



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA  
AMAZÔNIA  
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**ANA KAROLYNA FERREIRA PEREIRA**

**METABÓLITOS FECAIS DE CORTISOL, ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM  
FÊMEAS DE SAUIM (*Saguinus ursulus*, Primate, Callitrichidae)**

**BELÉM**

**2020**

**ANA KAROLYNA FERREIRA PEREIRA**

**METABÓLITOS FECAIS DE CORTISOL, ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM  
FÊMEAS DE SAUIM (*Saguinus ursulus*, Primate, Callitrichidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para a obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Saúde e meio ambiente.

**Orientador:** Prof. Dr. Leandro N. Coutinho

**Co-orientadora:** Dra. Rafaela Sayuri C. Takeshita

**BELÉM**

**2020**

**ANA KAROLYNA FERREIRA PEREIRA**

**Metabólitos fecais de cortisol, estrógeno e progesterona em fêmeas de Sauim (*Saguinus ursulus*, Primate, Callitrichidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Nassar Coutinho

Co-orientadora: Dra. Rafaela Sayuri C. Takeshita

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Leandro Nassar Coutinho - Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Dra. Priscila Viau Furtado - 1º Examinador

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

---

Dr. Ramiro das Neves Dias Neto - 2º Examinador

CENTRO NACIONAL DE PRIMATAS - CENP

---

Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro – 3º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Nassar Coutinho, pela orientação deste trabalho, pelo apoio e pela oportunidade de realizar este trabalho.

A Dra Rafaela Sayuri Takeshita, pela co-orientação pelas valiosas sugestões e ensinamentos na área da endocrinologia.

Ao Centro Nacional de Primatas - CENP pela oportunidade de desenvolver este estudo, em especial aos técnicos do serviço de ecologia e manejo de primatas - SEEMP, que são os atores co-adjuvantes, mas são a base fundamental para que as pesquisas possam ser realizadas. A Debora Rolim, Vaniza Sá, Sheila Makiana, Obadias Reis, Lorena Maniva, Vinicius Kenji, Carla Saboia, Dojean Froes e Rafael Furtado que auxiliaram e contribuíram de alguma forma para que o projeto fosse realizado.

Aos técnicos do laboratório do CENP, Keila Albuquerque e Cledja Nascimento que não mediram esforços para que o trabalho fosse realizado, em especial a técnica Karol Guimarães e a estagiária Cris, pela amizade e aprendizados.

A Potira Silva, pelo carinho, amizade e incentivos. Obrigada minha amiga sei que posso contar com você.

A Gessiane Pereira, pelo apoio em todos os momentos e enorme força na reta final deste trabalho. Obrigada minha irmãzinha e, prometo não atrasar seu doutorado.

A Paola Cardias, pela amizade, por nossas conversas, risadas, pela ajuda indispensável nas aulas de inglês. Minha versão feminina do Thiago, meus biólogos favoritos.

Ao meu melhor amigo, meu marido, Thiago Barbosa, que sempre me incentivou. Obrigada pelo apoio nas horas difíceis, que me fez acreditar que posso ser capaz, pelas críticas construtivas ao trabalho. Não sei o que seria sem seu carinho, atenção e dedicação. Te amo!

A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia, em especial ao Jayme, pela contribuição e apoio fundamentais durante todo o mestrado.

E aos atores principais dessa pesquisa, aos Primatas não-humanos.

## RESUMO

Os estudos ligados à área da reprodução de primatas não humanos são fundamentais para a manutenção da biodiversidade e para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. O Sauim (*Saguinus ursulus*) é um primata neotropical que pode estar vulnerável devido à grande perda de habitat e pressão antrópica em sua área de abrangência geográfica, pouco se sabe sobre a reprodução desses primatas em cativeiro, provavelmente devido ao fato de que as informações sobre sua fisiologia reprodutiva são extremamente limitadas. Por isso, são necessários aprimorar o manejo reprodutivo e aumentar a reprodução em cativeiro dessa espécie. Utilizamos essa abordagem para fornecer os primeiros dados sobre a sub-infertilidade com base nas informações endócrinas dessa espécie em cativeiro. Coletamos amostras fecais de fêmeas de sauim durante trinta dias consecutivos, totalizando 161 amostras. Os resultados deste estudo fornecem uma caracterização da endocrinologia reprodutiva e confirmam que o monitoramento do hormônio fecal é uma maneira eficaz de monitorar fêmeas para determinar possíveis falhas reprodutivas. Apesar do pequeno tamanho da amostra, o estudo demonstra a validade geral das medições do metabólito fecal do hormônio sexual para monitoramento reprodutivo em sauim, portanto, os métodos descritos aqui podem ajudar a melhorar o manejo reprodutivo das espécies em cativeiro.

Palavras-chave: Endocrinologia, Ensaio imunoenzimático, Reprodução, Primatas.

## ABSTRACT

Studies related to the reproduction of non-human primates are essential for the maintenance of biodiversity and for the conservation of endangered species. Black-handed Tamarin (*Saguinus ursulus*) is a neotropical primate vulnerable due to great habitat loss and the anthropic pressure in its geographic distribution area. Little is known about the reproduction of these primates in captivity, probably due to the fact that information on its reproductive biology is extremely limited, Therefore, it is necessary to improve the reproductive management and increase the reproduction in captivity of this species. Here we validated the measurements of fecal metabolites of cortisol, estrogen and progesterone in order to characterize ovarian activity. We used this approach to provide the first data on the sub-infertility based on endocrine information from this species in captivity. We collected fecal samples from female Tamarins for thirty consecutive days, totalizing 161 samples. Our results provide a characterization of these monkey's reproductive endocrinology, and confirm that monitoring of fecal hormone is an effective way to monitor females to determine possible reproductive failures. Despite the small sample size, our study shows the general validity of measurements of the fecal metabolite of the sex hormone for reproductive monitoring in Tamarins. Thus, the methods described here can help improve the reproductive management of species in captivity.

**Keywords:** Endocrinology. Enzyme immunoassays. Reproduction. Primates.

## SUMÁRIO

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1. Aspectos gerais</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2. Aspectos comportamentais e reprodutivos</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3. Importância dos estudos de fisiologia reprodutiva por meio da dosagem hormonal não-invasiva</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.1. Objetivo geral</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.2. Objetivo específico</b> .....	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>13</b>
<b>2. ARTIGO: Metabólitos fecais de cortisol, estrógeno e progesterona em fêmeas de Sauim (<i>Saguinus ursulus</i>, Primate, Callitrichidae)</b> .....	<b>18</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>18</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Introdução</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Material e métodos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3. Resultados</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4. Discussão</b> .....	<b>29</b>
<b>Referências</b> .....	<b>32</b>

# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 Características gerais

Atualmente, aproximadamente 504 espécies de primatas não humanos (PNH) são descritas no mundo. Desse total, 60% estão ameaçadas de extinção (ESTRADA et al., 2017). O Brasil é o país mais rico no planeta em primatas, porém várias espécies estão ameaçadas. De 150 espécies e subespécies de primatas no Brasil, 35 foram listadas como ameaçadas em portaria 444/2014 do Ministério do Meio Ambiente de 17 de dezembro de 2014. A Amazônia é uma das regiões com maior diversidade de primatas no mundo, abrigando cerca de 20% de todos os táxons descritos do grupo (ICMBio, 2017).

Dentre os primatas neotropicais, o gênero *Saguinus* (HOFFMANSEGG, 1807), pertence à família Callitrichidae, umas das mais ricas em espécies, sendo 12 destas reconhecidas e distribuídas pela Amazônia, nas florestas tropicais do sul da América Central e do Norte da América do Sul (RYLANDS; MITTERMEIER, 2013). *Saguinus ursulus* é conhecido popularmente como “sauim”. Por um longo período as espécies *S. niger*, *S. midas* e *S. ursulus* apresentaram incertezas taxonômicas. VALINOTO et al., 2006 sugeriu, por meio de análise molecular, que estas espécies eram táxons geograficamente distintos. Posteriormente, GREGORIN; VIVO, 2013 analisaram o gênero de acordo com a sua ocorrência, morfometria e pelagem. A comparação entre *S. niger* e *S. midas* possibilitou uma diferenciação entre elas, reavaliando, assim, o surgimento do *Saguinus ursulus*.

Anteriormente, *S. ursulus* era classificada como *S. niger*, sendo considerada vulnerável pelo ICMBio e pela IUCN (RYLAND et. al., 2008). O táxon ocorre no interflúvio Araguaia-Tocantins e Xingu (GARBINO et. al., 2015). Após a divisão, é possível que o status de conservação de *S. ursulus* tenha se agravado, uma vez que a espécie tem, em relação a *S. niger*, menor abrangência geográfica e está inserida na a área de endemismo Belém, a região mais desmatada da Amazônia Oriental (SILVA et al., 2005). Esses primatas habitam no sul do rio Amazonas, a partir da na margem leste do rio Tocantins, no estado do Pará, até os limites da floresta amazônica com os biomas do cerrado e da caatinga no estado do Maranhão. (GREGORIN; VIVO, 2013) (Figura 1).

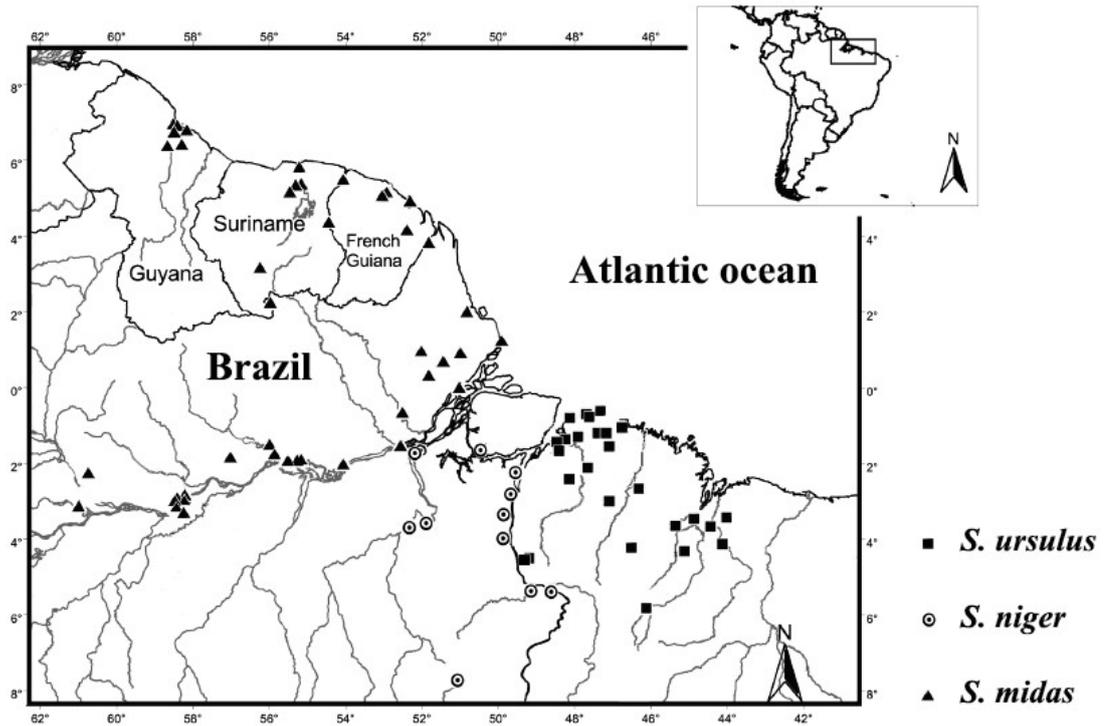


Figura 1: Área de distribuição geográfica das espécies *Saguinus ursulus* (região norte do estado do Pará, Leste do rio Tocantins), *S. niger* (estado do Pará, Oeste do rio Tocantins) e *S. midas*, estendendo-se pelo Oeste do estado do Pará, Leste do Amapá, e na Guiana Francesa, Suriname e Guiana. Fonte: Modificado de GREGORIN; VIVO, 2013.

Em *S. ursulus*, a pelagem é uma característica marcante, que o diferencia dos outros indivíduos do gênero. Essa espécie pode ser facilmente distinguida de *S. niger* por possuir pelo com aspecto estriado, que se estende desde a região escapular até a base da cauda (em *S. niger*, os pelos são distribuídos a partir do dorso médio, da região subescapular e geralmente se estendendo para a região lombar, coxas e porções do joelho, mas raramente atinge a base da cauda). No dorso, *S. ursulus* apresenta linhas estriadas douradas brilhantes, que são escuras e opaca em *S. niger*, e na parte dorsal e lateral da cabeça observa-se pelos longos e desalinhados (esses pelo são homogeneamente paralelos e posteriores em *S. niger*). Por fim, o rosto, as mãos e os dedos não têm pelos notáveis em *S. ursulus* (*S. niger* apresenta pelos) (Figura 2).

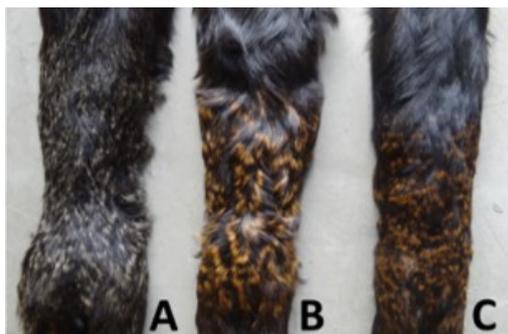


Figura 2: Padrão diferencial de pelagem para espécies do gênero *Saguinus* evidenciado na região dorsal de *S. midas* (A); *S. ursulus* (B) e *S. niger* (C). Fonte: GREGORIN; VIVO, 2013.

## 1.2 Aspectos comportamentais e reprodutivos

Os saguis são onívoros/insetívoros, alimentando-se de grande variedade de matéria vegetal (exsudatos, sementes, flores e frutos) e insetos (SILVA; FERRARI, 2007). Eles formam grupos de 2 a 15 indivíduos, com predominância de uma fêmea reprodutora, podendo, raramente, existir duas (AURICCHIO, 1995; LOTTKER et al., 2004). A presença de uma fêmea dominante geralmente inibe a ovulação das demais (FRENCH 1997; BEEHNER; LU, 2013). São monogâmicos, porém, em vida livre, há relatos de sistemas poliândricos com dois ou mais machos ativos para uma fêmea reprodutora (DIGBY; FERRARI, 1994.; RYLANDS, 1996; AURICCHIO, 2017).

A maturidade sexual dos *Saguinus* ocorre entre 16 e 20 meses de idade. A gestação e a duração do ciclo estral para a maioria do gênero variam de 140 a 195 dias e 21 dias, respectivamente, com um estro pós-parto ocorrendo até quatro semanas após o parto (Price, 1990). Geralmente, apresentam partos gemelares e o peso corporal dos filhotes ao nascer somam aproximadamente 21% do peso corporal da mãe (GOLDIZEN, 1990; SOUSA et al., 1999; AURICCHIO, 2017). Apesar disso, o seu desenvolvimento é bastante rápido, de forma que dois a três meses após o nascimento, os filhotes já estão completamente desmamados (AURICCHIO, 1995; ABBOTT et al., 2003).

## 1.3 Importância dos estudos de fisiologia reprodutiva por meio da dosagem hormonal não-invasiva

Os métodos tradicionais dos estudos endócrinos envolviam colheitas seriadas de sangue para a mensuração de hormônios. No entanto, o uso destas metodologias foi substituído por técnicas menos invasivas, que têm sido amplamente utilizadas, principalmente

para animais silvestres e PNH para reduzir ao máximo o estresse das colheitas (FRENCH et al., 1992; JURKE et al., 1994; PRYCE et al., 1994; ZIEGLER et al., 1989, 1993, 1990, 1996, 1997; MÖHLE et al., 2002; SHIMIZU et al., 2003). O método hormonal não-invasivo tem sido amplamente utilizado para estudar o comportamento animal (ARMSTRONG; SANTYMIRE, 2012), status reprodutivo (PEEL et al., 2005), posição social (TEICHROEB; SICOTTE, 2010), psicologia (CAROSI et al., 1999), estresse (KUMAR et al., 2014) e a presença de influências sazonais (STRIER et al., 1997; LYNCH et al., 2002).

As técnicas de enzimaímmunoensaio (EIE) são importantes instrumentos de análises capazes de mensurar pequenas doses hormonais presentes nas amostras. Atualmente, tais técnicas vêm sendo mais utilizadas devido à maior estabilidade e especificidade dos reagentes, ao uso de antígenos marcados com enzima e à ausência do perigo de radiações. Métodos de análise hormonais utilizando métodos não-invasivos, tais como fezes, urina, saliva e pelos são considerados bons indicadores para a avaliação do status reprodutivo e ovariano, pois possibilitam medir substratos endócrinos com níveis mínimos de estresse e invasividade (MUSTOE et al., 2012).

O interesse na endocrinologia reprodutiva de micos e saguis (Primates: Família Callitrichidae) tem aumentado nos últimos anos, estimulado por uma série de razões: a utilização dessas espécies em experimentos em pesquisa biomédicas, além de modelos para espécies ameaçadas de extinção em estudos de biologia da conservação. Há um crescente reconhecimento de que a manutenção de populações viáveis de calitrichídeos (por exemplo, *Saguinus oedipus*, *Leontopithecus rosalia*) possa ser possível somente por meio de programas de reprodução em cativeiro (FRENCH et al., 1996), mas pouco se sabe sobre a fisiologia básica dessas espécies.

Um problema persistente na pesquisa da reprodução de calitrichídeos é a falta de marcadores claros e confiáveis de ciclicidade ovariana em fêmeas. Como esses primatas exibem poucos, se houver, sinais claramente visíveis de status reprodutivo, a aplicação de métodos de monitoramento endócrino geralmente é necessária, pois estudos mostram que não há alterações na citologia vaginal em saguis comuns (*Callithrix jacchus*), o que não pode ser correlacionado com um possível estado sexual de uma fêmea (HEARN; LUNN, 1975). Além disso não há relato de sangramento menstrual nem alterações cíclicas nas regiões perineais (HAMPTON; LANDWEHR, 1996; BRAND, 1981) e as mudanças comportamentais ao longo do ciclo reprodutivo das fêmeas são muitos sutis não existindo sinais externos de estado reprodutivo (ZIEGLER et al., 1993; TARDIF et al., 2003).

Os *S. ursulus* requerem, além da descrição taxonômica, avaliação dos parâmetros físicos, comportamentais e fisiológicos, que possibilite a compreensão de padrões básicos para fornecer informações importantes sobre processos evolutivos e especializações ecológicas. Dada a incerteza e as ameaças que espécies possam estar enfrentando, a população reprodutora em cativeiro é um componente vital para determinar parâmetros endocrinológicos, e estabelecer critérios específicos para o conhecimento sobre a reprodução e bem-estar. Avaliar respostas fisiológicas por meio de técnicas não-invasivas é imprescindível para que haja entendimento mais assertivo visando o conhecimento sobre a saúde e a conservação dessas espécies (POGLIANI; BIRGEL JUNIOR, 2007; PEREIRA, 2015).

Nesse cenário, algumas medidas podem ser propostas como a utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução animal, tendo em vista não somente o desempenho reprodutivo em cativeiro, mas também a conservação da diversidade genética de animais ameaçados de extinção (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006). No entanto, trabalhos que visam a mensuração dos parâmetros endocrinológicos em animais silvestres, principalmente em PNH do Novo Mundo, são incompletos quanto a relações que influenciam a atividade reprodutiva (BEEHNER, 2017). Dessa forma, aprofundar e compreender particularidades fisiológicas são essenciais para a tomada eficiente para o manejo reprodutivo visando medidas conservacionistas.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Objetivo geral**

Realizar a validação biológica dos ensaios de cortisol e validação fisiológica dos ensaios de estrógeno e progesterona nos extratos de metabólito fecais de fêmeas de sauíim (*Saguinus ursullus*).

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Validar a técnica de extração e dosagem de metabólitos fecais de cortisol, estrógeno e progesterona para a espécie;
- Estimar as concentrações de pico e as taxas basais para os metabólitos estudados;
- Investigar se a espécie apresenta ciclicidade.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D.H.; Barnett, D. K.; Colman, R. J.; Yamamoto, M. E.; Schultz-Darken, N. J. **Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research.** American Association for Laboratory Animal Science. 2013.
- ALMEIDA, A.S., VIEIRA, I.C.G. **Centro de Endemismo Belém: Status da vegetação remanescente e desafios para a conservação da biodiversidade e restauração ecológica.** REU Sorocaba. 36 (3): 95-111. 2010.
- ARMSTRONG, D.M.; SANTYMIRE, R.M. **Hormonal and behavioral variation in pied tamarins housed in diferente management conditions.** Zoo Biol 32:299–306. 2012.
- AURICCHIO, P. **Introdução aos primatas.** Terra Brasilis Ed.,São Paulo. 2017.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil.** Terra Brasilis Ed.,São Paulo.1995.
- BEEHNER, J.C.; BERGMAN, T.J. **The next step for stress research in primates: To identify relationships between glucocorticoid secretion and fitness.** Horm. Behav. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.03.003>. 2017.
- BEEHNER, J.C.; LU, A. **Reproductive Suppression in Female Primates: A Review.** Evolutionary Anthropology 22:226–238. 2013.
- BRAND, H.M. **Urinary oestrogen excretion in the female cottontopped tamarmn (*Saguinus oedipus oedipus*).** J Reprod Fert 62: 467-73. 1981.
- CAROSI, M.; HEISTERMANN, M.; VISALBERGHI, E. **The display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progesterin levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys.** Horm Behav 36:252–265. 1999.
- DIGBY, L. J.; FERRARI, S. F. **Multiple breeding females in free-ranging groups of *Callithrix jacchus*.** International Journal of Primatology, New York, v. 15, n. 3, p. 389-397. 1994.
- DOMINGUES, S.F.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. **Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de primatas.** Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.57-71. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br). 2006
- ESTRADA, A.; GARBER, P. A.; RYLANDS, A. B.; ROOS, C. **Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter.** *Science Advance* 2017.
- FRENCH, J.A. DEGRAW, W.A.; HENDRICKS, S.E.; WEGNER, F.; BRISDON, W.E. **Urinary and plasma gonadotropin concentrations in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia rosalia*).** Am J Primatol, v.26, p.53-59. 1992.

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 tuftedear marmosets (*Callithrix kuhli*)**. American Journal of Primatology. V.40.p. 231-245. 1996.

FRENCH, J. A. **Proximate regulation of singular breeding in callitrichid primates**. In Solomon, N. G., and French, J. A.(eds.), Cooperative Breeding in Mammals, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 34–75.1997

GARBINO, G.S.T.; SEMEDO, T.B.F.; PANSONATO, A. **Notes on the western black-handed tamarin, *Saguinus niger* (É. Geoffroy, 1803) (PRIMATES) from an Amazonia-Cerrado ecotone in Central-Western Brazil: New data on its southern limits**. Mastozoología Neotropical, 22(2):311-318,2015.

GOLDIZEN, A. W. **A comparative perspective on the evolution of tamarin and marmoset social systems**. International Journal of Primatology, 11(1), 63–83. 1990.

GREGORIN, R.; VIVO, M. **Revalidation of *Saguinus Úrsula Hoffmannsegg* (Primates: Cebidae: Callitrichinae)**. Zootaxa, v.3721, n.2, p. 171-182, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3721.2.4>> Acesso em: 11 abr. 2018.

HAMPTON, J.K.; HAMPTON, S.H.; LANDWEHR, B.T. **Observations on a successful breeding colony of the marmoset, *Oedipomidas oedipus***. Foliaprimat. 4, 265287. 1966.

HEARN, J.P.; LUNN, S.F. **The reproductive biology of the marmoset monkey, *Callithrix jacchus***. In Breeding Simiansfor Developmental Biology (Lab. Anim. Handbook No. 6), pp. 191-202. Eds F. T. Perkins & P. N. O'Donoghue. Laboratory Animals Ltd, London. 1975.

INSTITUTO CHICO MENDES DE BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Ações para proteger primatas da Amazônia. 2017**. Disponível em: < <http://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/9134-acoes-de-conservacao-de-primatas-na-amazonia>. Acesso em 30 abr. 2018.

INSTITUTO CHICO MENDES DE BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Lista das espécies terrestres e mamíferos aquáticos ameaçados de extinção do Brasil**. Portaria MMA nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies>. 2014.

INSTITUTO CHICO MENDES de BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Fauna Brasileira**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

JURKE, M.H.; PRYCE, C.R.; DÖBELI, M.; MARTIN, R.D. **Non-invasive detection and monitoring of pregnancy and the post-partum period in Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) using urinary pregnanediol-3\_ glucuronide.** Am J Primatol, v.34, p.319-331. 1994.

KUMAR, V.; REDDY, V.P.; KOKKILIGADDA, A.; SHIVAJI, S.; UMAPATHY, G. **Non-invasive assessment of reproductive status and stress in captive Asian elephants in three south Indian zoos.** Gen Comp Endocrinol 201: 37– 44. 2014.

LOTTKER, P.; HUCK, M.; HEYMANN, E.W.; HEISTERMANN, M. **Endocrine correlates of reproductive status in breeding and nonbreeding wild female moustached tamarins.** Int J Primatol 25:919–937. 2004.

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

MUSTOE, A.C.; JENSEN, H.A.; FRENCH, J.A. **Describing Ovarian Cycles, Pregnancy Characteristics, and the Use of Contraception in Female White-Faced Marmosets, *Callithrix geoffroyi*.** Am. J. Primatol. 74:10441053. 2012.

PEREIRA, L. C. **Comparação entre técnicas de aferição da temperatura corpórea em micos-estrela cativos (*Callithrix penicillata*) e sua relação com parâmetros hematológicos, peso corporal e umidade e temperatura do ambiente.** Brasília, DF, 2015. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Brasília, DF, 2015.

PEEL, A.J.; VOGELNEST, L.; FINNIGAN, M.; GROSSFELDT, L.; O'BRIEN, J.K. **Non-invasive fecal hormone analysis and behavioral observations for monitoring stress responses in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*).** Zoo Biol, v.24, p.431-445. 2005.

POGLIANI, F. C.; BIRGEL JUNIOR, E. **Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 44, n. 5, p. 373-383, 2007.

PRYCE, C.R.; SCHWARZENBERGER, F.; DÖBELI, M. **Monitoring fecal samples for estrogen excretion across the ovarian cycle in Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*).** Zoo Biol, v.13, p.219-230. 1994.

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

- RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A. *Saguinus niger*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008, 2008.
- RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A. Family Callitrichidae (marmosets and tamarins). Pp. 262-347, in: Handbook of the mammals of the world. Vol. 3 (RA Mittermeier, AB Rylands, and DE Wilson, eds.). Lynx Edicions, Barcelona, 2013.
- SILVA, J.M.; RYLANDS, A.B.; FONSECA, G.A.B. O destino das áreas de endemismo na Amazônia. Megadiversidade, vol. 1, n 1, 124-131p, 2005.
- SILVA, S.S.B.; FERRARI, S.F. Notes on the reproduction, behaviour and diet of *saguinus niger* (primates: callitrichidae) in a forest remnant at the national primate centre, ananindeua, pará. Biol. Geral Exper., São Cristóvão, SE 7, n 1, p.19-28,2007.
- SHIMIZU, K.; DOUKE, C.; FUJITA, S.; MATSUZAWA, T.; TOMONAGA, M.; TANAKA, M.; MATSUBAYASHI, K.; HAYASHI, M. Urinary steroids, FSH and CG measurements for monitoring the ovarian cycle and pregnancy in the chimpanzee. J Med Primatol, v.32, p.15-22. 2003.
- SOUSA, M. B.C.; SILVA, H. P. A.; VIDAL, J. F. Litter Size Does Not Interfere with Fertility in Common Marmosets, *Callithrix jacchus*. Folia Primatologica, 70(1), 41–46. 1999.
- STRIER, K.B.; ZIEGLER, T.E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*). Am J Primatol, v.42, n.4, p.299-310. 1997.
- TARDIF, S.D.; SMUCNY, D.A.; ABBOTT, D.H.; MANSFIELD, K.; SCHULTZ-DARKEN, N.; YAMAMOTO, M.E. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). Comp Med 53:364– 368. 2003.
- TEICHROEB, J.A; SICOTTE, P. The function of male agonistic displays in ursine colobus monkeys (*Colobus vellerosus*): male competition, female mate choice or sexual coercion? Ethology 116:366–380. 2010.
- VALLINOTO, M.; ARARIPE, J.; REGO, P.S.; TAGLIATO, C.H.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Tocantins River as an effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. Genetics and Molecular Biology, 29, 215–219. 2006.
- ZIEGLER, T.E.; SHOLL, S.A.; SCHEFFLER, G.; HAGGERTY, M.A.; LASLEY, B.L. Excretion of estrone, estradiol and progesterone in the urine and feces of the female cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). Am J Primatol, v.17, p.185 195. 1989.

- ZIEGLER, T.E.; SNOWDON, C.T.; BRIDSON, W.E. **Reproductive performance and excretion of urinary estrogens and gonadotropins in the female pygmy marmoset (*Cebuella pygmaeu*)**. American Journal of Primatology 22:191-203. 1990.
- ZIEGLER, T.E.; EPPLE, G.; SNOWDON, C.T.; PORTER, T.A.; BELCHER, A.M.; KÜDERLING, I. **Detection of the chemical signals of ovulation in the cotton top tamarin, *Saguinus oedipus***. Anim. Behav. 45:313-322. 1993.
- ZIEGLER, T.E.; SCHEFFLER, G.; WITWER, D.J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C.T.; ABBOTT, D.H. **Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids**. Biol Reprod, v.54, p.91-99. 1996.
- ZIEGLER, T.E.; SANTOS, C.V.; PISSINATI, A.; STRIER, K.B. **Steroid excretion during the ovarian cycle in captive and wild miqui (*Brachyteles arachnoides*)**. Am J Primatol, v.42, p.311-321. 1997.

1 **2. ARTIGO: Metabólitos fecais de cortisol, estrógeno e progesterona em fêmeas de**  
2 **Sauim** (*Saguinus ursulus*, Primate, Callitrichidae)

3  
4 Ana K.F. Pereira<sup>a</sup>, Leandro N. Coutinho<sup>a</sup>, Rafaela S.C. Takeshita<sup>b</sup>

5 <sup>a</sup> Federal Rural University of the Amazon (UFRA), Postgraduate Program in Animal  
6 Health and Production in Amazonia (PPGSPAA), Belém, PA, Brazil.

7 <sup>b</sup> Department of Anthropology, Kent State University.  
8

9 Abstract

10 Studies related to the reproduction of non-human primates are essential for the  
11 maintenance of biodiversity and for the conservation of endangered species. Black-  
12 handed Tamarin (*Saguinus ursulus*) is a neotropical primate vulnerable due to great  
13 habitat loss and the anthropic pressure in its geographic distribution area. Little is  
14 known about the reproduction of these primates in captivity, probably due to the fact  
15 that information on its reproductive biology is extremely limited, Therefore, it is  
16 necessary to improve the reproductive management and increase the reproduction in  
17 captivity of this species. Here we validated the measurements of fecal metabolites of  
18 cortisol, estrogen and progesterone in order to characterize ovarian activity. We used  
19 this approach to provide the first data on the sub-infertility based on endocrine  
20 information from this species in captivity. We collected fecal samples from female  
21 Tamarins for thirty consecutive days, totalizing 161 samples. Our results provide a  
22 characterization of these monkey's reproductive endocrinology, and confirm that  
23 monitoring of fecal hormone is an effective way to monitor females to determine  
24 possible reproductive failures. Despite the small sample size, our study shows the  
25 general validity of measurements of the fecal metabolite of the sex hormone for  
26 reproductive monitoring in Tamarins. Thus, the methods described here can help  
27 improve the reproductive management of species in captivity.

28 **Keywords:** Endocrinology. Enzyme immunoassays. Reproduction. Primates.  
29  
30  
31  
32  
33

## 34 **2.1 Introdução**

35 O sauíim (*Saguinus ursulus*) é uma espécie de primata neotropical com  
36 distribuição do sul do rio Amazonas, a partir da na margem leste do rio Tocantins  
37 (Pará), até os limites da floresta amazônica com os biomas do cerrado e da caatinga no  
38 estado do Maranhão (Gregorin e Vivo, 2013). É um primata que ainda não apresenta  
39 avaliação quanto ao seu status reprodutivo segundo dados da Lista Vermelha da União  
40 Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). No entanto, devido sua  
41 abrangência geográfica está sobreposta com a região mais desmatada da Amazônia  
42 Oriental, a área de endemismo Belém, suas populações podem estar ameaçadas,  
43 principalmente pela fragmentação ou destruição do habitat (Almeida e Vieira, 2010;  
44 Estrada et al., 2017; Silva et al., 2005).

45 Estudos em cativeiro tornam-se essenciais por fornecerem dados relevantes para  
46 a compreensão da biologia básica, e estabelecer estratégias de melhoramento potencial  
47 em cativeiro da espécie. A influência sobre a característica reprodutiva de uma espécie  
48 em ambiente cativo tem sido motivo crescente de preocupação por parte dos  
49 pesquisadores com relação ao bem-estar animal, pois um ambiente com níveis elevados  
50 de estresse pode ter um efeito prejudicial na função reprodutiva da espécie.  
51 (Smith,2004).

52 Estudos com PNH em cativeiro, visando conhecer sua fisiologia endócrina,  
53 implicam em diversos fatores que podem influenciar o comportamento dos animais,  
54 assim como podem afetar a fertilidade devido ao estresse pela falta de adaptabilidade do  
55 animal ao ambiente. O desenvolvimento de métodos não invasivos para monitorar a  
56 atividade ovariana expandiu bastante a compreensão da endocrinologia reprodutiva  
57 sendo considerados bons indicadores para a avaliação do status reprodutivo e ovariano  
58 podendo ser eficazes para descrever traços biológicos básicos e determinar os fatores,  
59 que podem limitar o sucesso reprodutivo (Brown, 2006).

60 A medição de metabólitos fecais para a avaliação da função endócrina tornou-se  
61 um método extremamente útil em espécies selvagens, principalmente em espécie  
62 ameaçadas de extinção. Os metabólitos mais comuns nas fezes são de hormônios  
63 esteróides (estrogênios, andrógenos, progestogênios e corticosteróides) e qualquer  
64 evento biológico relacionado à flutuação do hormônio esteroide pode ser medido por  
65 amostragem fecal (Sobral et al., 2019). O sucesso de técnicas não-invasivas são  
66 fundamentais para um conhecimento detalhado acerca da biologia reprodutiva, da  
67 investigação de fatores que possam influenciar o sucesso reprodutivo e do

68 desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie. Diversos fatores podem  
69 influenciar o sucesso reprodutivo, e a investigação daqueles que afetam o potencial  
70 reprodutivo de fêmeas é importante para o entendimento da biologia reprodutiva da  
71 espécie. Tal conhecimento tem impacto direto sobre a abordagem de manejo, podendo  
72 ser decisivo na escolha de parceiros e na identificação de casos de sub-fertilidade que  
73 necessitem de intervenções reprodutivas. (Domingues, 2006).

74 Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a validação biológica dos  
75 ensaios de cortisol e validação fisiológica dos ensaios de estrógeno e progesterona nos  
76 extratos de metabólito fecais de fêmeas de sauim (*Saguinus ursullus*).

77

## 78 **2.2 Material e Métodos**

### 79 2.2.1 Animais e aspectos éticos

80 Para a realização do estudo foram avaliadas cinco fêmeas de sauim (*S. ursullus*)  
81 mantidas em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP/Ananindeua-PA, Brasil).  
82 Destas, três eram adultas (> de 5 anos) , uma sub-adulta (2-3 anos) e uma juvenil (1,5  
83 ano). Todas sem histórico de gestação. As fêmeas foram mantidas em gaiolas  
84 individuais adaptadas com uma tela fina de nylon (diâmetro de 0,30mm). Estas telas  
85 foram colocadas diariamente para as coletas, permitindo que as fezes fossem obtidas  
86 livres de contaminação por urina.

87 Os animais receberam alimentação conforme o manejo estabelecido pelo CENP,  
88 baseado em dieta balanceada à base de hortifrutigranjeiro, ração peletizada específica  
89 para primatas neotropicais da família callithichidae (MEGAZOO® P25, Betim, MG,  
90 Brasil) e suplementos vitamínicos, minerais e água *ad libitum*. O estudo foi aprovado  
91 pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas (protocolo  
92 CEUA/IEC nº 026/2018) e pelo Instituto Chico Mendes para a Biodiversidade  
93 Conservação do Brasil (SISBIO nº 63817/1).

94

### 95 2.2.2 Coleta de fezes

96 As coletas foram realizadas diariamente do dia 8 de abril a 16 de maio de 2019,  
97 entre 8:00 e 14:00 h. Foram coletadas 161 amostra de fezes, que foram acondicionadas  
98 em potes coletores devidamente identificados com os dados dos animais, data e hora de  
99 coleta. As fezes foram homogenizadas e levadas para congelamento em -20° C até  
100 serem processadas.

101

### 2.2.3 Processamento das amostras fecais para extração hormonal

As amostras foram liofilizadas, maceradas e pesadas. Uma balança de precisão foi utilizada para a obtenção de 0,1g de fezes. As extrações dos metabólitos fecais foram realizadas segundo o método sugerido pelo fornecedor dos kits diagnosticos Arbor Assay (Ann Arbor, MI, EUA). Para cada 0,1g de fezes foram adicionados 1 ml de etanol absoluto. Após a adição, estas amostras foram homogenizadas durante 30 minutos a 1000 rpm em multivortex (TS - 100 Thermo-Shaker, Biosan). Depois da homogenização, foi realizada a centrifugação durante 15 minutos com temperatura a 4°C e 5000 RPM (Centrífuga 5427 R, Eppendorf). Em seguida, o sobrenadante foi extraído, separado em microtubos e guardado a -80° C até o processo de dosagem hormonal.

Para a dosagem hormonal, os metabólitos fecais foram mensurados por enzimaímunoensaio (EIE) utilizando kits diagnósticos da Arbor Assay (Ann Arbor, MI, EUA) para cortisol (n° de catálogo K003-H5), estrógeno (n° de catálogo K030-H5) e progesterona (n° de catálogo K025-H5). A reatividade cruzada do anticorpo utilizado no kit de cortisol é de 100% para cortisol, 18,8% para dexametasona, 7,8% para prednisolona, 1,2% para corticosterona e cortisona e menos de 0,1% para progesterona. Para estrógeno é de 100% para 17β-estradiol, 0,78% para estrone, 0,22% para 17α-estradiol, 0,11% para 17α- ethynylestradiol e menos de 0,1% para estrone sulfato, progesterone, testosterone, 5α- dihydroprogesterone, cortisol e corticosterone. E a reatividade cruzada do anticorpo utilizado no kit de progesterona é de 100% para progesterone, 172% para 3β-hydroxy-progesterone, 188% para 3α-hydroxy-progesterone, 2,7% para 11β-hydroxy-progesterone, 147% para 11α-hydroxy-progesterone, 7% para 5α-dihydroprogesterone, 5,9% para Pregnenolone e menos de 0,1% para corticosterone e androsterenedione.

Os protocolos de extração foram baseados nas instruções dos produtos e as densidades ópticas foram lidas a 450 nm com um leitor de placas (Thermo Scientific™ Varioskan™). Os níveis de estrógeno, progesterona e cortisol foram calculados usando o software Microplate Manager v6 para ajuste de curvas logístico de quatro parâmetros.

### 2.2.4 Validação do ensaio

A validação dos kits hormonais para o uso de extrato fecais foi realizada pela diluição das amostras, seguidos do teste de paralelismo e precisão. Para isso foi

135 realizada a comparação entre a curva formada pelas concentrações das amostras com a  
136 curva padrão dos kits diagnósticos. Estes testes foram obtidos por meio de um “pool” de  
137 amostras fecais puro seguido de diluições sucessivas com uma solução tampão, já  
138 pronta, do kit diagnóstico.

139 Para a validação biológica do kit de cortisol, houve o monitoramento dos níveis  
140 deste hormônio durante um procedimento considerado estressante (a translocação de  
141 uma fêmea entre recintos). Para isso, amostras diárias foram coletadas a partir de 5 dias  
142 antes da translocação, para estabelecer os níveis basais, até 10 dias após as mudanças de  
143 recintos, para confirmar se o ensaio detectou o pico de cortisol devido à translocação. A  
144 validação fisiológica também foi estabelecida para validar os ensaios de progesterona e  
145 estrógeno. Essa validação ocorreu pela relação de dose-resposta entre a ativação da  
146 estimulação ovariana, por meio da administração de hormônio gonadotrofina coriônica  
147 equina (eCG), para a estimulação atividade biológica tanto de FSH (hormônio folículo-  
148 estimulante) quanto de LH (hormônio luteinizante). Para isso, foram coletadas amostras  
149 fecais diárias de uma fêmea cativa, a partir de 5 dias antes e até 10 dias após a  
150 administração exógena de 5µg/ animal (0,2mL do produto, na concentração de  
151 25µg/mL) de eCG (Folligon® 5000 UI, Lab MSD saúde animal)

152 Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, seguindo as recomendações do  
153 fornecedor. Sequencialmente, 50µl de cada amostra foram adicionados à placa de  
154 ensaio. Em seguida, 25µl do conjugado específico e 25µl do anticorpo específico para  
155 cada hormônio foram adicionados. Após esse processo, a placa foi incubada em  
156 agitador durante uma hora para o cortisol e duas horas para progesterona e estrógeno.  
157 Posteriormente a incubação, a placa foi lavada 4 vezes e 100µl de substrato de  
158 tetrametilbenzidina foram adicionados em cada poço da placa. Após outra incubação de  
159 trinta minutos, a reação foi finalizada com uma solução de parada e as amostras foram  
160 medidas no comprimento de onda de 450nm em uma leitora de placas automatizada  
161 (Thermo Scientific™ Varioskan™).

162 Para determinar o grau de paralelismo e de precisão para cada EIE, um “pool”  
163 de extrato fecal foi diluído serialmente e a curva da diluição foi comparada com as  
164 curvas do calibrador padrão. Para o teste de precisão foram analisados três “pools” de  
165 amostras testadas em duplicata. Cada pool foi mensurado individualmente, mas parte do  
166 “pool” foi adicionado a quantidades conhecidas de calibrador.

167 Os Coeficientes de Variação (CV) intra-ensaio foram calculados pela média  
168 total do coeficiente de variação de cada amostra, calculando a razão do desvio padrão

169 com a média das duplicatas. Para o CV inter-ensaio, calculou-se a razão do desvio  
170 padrão para a média dos controles nas diferentes placas de ensaio. Geralmente a  
171 variação entre ensaios é maior que a variação dentro do ensaio, mas o importante é que  
172 a concentração de hormônio tenha valores de resposta próximos, com um CV de no  
173 máximo 20% (Brown et al., 1994). Os níveis basais foram determinados como a média  
174 das concentrações obtidas. Concentrações superiores a 1,5 vezes ao desvio padrão  
175 foram consideradas como picos.

176

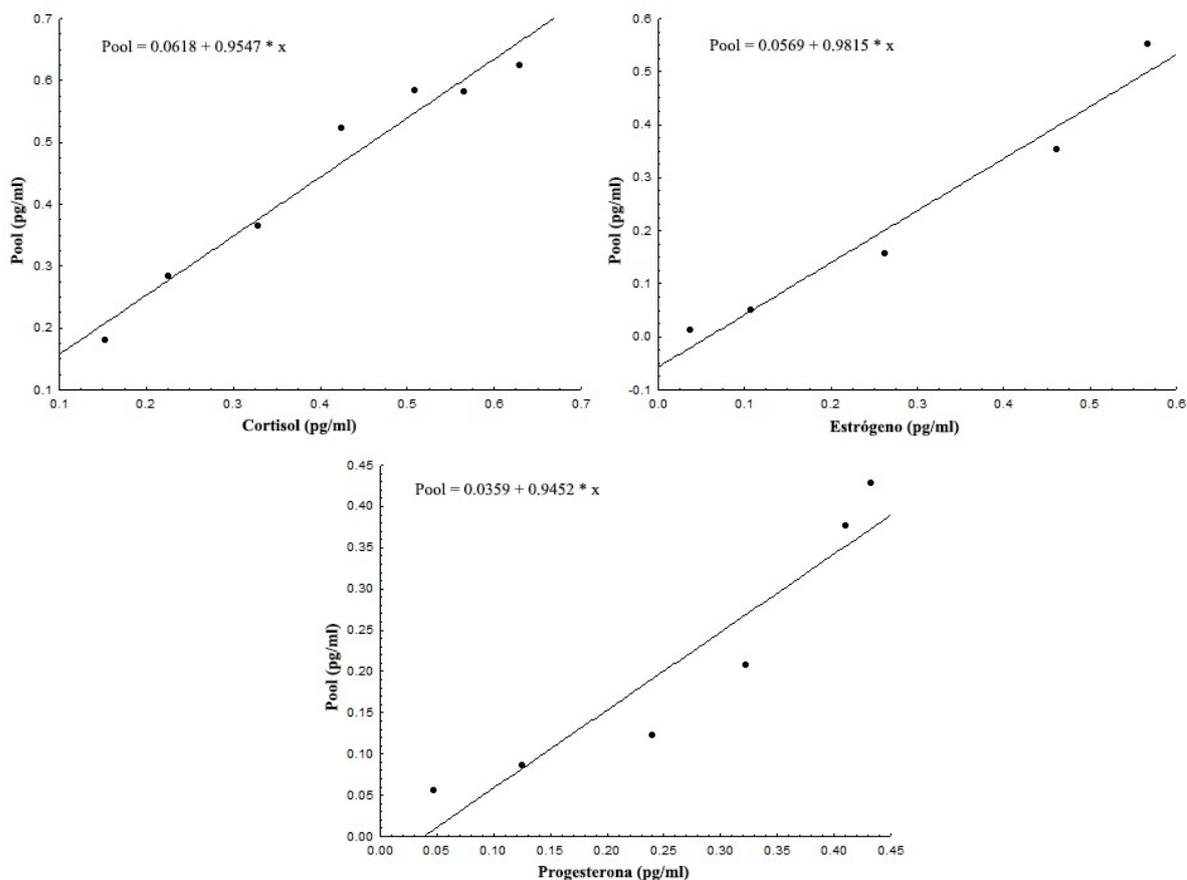
#### 177 2.2.5 Análise estatística

178 Os dados obtidos foram analisados por meio do programa Statistic 8.8. Para a  
179 descrição dos resultados, foram empregadas as médias e desvio padrão. Um teste de  
180 Pearson foi calculado para correlacionar os níveis hormonais de cortisol, estrógeno e  
181 progesterona com os metabólitos fecais. A validação dos kits foi realizada pela análise  
182 de regressão linear. Todos os testes obedeceram um nível de significância de 5%.

183

### 184 2.3 Resultados

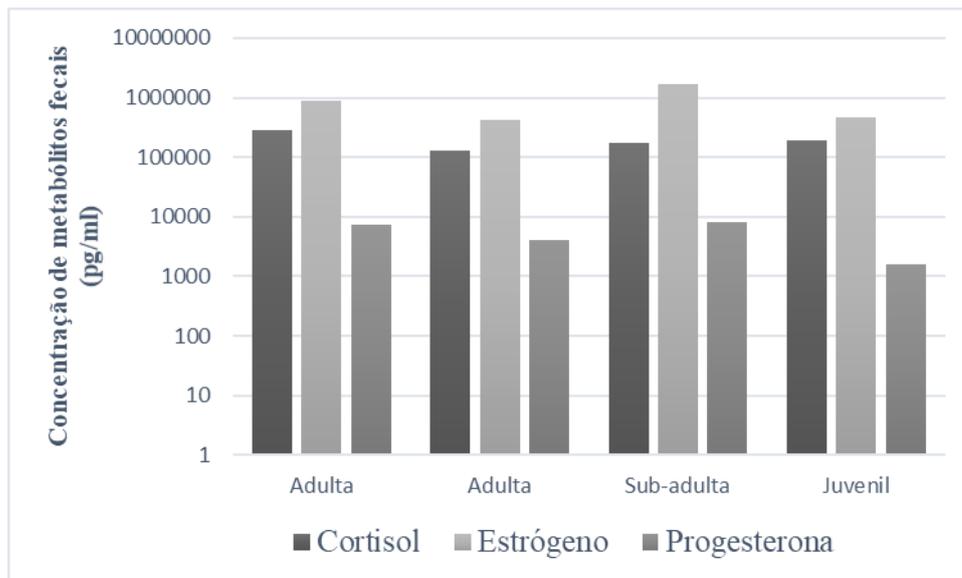
185 As diluições foram de 1:32; 1:128 e 1:5001 e os resultados mostraram-se  
186 lineares para a matriz fecal, aos ensaios para hormônios cortisol, estrógeno e  
187 progesterona, respectivamente, em todos os testes  $p < 0,0005$ . O paralelismo foi obtido  
188 entre a curva padrão de todos os três testes do ensaio hormonal e a curva de diluição da  
189 matriz estudada. Observou-se uma alta correlação entre as curvas do “pool” para  
190 cortisol ( $R^2 = 0.96$ ;  $p = 0.00011$ ; Figura 1 A); estrógeno ( $R^2 = 0.96$ ;  $p = 0.003014$ ;  
191 Figura 1 B); e progesterona ( $R^2 = 0.88$ ;  $p = 0.00544$ ; Figura 1 C).



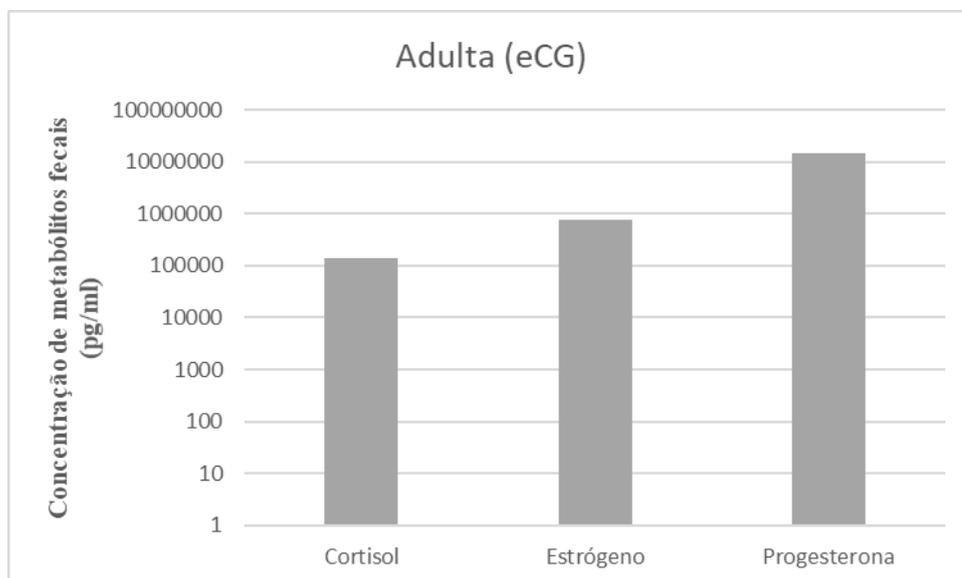
192 Figura 1. Análises de regressão linear das concentrações do “pool” de extratos fecais em  
 193 diluições sucessivas (1:32; 1:128 e 1:5001) para as dosagens de Cortisol (A), Estrógeno  
 194 (B) e Progesterona (C) em fêmeas de *Saguinus ursulus* criadas em cativeiro no Centro  
 195 Nacional de Primatas (CENP, Ananindeua, Pará, Brasil).  
 196

197 A precisão foi avaliada determinando a recuperação de quantidades conhecidas  
 198 dos hormônios com valores de recuperação de 116%; 107% e 92,8%, respectivamente.  
 199 Os valores para o Coeficiente de Variação (CV) para cortisol foram de 14% no intra-  
 200 ensaio e de 22% no inter-ensaio. Para o estrógeno, os CV foram de 9% no intra-ensaio e  
 201 20% no inter-ensaio. Já para progesterona esse valor intra-ensaio foi de 20% e inter-  
 202 ensaio de 7%.

203 Para o perfil hormonal da espécie, foram extraídas e dosadas 161 amostras fecais.



A



B

204

205

206 Figura 2: (A) Perfil das concentrações médias e desvio padrão de cortisol, estrógeno e  
 207 progesterona nas fêmeas de *Saguinus ursulus* sem aplicação de eCG; (B) Perfil das  
 208 concentrações médias e desvio padrão de cortisol, estrógeno e progesterona na fêmea de  
 209 *Saguinus ursulus* com a aplicação de eCG.

210

211

### 2.3.1 Cortisol

212

213

214

215

216

217

218

O teste de validação biológica demonstrou que houve resposta ao hormônio, pelo estresse ocasionado com a contenção animal e mudança de recinto, onde o pico do cortisol foi observado após três dias desse evento. Um segundo pico nos níveis de cortisol também foi observado provavelmente devido a uma higienização dos recintos localizados no local de estudo três dias antes do pico de cortisol demonstrado no gráfico (Figura 3A). A movimentação do animal para uma nova gaiola serviu como validação biológica produzindo aumento consistente no nível de cortisol, visível nas 48 horas

219 seguintes, com concentração máxima observadas dentro de 72 horas. As concentrações  
220 basais de cortisol fecal foram  $144,59 \pm 55,6$  pg/g de fezes (média  $\pm$  desvio padrão),  
221 variando de 85 a 695,7 pg/g de fezes.

222

### 223 2.3.2 Estrógeno e Progesterona

224 O teste para a validação fisiológica demonstrou que houve resposta nos hormônios  
225 ovarianos pela administração de eCG, com picos de estrógeno e progesterona  
226 evidenciados sete e seis dias, respectivamente, após a aplicação do eCG (Figura 3B e  
227 C). A partir da aplicação de eCG para a fêmea “desafio”, observou-se correlação  
228 negativa entre os níveis hormonais de estrógeno e progesterona.

229 A Figura 3 D, E e F mostram os perfis de excreção dos hormônios em três fêmeas  
230 adultas durante o período de coleta. Para os níveis hormonais das cinco fêmeas, foi  
231 observado que quatro delas não apresentaram atividades cíclicas ovarianas. Este fato foi  
232 evidenciado nos perfis basais dos metabólitos fecais de estrógeno e progesterona, nos  
233 quais foi possível perceber que os níveis de progesterona permaneceram muito abaixo  
234 dos níveis de estrógeno e cortisol.

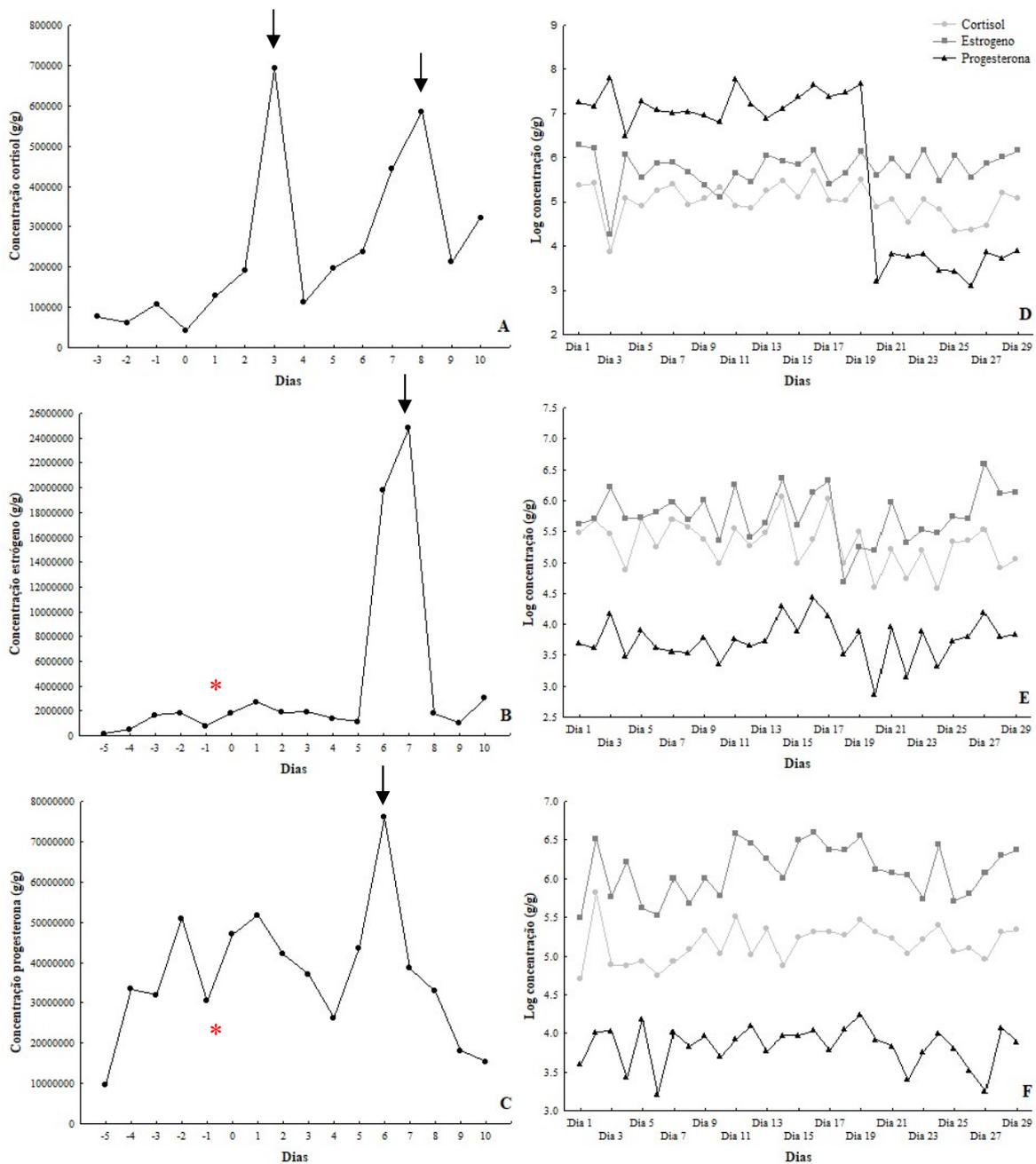
235 Como apenas uma fêmea apresentou possível atividade cíclica ovariana, sendo está  
236 a que recebeu aplicação de eCG. O perfil hormonal para esse animal, apresentou  
237 aumento para os hormônios em um primeiro momento, seguido de um declínio para  
238 concentração de estrógeno e aumento concomitante para as concentrações de  
239 progesterona, dando indícios de ocorrência de ciclicidade. Entretanto, aparentemente  
240 esse ciclo só se manteve durante um mês, com uma queda abrupta dos níveis de  
241 progesterona (Figura 3D). Para caracterização do ciclo ovariano foram utilizados os  
242 resultados das mensurações das concentrações dos metabólitos fecais de progesterona.  
243 O período estimado para a fase folicular e periovulatória foi o período considerado a  
244 partir do primeiro dia após a visualização do primeiro pico de progesterona depois da  
245 aplicação de eCG, compreendendo um período de  $7 \pm 1,07$  dias. A fase luteal  
246 compreendeu aos picos sequenciais sustentados de progesterona, o que ocorreu durante  
247 um período de  $9 \pm 0,57$  dias. O fim da fase lútea foi determinado com o retorno de dois  
248 ou mais valores sequenciais de concentrações aos níveis considerados basais, o que se  
249 deu com a abrupta queda de progesterona. Assim, o período para o ciclo do animal foi  
250 estimado em 16 dias. As concentrações basais de estrógeno foi de  $122,37 \pm 71,91$  pg/g  
251 (média  $\pm$  desvio padrão), variando de 29,9 a 201,9 pg/g de fezes. E progesterona foi de  
252  $4265,9 \pm 211,2$  pg/g variando de 1586,9 a 5568,4 pg/g de fezes. Durante a observação

253 de apenas um animal, que supostamente apresentou um ciclo, as concentrações de  
254 estrógeno aumentaram 9,8 vezes para  $294,5 \pm 74,9$  ng/g de fezes. Para progesterona,  
255 esse aumento foi de 4,09 vezes para  $7920,2 \pm 178,78$  pg/g de fezes.

256

### 257 2.3.3 Correlações entre as concentrações hormonais fecais

258 Houve correlação entre os metabólitos de cortisol e estrógeno ( $p < 0,05$ ) para três  
259 fêmeas, no entanto somente duas indicaram uma correlação forte, sendo uma adulta com  
260 correlação negativa e a outra sub-adulta com correlação positiva. Tanto as correlações  
261 entre cortisol e progesterona, quanto estrógeno e progesterona para algumas fêmeas  
262 foram significativos, no entanto o grau de correlação indicou uma relação fraca entre as  
263 análises.



264 Figura 3: Perfil hormonal em fêmeas de *Saguinus ursulus* criadas em cativeiro no  
 265 Centro Nacional de Primatas (CENP, Ananindeua, Pará, Brasil). (A) Níveis de  
 266 metabólitos de cortisol após o desafio biológico, evidenciando-se os picos causados pela  
 267 contenção manual e pela mudança de recinto (seta) e um segundo pico devido ao  
 268 estresse da higienização. (B) Desafio fisiológico estrógeno e (C) progesterona,  
 269 evidenciando-se os picos (seta) desses hormônios após 7 e 6 dias da aplicação do eCG,  
 270 respectivamente, (\*) aplicação eCG. (D) Perfil de excreção entre os níveis de cortisol,  
 271 estrógeno e progesterona identificados durante 29 dias de coleta de dados. (D: fêmea  
 272 adulta, com aplicação eCG); E: Fêmea adulta, sem eCG e F: fêmea sub-adulta, sem eCG.  
 273

274

275

276

## 277 2.4 Discussão

278

279 Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que ensaios específicos para a  
280 quantificação de metabólitos de cortisol, estrógeno e progesterona são uma ferramenta  
281 confiável para monitorar os padrões hormonais, com base em amostras fecais. Os testes  
282 de validação sobre paralelismo e precisão evidenciaram que os três grupos de  
283 metabólitos hormonais foram medidos eficientemente, sem potencial interferência da  
284 matriz fecal. Com isso, este estudo possibilitou a validação biológica dos ensaios de  
285 cortisol e validação fisiológica dos ensaios de estrógeno e progesterona nos extratos de  
286 metabólito fecais de fêmeas de sauíim. Vale ressaltar que os resultados deste estudo  
287 trazem informações inéditas, que devem contribuir para o aprimoramento do  
288 conhecimento da fisiologia reprodutiva desta espécie.

289 Os níveis de cortisol analisados diferiram com relação ao tempo levado para a  
290 excreção na análise do desafio biológico para *Callimico goeldii*, *Leontopithecus rosalia*,  
291 *Callithrix geoffoyi* (Wark et al., 2016) e *Saguinus bicolor* (Armstrong e Santymire,  
292 2013; Wark et al., 2016) após exames veterinários. Wark et al., 2016, em uma  
293 comparação com espécies de callithichidae, observou o aumento do cortisol após um  
294 estresse para exame veterinário. Os picos hormonais foram de 20 h para *Callimico*, com  
295 retorno as taxas basais após 24 h; já para *Leontonychus* os níveis elevados se deram  
296 após 49 h de exposição ao estresse, com retorno aos níveis basais durante as 24 e 48 h.  
297 Com isso, houve uma variação entre 20 e 48 h para as espécies estudadas. No presente  
298 trabalho, esse pico se deu após 72 h do estresse causado ao animal, voltando ao nível  
299 basal em 24 h. Contudo, é necessário avaliar a capacidade de um animal de responder  
300 ao estresse agudo quando necessário e determinar se há variação na excreção ou no  
301 metabolismo dos níveis de cortisol.

302 Bettinger et al., 1998, sugeriu que o estresse pode ser um mecanismo que influencia  
303 a fertilidade feminina. O resultado do perfil hormonal das quatro fêmeas mostrou sinais  
304 de aciclicidade ovariana. Esta foi identificada pelos baixos níveis de metabólitos fecais  
305 de progesterona por todo o período de estudo. É possível que esse fato possa ser  
306 explicado pela ação que o estresse pode causar no eixo hipotálamo-pituitário-gonadal,  
307 acarretando reduções dos níveis de hormônios esteroides influenciando a função  
308 reprodutiva. A reprodução animal pode ser suprimida ou estimulada pelo estresse,  
309 dependendo da intensidade, duração e da habilidade do animal de interagir com o agente  
310 estressor (Shepherdson, 1994). Em uma análise de um grupo de *Saguinus oedipus*,

311 verificou-se que as fêmeas regularam suas próprias fertilidades, dependendo de  
312 condições ambientais favoráveis (Savage et al., 1997). Assim, parece que as fêmeas  
313 podem renunciar / interromper uma gravidez se as condições ambientais não forem  
314 ideais para a sobrevivência. No entanto, quando as condições são favoráveis, a relação  
315 social e ambiental é estabelecida por um complexo sistema de estratégias reprodutivas,  
316 no qual a fertilidade feminina pode ser influenciada por vários fatores que trabalham em  
317 conjunto para melhorar os resultados reprodutivos.

318 Em relatos não publicados do Centro Nacional de Primatas (CENP) nos últimos dez  
319 anos, apenas uma fêmea foi capaz de reproduzir em cativeiro. No entanto esse animal  
320 estava em recinto localizado na área de exposição do CENP, fator ambiental que pode  
321 estar relacionado à reprodução dessa espécie, assim como a idade e a supressão  
322 reprodutiva em calitriquídeos que são respostas fisiológicas sensíveis a um conjunto  
323 complexo de variáveis (French et al., 2003). Em cativeiro, as fêmeas não reprodutivas  
324 são forçadas a manter um contato mais próximo com os indivíduos reprodutores devido  
325 à limitação de espaço. Isso pode facilitar interações agonísticas e a sensibilidade a  
326 percepção de pistas olfativas que, possivelmente, causam a falha reprodutiva em fêmeas  
327 não reprodutivas (Lottker et al., 2004).

328 Neste estudo não foram analisadas fêmeas em outros recintos. Dessa forma pode-se  
329 sugerir a transferência dos animais para recintos de exposição para a análise da relação  
330 entre o cortisol e a reprodução da espécie. Análises de níveis de cortisol em animais em  
331 áreas de exposição apresentaram níveis mais baixos do que aqueles alojados em outros  
332 recintos (Kleiman et al., 1991; Price et al., 2019). Áreas de exposição permitem  
333 comunicação e interações visuais com animais de vida livre, o que podem reduzir o  
334 estresse e influenciar na atividade reprodutiva.

335 Além do recinto onde o animal é alojado, alguns estudos demonstraram que fatores  
336 abióticos também podem contribuir para o fraco sucesso reprodutivo. São exemplos a  
337 temperatura e a intensidade luminosa. Temperaturas inadequadas podem causar estresse  
338 termorregulatório em micos (Stonerook et al., 1994). Quanto à luminosidade, animais  
339 alojados em condições de pouca luz exibem ciclos ovulatórios prolongados, baixos  
340 níveis de hormônios esteróides e baixa fecundidade, levando à falha reprodutiva de  
341 primatas em cativeiro (Buchanan-Smith, 1997; Reinhardt, 1997).

342 Para a o ciclo ovariano, os resultados obtidos não permitiram caracterizar o perfil de  
343 estrógeno e progesterona dos animais estudados, possivelmente devido ao estresse de  
344 cativeiro. É possível que esses animais não estejam apresentando ciclo ovariano e

345 apresentam um quadro de subfertilidade. O único animal que apresentou possível  
346 ciclicidade, houve aplicação de eCG. Levando em consideração, os dados dos 10 dias de  
347 desafio mais os 30 dias consecutivos, houve aumento nos níveis hormonais, além de  
348 picos de estrógeno e de progesterona no decorrer dos dias. No entanto, esses dados não  
349 são suficientes para inferir sobre um possível ciclo que possa ter ocorrido neste animal.  
350 Sendo necessárias mais avaliações, sobretudo nas outras fêmeas nas quais não foi  
351 possível fazer aplicação do estimulante ovariano para as devidas comparações.

352 Algumas observações comportamentais oportunistas foram brevemente relatadas  
353 nos períodos posteriores à aplicação do eCG (e.g. agressividade e marcação de cheiro  
354 excessivos), coincidindo com os períodos que antecederam os picos de estrógeno e  
355 progesterona. É importante ressaltar que as observações comportamentais relatadas  
356 foram feitas pela equipe de técnicos durante o dia normal de trabalho. Embora o estudo  
357 comportamental e o monitoramento endócrino não tenham ocorrido simultaneamente,  
358 este tipo de monitoramento comportamental pode ser sugerido para ser usado na tomada  
359 de decisões para o manejo reprodutivo. Uma vez que muitas espécies não apresentam  
360 alterações morfológicas visualmente perceptíveis na fase periovulatória, sendo que a  
361 maior ocorrência de comportamentos sexuais nesta fase pode ser interpretada como um  
362 sinalizador do período fértil (Ziegler, 2013). Esses resultados sugerem que as  
363 observações comportamentais podem fornecer informações para melhorar o sucesso  
364 reprodutivo dos animais, mas uma combinação de monitoramento comportamental e  
365 ensaios hormonais é necessária para detectar todos os ciclos estrais. Com isso, seria  
366 interessante a realização de um protocolo de aplicação de eCG para auxiliar no manejo  
367 reprodutivo, induzindo à ciclicidade nessa espécie.

368 Os resultados deste estudo fornecem uma caracterização da endocrinologia  
369 reprodutiva em saúns de cativeiro, além de confirmarem que o monitoramento do  
370 metabolito do hormônio fecal é uma maneira eficaz de monitorar fêmeas para a  
371 definição da fase reprodutiva, mesmo que seja necessário agregar a estudos  
372 comportamentais e a avaliação dos machos. Usando os ensaios imunoenzimático, este  
373 estudo validou as concentrações fecais de cortisol, estrógeno e progesterona, podendo  
374 estes dois últimos, ser medidas de forma não invasiva para determinar se as fêmeas  
375 estão ciclando. Da mesma forma, as concentrações fecais de cortisol podem ser medidas  
376 para determinar se há influência do estresse na ciclicidade dos animais. Com dados mais  
377 precisos sobre as complexas interações endócrinas que ocorrem ao longo do ciclo

378 reprodutivo feminino e ensaios que podem ser utilizados para expandir essas  
379 informações em estudos futuros, o manejo efetivo da espécie pode ser alcançado.

380

### 381 **Agradecimentos**

382 Os autores agradecem ao Centro Nacional de Primatas (CENP) por fornecer  
383 equipamentos, suprimentos e disponibilizar os animais para o estudo. Além de toda  
384 equipe de técnicos do CENP. Ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção  
385 Animal da Amazônia por fornecer apoio aos alunos para este projeto. Os autores  
386 também agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
387 (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) por  
388 fornecer suporte financeiro por meio do edital nº 006/2015 – apoio a doutor recém  
389 contratado.

390

### 391 **Referências**

392 **Albuquerque A.C.S.R, Sousa M.B. C, Santos H. M, Ziegler T. E.** 2001. Behavioral  
393 and hormonal analysis of social relationships between oldest females in a wild  
394 monogamous group of common marmosets (*Callitrix jacchus*). *Int. J. Primatol.* 22(4):  
395 631–645.

396 **Almeida A.S. & Vieira I.C.G.** 2010. Centro de Endemismo Belém: Status da  
397 vegetação remanescente e desafios para a conservação da biodiversidade e restauração  
398 ecológica. *REU Sorocaba.* 36 (3): 95-111.

399 **Armstrong D.M, Santymire R.M.** 2012. Hormonal and behavioral variation in pied  
400 tamarins housed in diferente management conditions. *Zoo Biol* 32:299–306

401 **Bettinger T, Kuhar C, Sironen A, Laudenslager M.** 1998. Behavior and salivary  
402 cortisol in gorillas housed in an all male group. In: American Zoo and Aquarium  
403 Association Annual Conference Proceedings. Tulsa. p 242–6.

404 **Brown J.L.** 2006. Comparative endocrinology of domestic and non-domestic felids.  
405 *Theriogenology* 66:25–36.

406 **Buchanan-Smith H.M.** 1997. Considerations for the housing and handling of new  
407 world primates in the laboratory. In: Reinhardt V, editor. Comfortable quarters for  
408 laboratory animals. Washington, DC: Animal Welfare Institute. p 75–84.

409 **Domingues S.F, Caldas-Bussiere M.C.** 2006 Fisiologia e biotécnicas da reprodução  
410 desenvolvidas em fêmeas de primatas. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.30,  
411 n.1/2, p.57-71. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br).

412 **Estrada A, Garber P. A, Rylands A. B.; Roos, C.** 2017. Impending extinction crisis  
413 of the world's primates: Why primates matter. Science Advance.

414 **French J.A, Abbott D.H, Scheffler G, Robinson J.A, Goy R.W.** 1983. Cyclic  
415 excretion

416 **French J.A, Bales K.L, Baker A.J, Dietz J.M.** 2003. Endocrine monitoring of wild  
417 dominant and subordinate female *Leontopithecus rosalia*. International Journal of  
418 Primatology, Vol. 24, No. 6, December.

419 **Gregorin R, Vivo M.** 2013. Revalidation of *Saguinus Úrsula* Hoffmannsegg (Primates:  
420 Cebidae: Callitrichinae). Zootaxa, v.3721, n.2, p. 171-182.

421 **Heistermann M, Tari S, Hodges J.K.** 1993. Measurement of faecal steroids for  
422 monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. J Reprod Fertil  
423 99:243–251.

424 **Heistermann M, Hodges J.K.** 1995. Endocrine monitoring of the ovarian cycle and  
425 pregnancy in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*) by measurement of steroid  
426 conjugates in urine. Am J Primatol, v.35, p.117-127

427 **Kleiman DG, Beck BB, Dietz JM, Dietz LA.** 1991. Costs of reintroduction and criteria  
428 for success: accounting and accountability in the golden lion tamarin conservation  
429 program. In: Gipps JHW, editor. Beyond captive breeding: reintroducing endangered  
430 species to the wild. Oxford: Oxford University Press. p 959–79.

431 **Lottker P, Huck M, Heymann E.W, Heistermann M.** 2004. Endocrine correlates of  
432 reproductive status in breeding and nonbreeding wild female moustached tamarins. Int J  
433 Primatol 25:919–937.

434 **Price E, Coleman R, Ahsmann J, Glendewar G, Hunt J, Smith T, Wormell D.**  
435 2019. Individual, social, and environmental factors affecting salivary and fecal cortisol  
436 levels in captive pied tamarins (*Saguinus bicolor*). Am J Primatol. 81:e23033.

437 **Reinhardt V.** 1997. Lighting conditions for laboratory monkeys: are they adequate?  
438 AWIC News 8:3–6.

439 **Savage A, Shideler S.E, Soto L.H, Causado J, Giraldo L.H, Lasley B.L, Snowdon**  
440 **C.T.** 1997. Reproductive events of wild cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) in  
441 Colombia. Am J Primatol 43:329–337.

442 **Shepherdson D. J.** 1994. The role of environmental enrichment in the captive breeding  
443 and reintroduction of endangered species. In *Creative conservation: interactive*  
444 *management of wild and captive animals*: 167–177. Mace, G., Olney, P. & Feistner, A.  
445 T. C. (Eds). London: Chapman & Hall.

446 **Silva J.M, Rylands A.B, Fonseca G.A.B.** 2005. O destino das áreas de endemismo na  
447 Amazônia. *Megadiversidade*, vol. 1, n 1, 124-131p.

448 **Stonerook L.J, Weiss H.S, Rodriguez M.A, Rodriguez J.V, Hernandez J.I, Peck**  
449 **O.C, Wood J.D.** 1994. Temperature-metabolism relations in the cotton-top tamarin  
450 (*Saguinus oedipus*) model for ulcerative colitis. *J Med Primatol* 23:16–22.

451 **Wark J.D, Amendolagine L, Lukas K.E, Kuhar C.W, Dennis P.M, Snowdon C.T,**  
452 **Schoffner T, Schook M.W.** 2016. Fecal glucocorticoid metabolite responses to  
453 management stressors and social change in four species of callitrichine monkeys.  
454 *Primates* 57, 267-277.

455 **Ziegler, T.E.; Snowdon, C.T.; Bridson, W.E.** 1990. Reproductive performance and  
456 excretion of urinary estrogens and gonadotropins in the female pygmy marmoset  
457 (*Cebuella pygmaeu*). *American Journal of Primatology* 22:191-203.

458 **Ziegler T.E.** 2013. Social effects via olfactory sensory stimuli on reproductive function  
459 and dysfunction in cooperative breeding marmosets and tamarins. *Am. J. Primatol.*  
460 75:202-211.