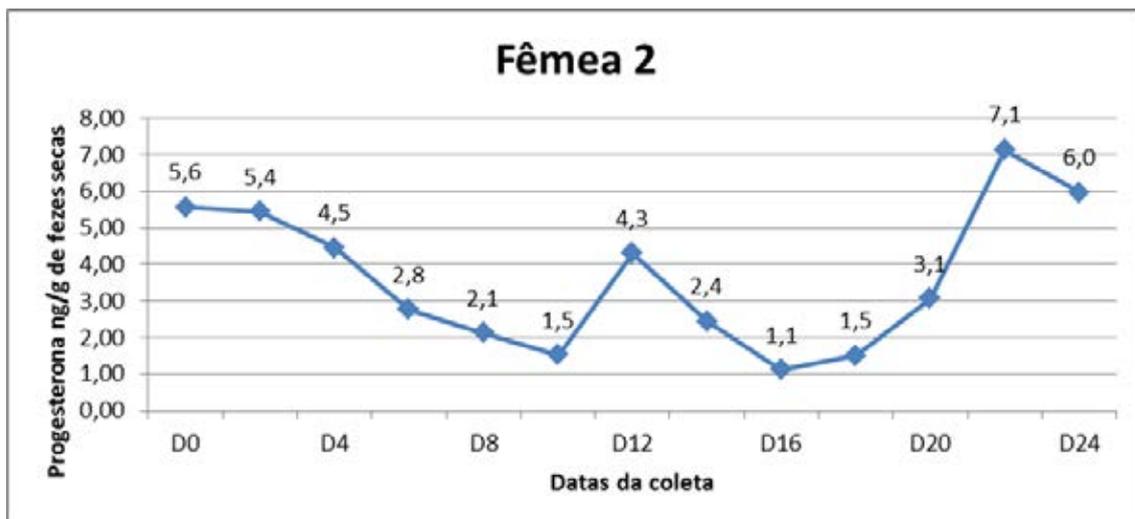


Figura 5. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 2, durante o intervalo de 24 dias.

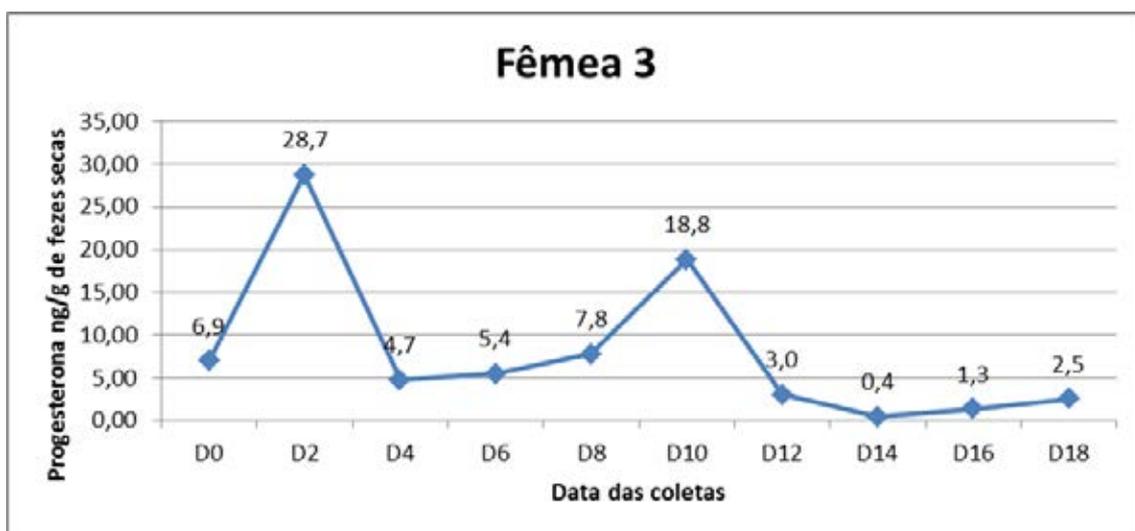


Figura 6. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 3, durante o intervalo de 18 dias.

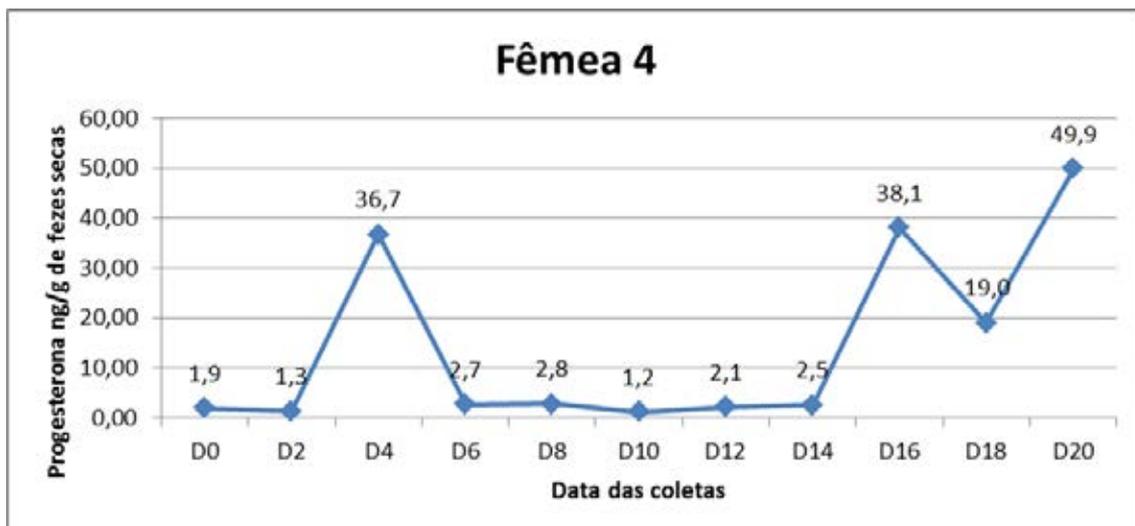


Figura 7. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 4, durante o intervalo de 20 dias.

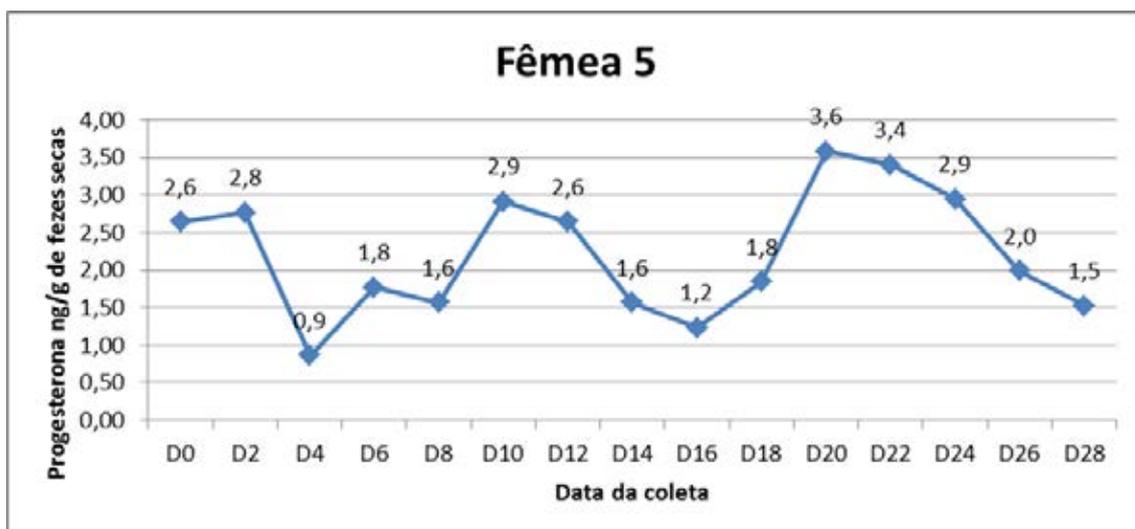


Figura 8. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 5, durante o intervalo de 28 dias.

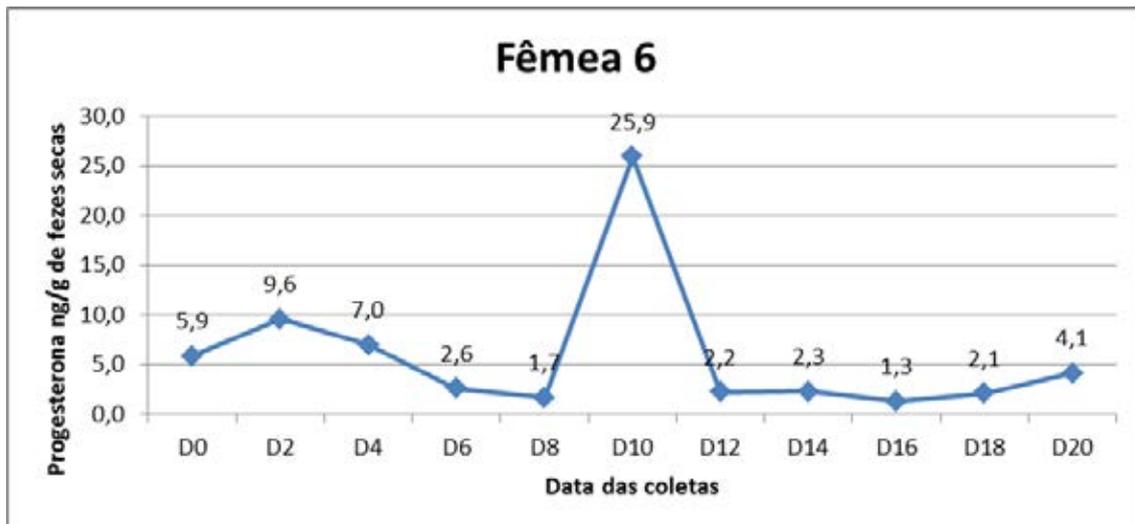


Figura 9. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 6, durante o intervalo de 20 dias.

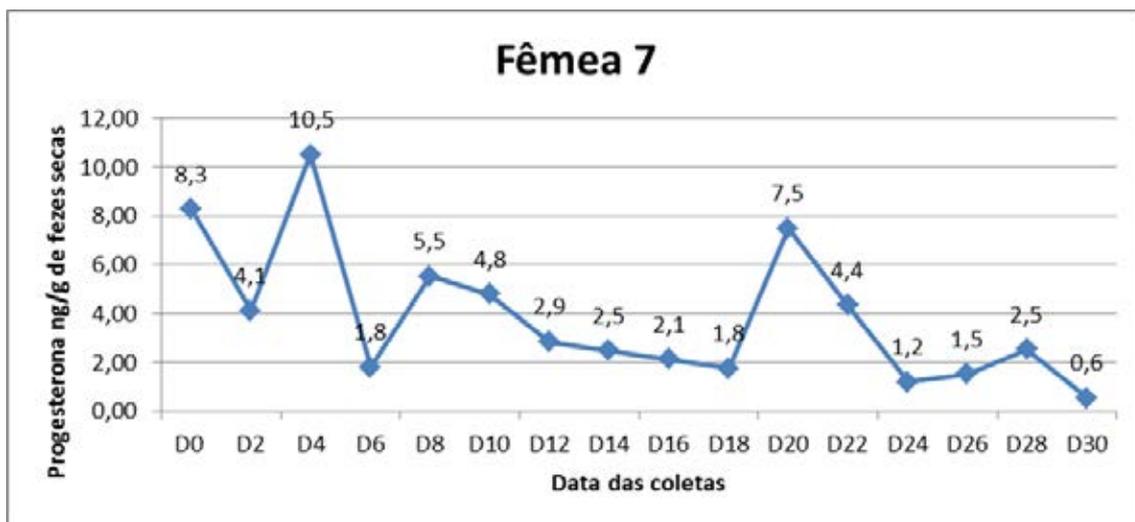


Figura 10. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 7, durante o intervalo de 30 dias.

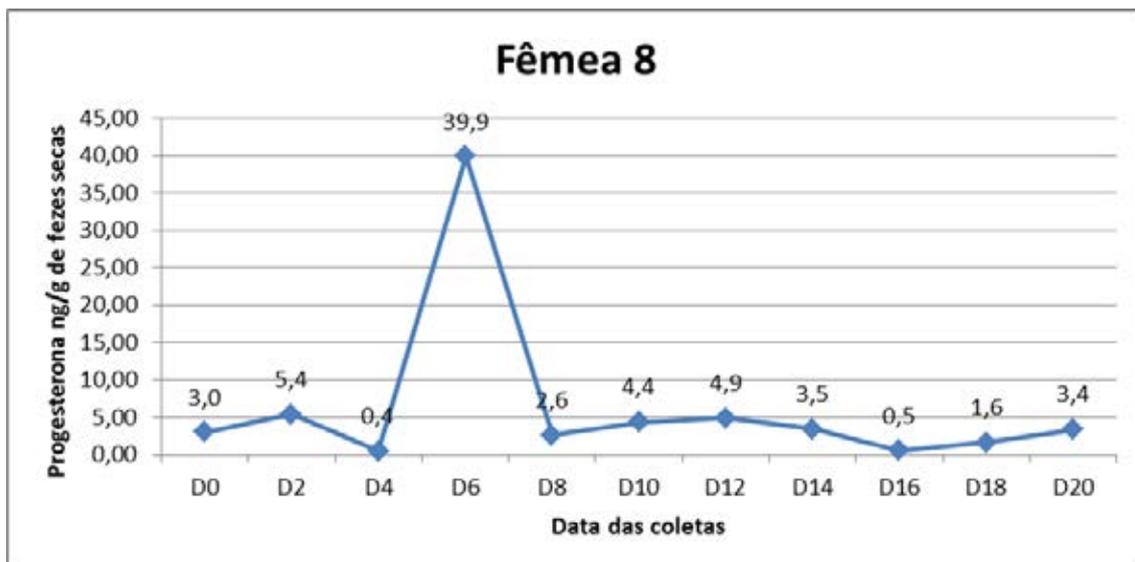


Figura 11. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 8, durante o intervalo de 20 dias.

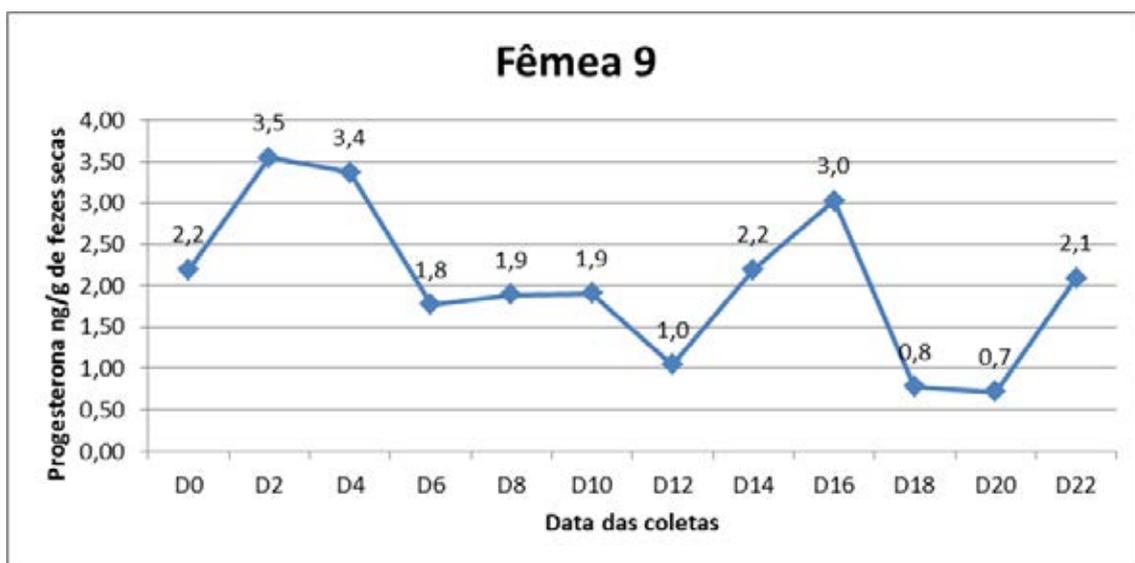


Figura 12. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 9, durante o intervalo de 22 dias.

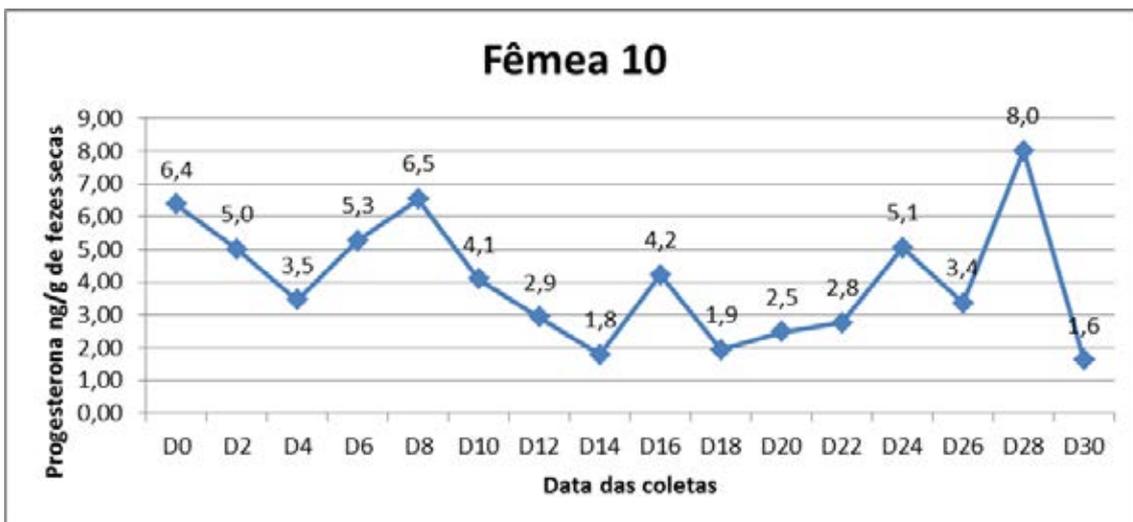


Figura 13. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 10, durante o intervalo de 30 dias.

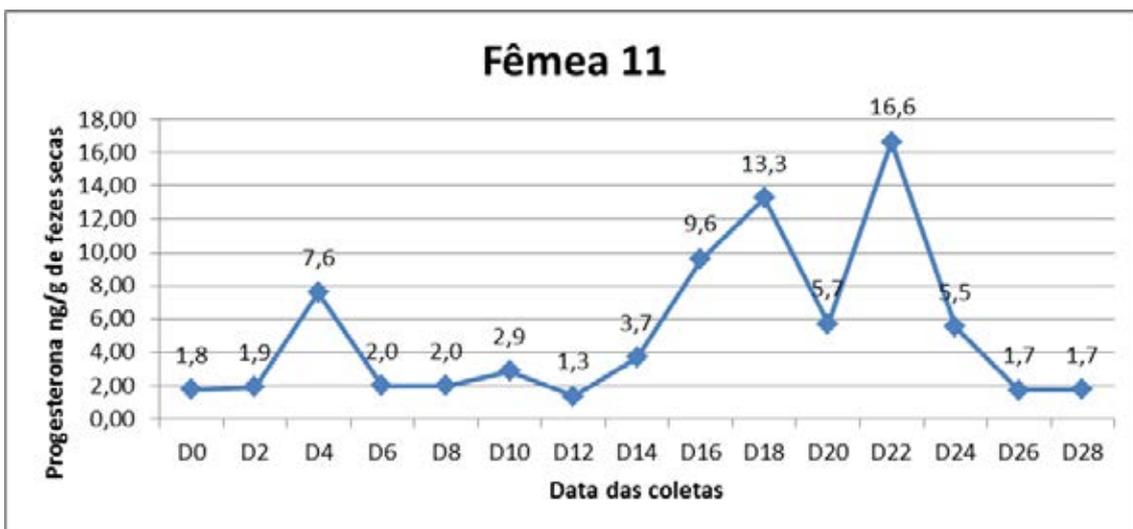


Figura 14. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 11, durante o intervalo de 28 dias.

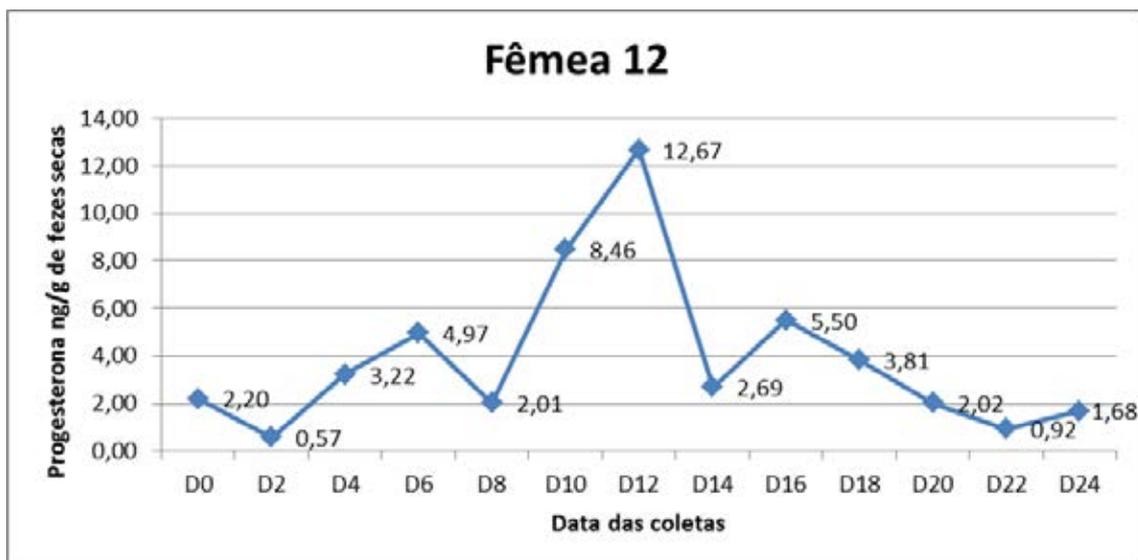


Figura 15. Gráfico linear dos níveis de metabólitos de progesterona identificados em fezes secas (ng/g) na fêmea 12, durante o intervalo de 24 dias.

Contudo, ao normalizarmos o D0 como o dia da ovulação e portanto o início da fase luteínica podemos observar que as concentrações de progesterona ao longo do tempo passam a se organizar de forma cíclica (Figura 16). Com isso, podemos sugerir um intervalo médio entre picos de $16,7 \pm 4,6$ dias, mesmo que os picos observados não sejam todos maiores que a média + 2 desvios padrões (8,3ng/g de fezes secas), o que corrobora com a média dos ciclos anteriormente citados. O pico que ultrapassa a média + 2 desvios padrões de metabólitos de progesterona, nesse caso, ocorreu por volta do D6 (8,6 ng/g de fezes secas).

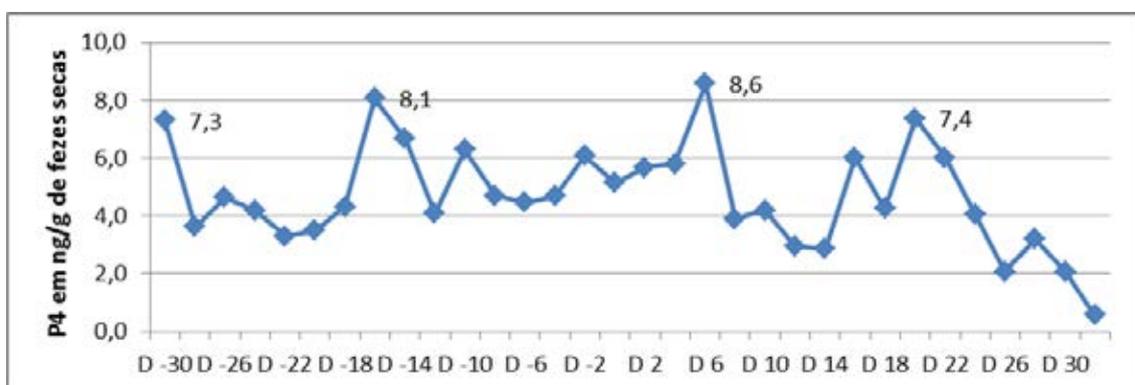


Figura 16: Gráfico linear das concentrações de metabólitos da progesterona ao longo do tempo em função das ovulações observadas ao exame ultrassonográfico.

Após análise somente dos dados hormonais, o D0 foi definido como o dia que as fêmeas apresentaram o pico de metabólitos de progesterona. O gráfico (Figura 17) demonstra o comportamento médio das concentrações de metabólitos de progesterona em função do tempo. O intervalo entre os picos demonstra um intervalo correspondente ao encontrado na análise ultrassonográfica (16 dias). Considerando ainda que os valores dos três picos, são muito próximos a média dos picos de todas as amostras ($36,6 \pm 8,6\text{ng/g}$) e que todos são maiores que a média + 2 desvios padrões de todas amostras de forma aleatória, ou seja, sem estarem organizadas em função do tempo, apenas como valores de progesterona ($19,6\text{ ng/g}$ de fezes secas).

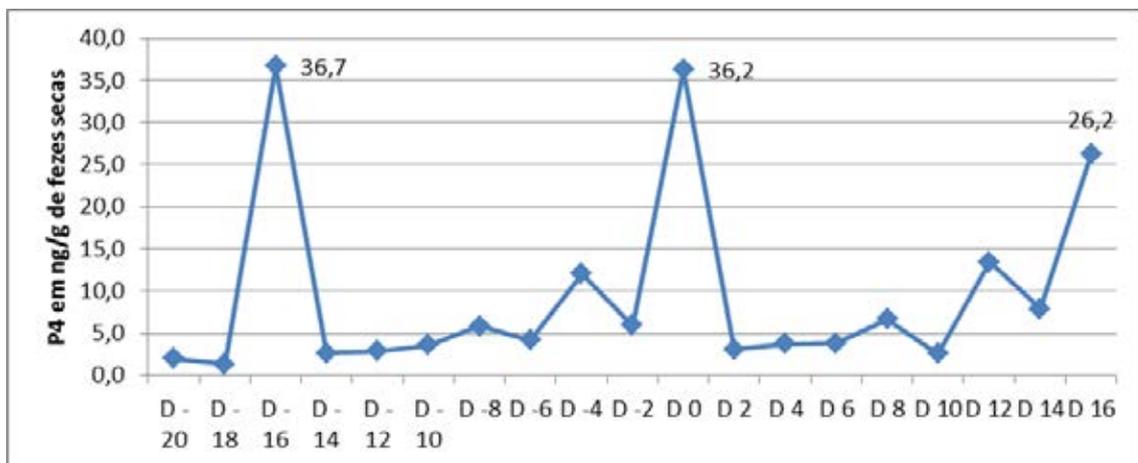


Tabela 17: Gráfico linear demonstrando o comportamento dos níveis hormonais em função somente dos níveis de progesterona.

Mesmo ao apresentar dados próximos ao encontrados na literatura quanto ao ciclo estral na espécie em estudo, o acompanhamento das amostras fecais quanto as concentrações de metabólitos de progesterona apenas sugerem a ocorrência de ciclicidade em função da atividade ovariana nessa espécie. Porém, por meio dessa definição inicial de concentrações de progesterona em fezes é possível utilizarmos a metodologia para ampliar o universo amostral e contribuir para a determinação de um ciclo regular nessa população que sirva como base para a espécie *Aotus azarai infulatus* e até mesmo para a determinação de concentrações e perfis hormonais de outras avaliações, tanto em machos, quanto em fêmeas.

6. CONCLUSÃO

A determinação do perfil de metabólitos de progesterona por EIE mostrou-se complexa e intangível por meio da técnica e da metodologia empregada, para o estudo do ciclo ovariano em macacos-da-noite em cativeiro. Os resultados apresentados sugerem apenas que o comportamento das amostras é fruto da variação das concentrações de metabólitos ao longo do tempo, e no intervalo entre picos hormonais, porém sem ainda descrever o ciclo em Aotus. O exame ultrassonográfico mostrou-se um exame auxiliar para as análises hormonais, sustentando a normalização dos dados de metabólitos de progesterona em fezes. Contudo mesmo havendo diferença entre os dados, mostrando variação em função do ciclo, é necessário um período mais extenso de estudo ao longo do tempo, para que se possa determinar o ciclo estral desta população da espécie mantida em cativeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLASHI, D. V.; CHOPRA, H. C.; AMSTRONG, G. R. A cytomegalovirus isolated from an owl monkey. **Laboratory Animal Science**, v. 22, n. 2, p. 190-195, 1972.

ALLMAN, J. M.; KAAS, J. H. A crescent-shaped cortical visual area surrounding the middle temporal area (MT) in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **Brain Research**, v. 81, n. 2, p. 199-213, 1974.

ALVES, F. R.; COSTA, F. B.; AROUCHE, M. M. S.; BARROS, A. C. E.; MIGLINO, M. A.; VULCANO, L. C.; GUERRA, P. C. Avaliação ultra-sonográfica do sistema urinário, fígado e útero do macaco-prego, *Cebus apela*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 9, p. 377-382, 2007.

ASHER, L. V. S.; TIMOTHY, L. N. B.; MENSING, L.; MARCHWICKI, R. H.; VASSELL, R. A.; YOUNG, G. D. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). **Journal of Medical Virology**, v. 47, n. 3, p. 260-268, 1995.

ASHLEY, M. V.; VAUGHN, J. L. Owl monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial cytochrome oxidase (COII) sequences. **International Journal of Primatology**, v. 16, n. 5, p. 793-806, 1995.

AYRES, J. M.; DEUTSCH, L. A. **Os macacos da região amazônica**. Geográfica Universal, p. 71-82, 1982.

BARAHONA, H. H.; MELENDEZ, L. V.; HUNT, R. D.; DANIEL, M. D. The owl monkey (*Aotus trivirgatus*) as an animal model for viral diseases and oncologic studies. **Laboratory Animal Science**, v. 26, n. 6.2, p. 1104-1112, 1976.

BERTAN C.M.; BINELI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.43, p.824-840, 2006.

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

BONNEY, R. C.; SETCHELL, K. D. R. The excretion of gonadal steroids during reproductive cycle of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 12, p. 417-421, 1980.

BONNEY, R. C.; DIXSON, A. F.; FLEMING, D. Cyclic changes in the circulating and urinary levels of ovarian steroids in adult owl monkey. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 271-280, 1979.

BRASIL, A.F. **Avaliação histológica da população de folículos pré-antrais ovarianos e da taxa de atresia folicular em fêmeas de diferentes espécies e posições hierárquicas de *Leontopithecus* (CALLITRICHIDAE –**

PRIMATES) mantidas em cativeiro. 2008. 101f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

BRONSON, F. H. Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. **Reproduction Nutrition Development**, v. 28, n. 2B, p. 335-347, 1988.

CAROSI, M.; HEISTERMANN, M.; VISALBERGHI, E. Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progesterone levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys. **Hormones and behavior**, v. 36, n. 3, p. 252-265, 1999.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS M. C.; CERRI G. G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.38, n. 3, p.872-879, 2008.

CERDA-MOLINA, A. L.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; PÁEZ-PONCE, D. L.; ROJAS-MAYA, S.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. Seasonal variations of fecal progesterone and 17 β -estradiol in captive female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1985-1993, 2006.

COUTINHO, L N; MONTEIRO, F. O. B.; TAKESHITA, R. S. C.; LINS E LINS, F. L. M.; SILVA, G. A.; FATURI, C; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; KUGELMEIER, T.; WHITEMAN, C. W.; VICENTE, W. R. R Effect of age and number of parturitions on uterine and ovarian variables in owl monkeys, **Journal of Medical Primatology**, 40:310-316, 2011.

COUTINHO, L. N. BRITO, M. B. S.; MONTEIRO, F. O. B.; ANDRADE, R. S.; CONCEIÇÃO, M. E. B.; FELICIANO, M. R.; VICENTE, W. R. R. Analysis of follicular events in owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*) using B-mode and Doppler ultrasound. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 99-103, 2013.

DEFLER, T. R.; BUENO, M. L. *Aotus* Diversity and the Species Problem. **Primate Conservation**, v. 22, n. 1, p. 55-70, 2007.

DIAS, E. A. **Avaliação do perfil de progesterinas e metabólitos de glicocorticoides em fezes de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) submetidas ao desafio com ACTH.** 2006. Tese (Doutorado em Reprodução animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DIXSON, A. F. Reproductive Biology of the owl monkey. In: BAER, J. F.; WELLER, R. E.; KAKAOMA, I. **Aotus: the owl monkey.** 1 ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 113-132.

DOMINGUES, S. F. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; MARTINS, N. D.; CARVALHO, R. A. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1251-1259, 2007.

ESPINOSA, B. J.; WEAVER, S. C.; PAESSLER, S.; BRINING, D.; SALAZAR, M.; KOCHER, T. Susceptibility of the *Aotus nancymae* owl monkey to eastern equine encephalitis. **Vaccine**, v. 27, n. 11, p. 1729-1734, 2009.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; ROTUNDO, M.; RAMIREZ-LLORENS, P. Environmental determinants of birth seasonality in night monkeys (*Aotus azarae*) of the Argentinean Chaco. **International Journal of Primatology**, v. 23, n. 3, p. 639-656, 2002.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; DI FIORE, A.; CARRILLO-BILBAO, G. Behavior, ecology, and demography of *Aotus vociferans* in Yasuní National Park, Ecuador. **International Journal of Primatology**, v. 29, n. 2, p. 421-431, 2008.

FERNANDEZ-DUQUE, Eduardo et al. Hormonal monitoring of reproductive status in monogamous wild female owl monkeys (*Aotus azarae*) of the argentinean chaco. **Folia Primatologica**, v. 82, n. 3, p. 143-153, 2011.

FERNANDEZ-DUQUE, E. Owl monkeys *Aotus* spp in the wild and in captivity. **International Zoo Yearbook**, 46:80–94, 2012

FLOOD, J.T.; MUASHER, S.J.; SIMONETTI, S.; KREINER, D.; ACOSTA, A.A.; ROSENWAKS, Z. Comparison between laparoscopically and ultrasonographically guided transvaginal follicular aspiration methods in an in vitro fertilization program in the same patients using the same stimulation protocol. **Journal In Vitro Fertilization Embryo Transfer**, 6:180–185. 1989.

FORD, S. M. Taxonomy and distribution of the owl monkey. In: BAER, J. F.; WELLER, R. E.; KAKAOMA, I. **Aotus: the owl monkey**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 1-53.

FUJITA, S.; MITSUNAGA, F.; SUGIURA, H.; SHIMIZU, K. Measurement of urinary and fecal steroid metabolites during the ovarian cycle in captive and wild Japanese macaques, *Macaca fuscata*. **American journal of primatology**, v. 53, n. 4, p. 167-176, 2001.

FURTADO, P. V. **Perfil analítico de estrógenos e progesterinas em diferentes matrizes biológicas na espécie ovina (*Ovis aries*)**. 2007. 97f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

GOZALO, A.; MONTOYA, E. Reproduction of the owl monkey (*Aotus nancymai*) (primates: Cebidae) in captivity. **American Journal of Primatology**, v. 21, n. 1, p. 61-68, 1990.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progesterones in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Order primates (Primates) - Reproduction. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**, Iowa: Iowa State University Press, p. 274-278, 2001.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. Introdução à Endocrinologia. In: **Textbook of medical physiology**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J. K. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 1, p. 243-251, 1993.

HERSHKOVITZ, P. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (cebiidae: platyrrhini): a preliminary report on *Aotus* taxonomy. **American Journal of Primatology**, v. 4, n. 3, p. 209–243, 1983.

HERTIG, A. T.; BARTON, B. R.; MACKEY, J. J. The female genital tract of owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with special reference to the ovary. **Laboratory Animal Science**, v. 26, n. 6, p. 1041-1067, 1976.

HEUGTEN, K.D.A; HEUGTEN, E.V.; TIMMER, S. ET AL., Fecal and Salivary Cortisol Concentrations in Woolly (*Lagothrix ssp.*) and Spider Monkeys (*Ateles spp.*), **International Journal of Zoology**, 9 pages, 2009.

HOLBROOK, G. D.; CHAMBERS, C. M.; EVANS, S. Seasonal breeding in captive owl monkeys. *Folia Primatologica*, Basel, v. 75, n. 1, p. 275-276, 2004.

IUCN [International Union for Conservation of Nature]: The red list of threatened species. Disponível em: <http://www.iucn.org>. Acesso em: 01 Abril 2014.

JOHANNSSON, A. In **Principles and practice of immunoassay**. PRIDE C., NEWMAN, D. Macmillan: New York, 300p. 1991.

JORDÁN-VILLEGAS, A.; PERDOMO, A. B.; EPSTEIN, J. E.; LÓPEZ, J., CASTELLANOS, A.; MANZANO, M. R. ; HERNÁNDEZ, M. A.; SOTO, L.; MÉNDEZ, F.; RICHIE, T. L.; HOFFMAN, S. L.; ARÉVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S. Immune responses and protection of *Aotus* monkeys immunized with irradiated *Plasmodium vivax* sporozoites. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v 84, n. 2, p. 43-50, 2011.

JURKE, M.H.; PRYCE, C.R.; DÖBELI, M.; MARTIN, R.D. Non-invasive detection and monitoring of pregnancy and the postpartum period in goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) using urinary pregnanediol-3-glucuronide. **American Journal of Primatology**, 34:319-331. 1994.

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

KHIMJI, S. N.; DONATI, G. Are rainforest owl monkeys cathemeral? Diurnal activity of black-headed owl monkeys, *Aotus nigriceps*, at Manu Biosphere Reserve, Peru. **Primates**, v. 55, n. 1, p. 19-24, 2014.

KIM, Y.; KO, E.; LAPPAN, S.; KEZELE, A.; KWON, S.W.; CHOE, J.C. Changes in fecal estrogen levels and sexual behavior in captive sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) following a male replacement. **Zoo Biology**, 00:1-9 2012.

KUGELMEIER, T.; VALLE, R.R.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; MUNIZ, J.A.P.C.; MONTEIRO, F.O.B; OLIVEIRA, C.A. Tracking the Ovarian Cycle in Black-and-

Gold Howlers (*Alouatta caraya*) by Measuring Fecal Steroids and Observing Vaginal Bleeding. **International Journal Primatology**, 32:605–615, 2011.

LANGE, I. G.; HARTEL, A.; MEYER, H. D. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 83, n. 1, p. 219-226, 2002.

LASLEY B.L. & SAVAGE A. Advances in the understanding of primate reproductive endocrinology. In CAMPBELL, C. J.; FUENTES, A.; MACKINNON, K. C.; PANGER, M.; BEARDER, S. K. (Eds.), "**Primates in Perspective**". NY: Oxford University Press. p. 356-369, 2007.

LEDUC, J. W.; LEMON, S. M.; KEENAN, C. M.; GRAHAM, R. R.; MARCHWICKI, R. H.; BINN, L. N. Experimental infection of the new world owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 2, p. 766-772, 1983.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMOND, G. M. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção, incluindo as listas das espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte. 2005.

MAKRIS, A & RYAN, K J. Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone, and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. **Endocrinology**, v. 96, n. 3, p. 694-701, 1975.

MÁLAGA, C. A.; WELLER, R. E.; BUSCHBOM, R. L.; BAER, J. F.; KIMSEY, B. B. Reproduction of the owl monkey (*Aotus* spp.) in captivity. **Journal of Medical Primatology**, Malden, v. 26, n. 3, p. 147-152, 1997.

MARTIN, R.D. Reproductive characteristics of New World monkeys. **International Zoo Yearbook**, 46:95–108, 2012.

MATSUMURO, M.; TADASHI, S.; FUMIAKI, C.; YASUHIRO, Y.; TAKASHI, Y. A two-step extraction method to measure fecal hormones in female cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **American Journal of Primatology** 48:291–8. 1999.

MAVES, R. C.; ORÉ, R. M. C.; PORTER, K. R.; KOCHÉL, T. J. Immunogenicity and protective efficacy of a psoralen-inactivated dengue-1 virus vaccine candidate in *Aotus nancymaae* monkeys. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2691-2696, 2011.

MENEZES, A. N.; BONVICINO, C. R.; SEUÁNEZ, H. N. Identification, classification and evolution of owl monkeys (*Aotus*, Illiger 1811). **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 248, 2010.

MONTEIRO, F. O. B.; KOIVISTO, M. B.; VICENTE, W. R.; AMORIM C. R.; WHITEMAN, C.W.; CASTRO, P. H.; MAIA, C. E. Uterine evaluation and gestation diagnosis in owl monkey (*Aotus azarai infulatus*) using the B mode ultrasound. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, n. 3, p. 123-30, 2006.

MONTEIRO, F. O. B.; COUTINHO, L. N.; POMPEU, E. S. S.; CASTRO, P. H.; MAIA, C. E.; PEREIRA W. L. A.; VICENTE, W. R. R. Ovarian and uterine ultrasonography in *Aotus azarai infulatus*. **International Journal of Primatology**.30:327–336, 2009.

MONTEIRO F. O. B.; COUTINHO L. N; SILVA G. A; CASTRO P. H. G; MAIA C. E; SILVA K. S. M; VICENTE W. R. R. Ultrasound evaluation of pregnancy in owl monkey (*Aotus azarai infulatus*). **Animal Reproduction**, 8:40-46, 2011a.

MONTEIRO, F. O. B.; COUTINHO, L. N.; TAKESHITA, R. S. C.; SILVA, G. A.; SILVA, K. S. M.; WHITEMAN, C. W.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; VICENTE, W. R. R. A protocol for gynecological and obstetric examination of owl monkeys using ultrasound. **Revista de Ciências Agrárias**, 54:5-11, 2011b.

MONTEIRO, F. O. B; KUGELMEIER, T.; VALLE, R. D. R.; LIMA, A. B. F.; SILVA, F. E.; MARTINS, S.; VIAU, P. Evaluation of the fecal steroid concentrations in *Alouatta belzebul* (Primates, Atelidae) in the National Forest of Tapirape-Aquiri in Pará, Brazil. **Journal of medical primatology**, v. 42, n. 6, p. 325-332, 2013.

OERKE, A. K.; HEISTERMANN, M.; KÜDERLING, I.; MARTIN, R. D.; HODGES, J. K. Monitoring reproduction in callitrichidae by means of ultrasonography. **Evolutionary Anthropology**, v.1, n. S1, p. 183-185, 2002.

OERKE, A. K.; EINSPANIER, A.; HODGES, J. K. Noninvasive monitoring of follicle development, ovulation, and corpus luteum formation in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by ultrasonography. **American Journal of Primatology**, v. 39, n. 2, p. 99-113, 1996.

ORTIZ, R. E.; ORTIZ, A. C.; GAJARDO, G.; ZEPEDA, A. J.; PARRAGUEZ, V. H.; ORTIZ, M. E; CROXATTO, H. B. Cytologic, hormonal, and ultrasonographic correlates of the menstrual cycle of the New World monkey *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v. 66, n. 3, p. 233-244, 2005.

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

PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75-80, 2005.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W. E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H. N.; HORVATH, J. E., et al. A molecular phylogeny of living primates. **PL o S Genetics**, v. 7, n. 3, 2011.

PIECZARKA, J. C.; BARROS, R. M. S; FARIA F. M.; NAGAMACHI, C. Y. *Aotus* from the southwestern Amazon region is geographically and chromosomally intermediate between *A. azarae boliviensis* and *A. Infulatus*. **Primates**, v. 34, n. 2, p. 197-204, 1993.

PLAUTZ, H. L.; GONÇALVES, E. C.; FERRARI, S. F.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A. Evolutionary inferences on the diversity of the genus *Aotus* (Platyrrhini, Cebidae) from mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 382–387, 2009.

ROJAS-CARABALLO, J.; MONGUI, A.; GIRALDO, M. A.; DELGADO, G.; GRANADOS D.; MILLAN-CORTES, D.; MARTINEZ, P.; PATARROYO, M. A. Immunogenicity and protection-inducing ability of recombinant Plasmodium vivax rhoptry-associated protein 2 in Aotus monkeys: A potential vaccine candidate. **Vaccine**, v. 27, n. 21, p. 2870-2876, 2009.

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

RODRIGUEZ, N. A.; SI, W.; EMMI, A. M.; LAYMAN, L. C. e EROGLU, A. Retrieval of Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Oocytes by Ultrasound-Guided Needle Aspiration: Problems and Solutions. **Molecular Reproduction & Development**, 76:890–896. 2009.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA, J. S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**, v. 46, n. 1, p. 11-24, 2012.

SÁNCHEZ, N.; GÁLVEZ H., MONTOYA, E.; GOZALO, A. mortalidad en crías de Aotus sp. (primates: cebidae) en cautiverio: una limitante para estudios biomédicos con modelos animales. **Revista Peruana de Medicina Experimental e Salud Publica**, v. 23, n. 3, p. 221, 2006.

SANTOLAYA-FORGAS, J.; WOLF, R. C; KIM, J. Histological and biophysical studies of the 2 layers of the primate amnion prior to their fusion: their relationship with amniotic band syndrome. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 28, n. 4, p. 481, 2006.

SCHULER, A. M.; WESTBERRY, J. M.; PARKS, V. L.; KUEHL, T. J.; ABEE, C. R. Ultrasound-guided follicular aspiration in squirrel monkeys. **Journal of Medical Primatology**. 36:113–117. 2007.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; BAMBERG, E.; VON HEGEL, G. Monitoring of corpus luteum function by measuring progestagens in faeces of non-pregnant mares (*Equus caballus*) and Przewalski mares (*Equus przewalskii*). **Animal Reproduction Science**, v. 29, n. 3, p. 263-273, 1992

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

SEIFER, D. B.; COLLINS, R. L.; PAUSHTER, D. M.; GEORGE, C. R.; QUIGLEY, M. M. Follicular aspiration: A comparison of an ultrasonic endovaginal transducer with fixed needle guide and other retrieval methods. **Fertility Sterility**, 49:462–467.1988.

SUMMERS, P.M.; WENNINK, C.J.; HODGES, J.K: Cloprostenol induced luteolysis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction Fertility**, 73:133–138. 1985.

SVENSSON, M. S.; SAMUDIO, R.; BEARDER, S. K.; NEKARIS, K. Density estimates of Panamanian owl monkeys (*Aotus zonalis*) in three habitat types. **American journal of primatology**, v. 72, n. 2, p. 187-192, 2010.

TAKESHITA, R. S. C.; MONTEIRO, F. O. B.; MIRANDA LINS E LINS, F. L.; SILVA, G. A.; FATURI, C.; COUTINHO, L. N.; MUNIZ, J. A. P. C. Hematological, hepatic, and renal evaluation in *Aotus azarai infulatus*. **Journal of medical primatology**, v. 40, n. 2, p. 104-110, 2011.

TCHIRIKOV, M.; EISERMANN, K.; RYBAKOWSKI, C.; SCHRÖDER, H. J. Doppler ultrasound evaluation of ductus venosus blood flow during acute hypoxemia in fetal lambs. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 11, n. 6, p. 426–431, 1998.

TICEHURST, J.; RHODES JR., L. L.; KRAWCZYNSKI, K.; ASHER, L. V. S.; ENGLER, W. F.; MENSING, T. L.; CAUDILL, J. D.; SJOGREN, M. H.; HOKE Jr., C. H.; LEDUC, J. W.; BRADLEY, D. W.; BINN, L. N. Infection of owl Monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 5, p. 835-845, 1992.

VERAS, M. M. **Aspectos morfológicos do aparelho reprodutor em bugios (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*): O modelo feminino**. 2004. 113f. Dissertação (Mestrado em Anatomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

WASSER, S.K.; RISLER, L.; WASSER, L.M. Use of techniques to extract steroid hormones from primate feces. **Primate reproduction**, v.14, p.194–195. 1986.

WASSER, S. K. MONFORT, S. L.; SOUTHERS, J.; WILDT, D. E. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 1, p. 213-220, 1994.

WHITTEN, P.L.; BROCKMAN, D.K.; STAVISKY, R.C. 1998. Recent advances in non-invasive techniques to monitor hormone–behavior interactions. **Yearbook of Physical Anthropology**, 41, 1–23.

WISEMAN, D.A.; SHORT, W.B.; PATTINSON, H.A.; TAYLOR, P.J.; NICHOLSON, S.F.; ELLIOTT, P.D.; FLEETHAM, J.A.; MORTIMER, S. T. Oocyte retrieval in an in vitro fertilization-embryo transfer program: Comparison of four methods. **Radiology** 173:99–102. 1989.

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

WOLOVICH, C.K.; EVANS, S; FRENCH, J.A. Dads do not pay for sex but do buy the milk: food sharing and reproduction in owl monkeys (*Aotus spp.*). **Animal behaviour**, 75:1155-1163, 2008.

ZIEGLER, T.E.; SCHEFFLER, G.; WITTNER, D.J.; SCHULTZ-DARKEN, N; SNOWDON, C.T.; ABBOTT, D.H. Metabolism of reproductive steroids during

the ovarian cycle in two species of Callithrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology of Reproduction**, 54:91-99, 1996.

ZIEGLER, T.E.; WITTNER, D.J. Fecal Steroid Research in the Field and Laboratory: Improved Methods for Storage, Transport, Processing, and Analysis. **American Journal of Primatology**, 67:159–174. 2005.

T
E
S
E

/

C
O
U
T
I
N
H
O

L.
N.

2
0
1
4