

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO ULTRASSONOGRÁFICO DO SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO DE MACACOS-DA-NOITE
(*Aotus azarai infulatus*)**

**Leandro Nassar Coutinho
Médico Veterinário**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO ULTRASSONOGRÁFICO DO SISTEMA
REPRODUTOR FEMININO DE MACACOS-DA-NOITE
(*Aotus azarai infulatus*)**

Leandro Nassar Coutinho

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro – 2012

C871e Coutinho, Leandro Nassar
Estudo ultrassonográfico do sistema reprodutor feminino de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) / Leandro Nassar Coutinho.
-- Jaboticabal, 2012
ix, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Marcus Antônio Rossi Feliciano, Rodrigo del Rio do Valle
Bibliografia

1. *Aotus* sp. 2. Citologia. 3. Doppler. 4. 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 pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. Tem experiência na área de Ultrassonografia e Fisiologia Reprodutiva. Atuando em Reprodução de Primatas e animais domésticos.

**“Nenhum homem produtivo pensa como se estivesse
realmente escrevendo uma dissertação”
(Albert Einstein)**

Dedico:

Ao meu Pai, Rui Gariolan de Moura Coutinho, meu maior amigo e fonte de inspiração como ser humano. À minha mãe, Milena do Socorro Nassar Coutinho, meu exemplo mais puro de dedicação à família, sempre me ensinando a trilhar o caminho do bem.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, meus grandes exemplos, alicerces da nossa família, grandes tutores da nossa educação, fonte inesgotável de carinho e responsáveis pelo cidadão que me formei.

À minha irmã Luciana Nassar Coutinho, pela paciência com o irmão caçula e por te me dado o maior presente do mundo, meu afilhado, o pequeno Daniel.

À minha namorada, Marina Botelho Soares de Brito, aquela pessoa que mudou a minha vida, quem eu admiro e tenho orgulho todos os dias. Obrigado pelo incentivo, pela dedicação, pela revisão ortográfica e por ser minha parceira médica veterinária.

Aos meus sogros Francisco Aurélio Brito jr. e Mônica de Brito, meus cunhados Marcelo Brito e Murilo Brito por todo carinho e apoio, por me adotarem e me fazerem me sentir em casa sempre que estamos juntos.

Ao professor Wilter Ricardo Russiano Vicente, grande incentivador e por me proporcionar através da sua experiência todo o suporte necessário para que me torne um respeitado pesquisador.

Ao Professor Frederico Ozanan Barros Monteiro, exemplo de pesquisador e médico veterinário. Por todos os trabalhos que desenvolvemos juntos, pelas lições e conhecimento.

Aos amigos que estiveram comigo, durante este período, me ajudando, me ensinando e que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação.

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.

Ao professor, Rodrigo del Rio do Valle, pela participação na avaliação e melhoria da qualidade científica deste estudo.

Ao Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano, por também contribuir, avaliando e melhorando a qualidade científica 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.

Aos estudantes de medicina veterinária e pós-graduação Eduarda Moutinho e Rafael Silva por todo o suporte durante a realização do estudo

Aos animais que participaram deste estudo. Pela paciência conosco, na busca pelo conhecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.2.1 Taxonomia.....	12
1.2.2 Fisiologia reprodutiva de <i>Aotus</i>	13
1.2.3 Ultrassonografia ginecológica em PNH.....	18
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA IDADE E DO NÚMERO DE PARTOS NAS VARIÁVEIS UTERINAS E OVARIANAS EM MACACOS-DA-NOITE (<i>Aotus azarai infulatus</i>).....	22
2.1 INTRODUÇÃO.....	24
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.2.1 Alimentação.....	26
2.2.2 Instalações.....	26
2.2.3 Captura e contenção física.....	27
2.2.4 Exame ultrassonográfico ginecológico.....	27
2.2.5 Análise estatística.....	28
2.3 RESULTADOS.....	29
2.4 DISCUSSÃO.....	34
2.5 CONCLUSÕES.....	37
CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO EVENTO FOLICULAR DE MACACO-DA-NOITE (<i>Aotus azarai infulatus</i>) POR ULTRASSOM MODO B E DOPPLER E CITOLOGIA VAGINAL.....	38
3.1 INTRODUÇÃO.....	40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.2.1 Condicionamento dos animais ao exame ultrassonográfico.....	42
3.2.2 Estudo ultrassonográfico do evento folicular.....	43

3.2.3 Citologia Vaginal	44
3.2.4 Análise estatística	45
3.3 RESULTADOS.....	46
3.3.1 Ultrassonografia	46
3.3.2 Dopplerfluxometria das artérias ilíacas	48
3.3.3 Citologia vaginal	49
3.4 DISCUSSÃO	52
3.5 CONCLUSÕES	56
4 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
AIID – Artéria Ilíaca interna direita
AIIE – Artéria Ilíaca interna esquerda
AST – Aspartato aminotransferase
ALT – Alanina aminotransferase
CENP – Centro Nacional de Primatas
CL – Corpo lúteo
FA – Fosfatase alcalina
FSH – Hormônio folículo estimulante
GGT – Gama glutamil transferase
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
HOC – Hiperestimulação ovariana controlada
IR – Índice de resistência vascular
IP – Índice de pulsatividade
LH – Hormônio luteinizante
LUO – Ligamento útero ovárico
M1 – Primeiro momento
M2 – Segundo momento
M3 – Terceiro momento
MHz – Mega Hertz
PN – Primatas neotropicais
PNH – Primatas não humanos
PNM – Primatas do novo mundo
PVM – Primatas do velho mundo

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta e possui um grande número de espécies de primatas. Segundo HILTON-TAYLOR et al. (2004), o Brasil possui 133 espécies e subespécies de primatas, o que representa aproximadamente mais de 21% das espécies do planeta (CHIARELLO et al., 2008). Desse número expressivo de espécies, 26 estão ameaçadas, sendo 15 de ocorrência na Mata Atlântica e 11 na Amazônia. Isso mostra o quanto a perda de habitat, muito mais acentuada na Mata Atlântica do que na Amazônia, representa em termos de extinção aos primatas no Brasil. Na Amazônia há 105 espécies e subespécies, das quais 53 são endêmicas (KIERULFF et al., 2007). Dentre essas, cinco têm distribuição restrita aos estados do chamado “arco do desenvolvimento” (Pará, Mato Grosso e Maranhão), onde a pressão antrópica é mais intensa (CHIARELLO et al., 2008).

Amparado nessas premissas, fica notório que o investimento em pesquisas que gerem conhecimento sobre a biologia e desenvolvimento de biotécnicas da reprodução para a conservação das espécies, cria subsídios para justificar a manutenção de primatas em cativeiro, promovendo a preservação e a manutenção da biodiversidade. Segundo JURKE et al. (1994), as populações em cativeiro deveriam ser utilizadas para aumentar o entendimento sobre as espécies, especialmente com relação à biologia reprodutiva.

As pesquisas com reprodução de primatas Neotropicais em cativeiro são importantes, pois podem melhorar o desempenho reprodutivo de espécies utilizadas para estudos biomédicos sem ser necessário utilizar animais de vida livre (GUIMARÃES, 2001). Pesquisas biomédicas desenvolvidas em primatas são muito importantes devido a grande similaridade destes com o homem. Vários avanços em medicina humana já foram alcançados com o estudo em primatas (GEIMAN & MEAGHER, 1967 apud DIXSON, 1994; BENNETT et al., 1995; ABEE, 2003). Sendo a

reprodução de primatas um dos ramos de pesquisas que mais contribui com o conhecimento sobre as espécies e a sua preservação.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Taxonomia

Os primatas são animais pertencentes 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). Estes últimos têm como habitat as Américas Central e do Sul (MONTEIRO, 2007; BRASIL, 2008). Recentemente RYLANDS et al. (no prelo), propuseram uma nova classificação taxonômica para PN. Esses autores identificaram cerca de 152 espécies (204 espécies e subespécies) 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 10 táxons, divididos em 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. (no prelo) demonstraram a existência de 11 espécies e subespécies: *Aotus trivirgatus*, *A. vociferans*, *A. nancymai*, *A. hershkovitzi*, *A. lemurus*, *A. griseimembra*, *A. zonalis*, *A. azarae*, e *A. azarai infulatus*. Recentemente, uma nova espécie, *A. jorgehernandezii*, foi descrita por DEFLER & BUENO (2007) e os mesmos autores propuseram, baseado na variabilidade cariotípica conclusiva, que a espécie *A. brumbacki* não pode ser uma subespécie de *A. lemurus*.

Amplamente utilizado em pesquisas biomédicas, os macacos-da-noite foram recomendados como excelentes modelos experimentais pelo “World Health Organization”. São 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).

1.2.2 Fisiologia reprodutiva de *Aotus*

Os macacos-da-noite se reproduzem bem em cativeiro (GOZALO & MONTOYA, 1990). Para isso, práticas de manejo que simulem ao máximo a estrutura social observada em seu ambiente natural, com fotoperíodo constante, devem ser mantidas (MÁLAGA et al., 1997).

O comportamento reprodutivo dos PN em cativeiro não sofre influência marcante do ambiente. Porém, mudanças no fotoperíodo e na temperatura podem interferir na atividade reprodutiva da fêmea de *Aotus* spp (FERNANDEZ-DUQUE et al., 2008). HOLBROOK et al. (2004), demonstraram que animais de cativeiro alojados em recinto ao ar livre, a 25º de latitude Norte, tornaram-se cada vez mais sazonais. Já em populações de vida livre na região do Chaco argentino, hemisfério sul, o mesmo autor constatou nascimentos restritos ao período de março a junho, indicando a influência do fotoperíodo na atividade reprodutiva dos animais (FERNANDEZ-DUQUE & HUNTINGTON, 2002).

No gênero *Aotus*, a puberdade ocorre por volta de um ano de idade em machos, como indicado por medida longitudinal da testosterona plasmática, com pico hormonal entre 300 e 400 dias de vida. Ocorre ainda, durante esse período, o crescimento acentuado da glândula subcaudal, devido ao estímulo andrógeno. Os primeiros sinais de desenvolvimento dessa glândula (enrijecimento e descoloração dos pelos

sobrejacentes) foram observados entre 282 e 370 dias de vida (DIXSON et al., 1994). Segundo DIXSON (1981), não ocorre inibição da puberdade por indivíduos dominantes. Nas fêmeas, o primeiro cio fértil define a ocorrência da puberdade, mas a literatura consultada apresentou informações escassas a esse respeito (FERNANDEZ-DUQUE & HUNTINGTON, 2002).

O ciclo ovariano entre os primatas pode ser classificado em ciclo menstrual e estral. Na quase totalidade, os PVM possuem ciclo menstrual, enquanto os neotropicais, em grande maioria são primatas de ciclo estral. Os *Aotus* são primatas de ciclo estral, com duração média de 16 dias, sendo que seus ovários possuem abundância de tecido luteal (BONNEY et al., 1979). De acordo com BONNEY & 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 dos níveis de progesterona. A fase luteal dura em torno de 10 dias.

As alterações do epitélio vaginal, durante as diversas fases do ciclo estral podem ser acompanhadas pelo exame citológico vaginal (FELDMAN & NELSON, 2004). Dentre os métodos de detecção das fases do ciclo estral, a citologia vaginal é a técnica laboratorial de mais simples execução, sendo um instrumento útil para o diagnóstico em ginecologia (GOMPEL & KOSS, 1997).

O aumento das concentrações séricas de estrógeno nesses animais, na presença de folículos ovarianos, durante as fases de proestro e estro, causam proliferação das camadas de células do epitélio vaginal (SHILLE et al., 1984). Pequenas células saudáveis, próximas aos vasos sanguíneos, tornam-se maiores e mais irregulares à medida que se afastam da lâmina basal em direção ao lúmen vaginal e o núcleo diminui progressivamente, até se desintegrar (HERRON, 1977). Vários tipos celulares já foram descritos em estudos sobre a citologia vaginal, entretanto a diferenciação dos tipos celulares em função desse aporte sanguíneo denomina-se índice cariopicnótico, que em primatas permite a diferenciação celular em quatro tipos: células basais, parabasais, intermediárias e superficiais (BLAKLEY, 1969).

Em primatas não humanos (PNH), de ciclo estral, a citologia vaginal não tem sido relatada como de grande valor, com excessão dos PVM, que apresentam ciclo

menstrual. Dentre os PN, apenas os gêneros *Cebus*, *Ateles* e *Alouatta* exibem ciclo menstrual e por isso alguns trabalhos demonstraram a eficiência da citologia vaginal no monitoramento do ciclo reprodutivo (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1998; GUIMARÃES, 2001; ORTIZ et al., 2005; DOMINGUES & CALDAS-BUSSIÈRE, 2007; KUGELMEIER et al., 2011).

Entre os primatas neotropicais investigados para padronização citológica do epitélio vaginal encontram-se *Cebus apella* (NAGLE & DENARI, 1983), *Saimiri* (ROSENBLUM et al., 1967; HUTCHINSON, 1970), *Callithrix* (HEARN, 1978) e *Saguinus*. (EPPLÉ & KATZ, 1983). Estudos de citologia vaginal de *Leontopithecus* foram amplamente reproduzidos com a identificação de diferentes tipos celulares, porém a correlação com a influência hormonal está sendo descartada (MORAES et al., 2001; MORAES, 2004). Em *Alouatta caraya*, a citologia foi empregada para comparar a ocorrência de sangramento vaginal com os perfis hormonais (KUGELMEIER et al., 2011). Durante esse estudo, foram coletadas amostras de células vaginais de fêmeas adultas para detectar o início e a duração dos períodos de sangramento, e comparando com as dosagens de metabólitos fecais de progesterona e estradiol. Os resultados demonstraram que o sangramento discreto nesses animais apenas pode ser detectado por citologia vaginal, demonstrando que não apenas PVM possuem ciclo menstrual.

Estudos conduzidos em *Aotus trivirgatus* (DIXSON, 1983) e *A. a. infulatus* (FERREIRA, 1998) descreveram o papel da citologia vaginal como instrumento auxiliar na padronização do ciclo estral dessas espécies. DIXSON (1983) desconsidera a relação entre a descamação do epitélio vaginal e as diferentes fases do ciclo, confirmando estudo anterior realizado por CICMANEK & CAMPBELL (1977), que coletaram esfregaços vaginais de seis fêmeas durante dois períodos distintos, de um mês cada, e não revelaram indícios consistentes de ciclo estral. BONNEY & SETCHELL (1980), consideraram a citologia vaginal como indicador inadequado para determinação da fase do ciclo ovariano em *Aotus*, uma vez que os resultados encontrados não definiram um padrão de proliferação epitelial vaginal, com predominância de células superficiais, em função do ciclo.

FERREIRA (1998) verificou em esfregaços vaginais (colpocitologia) de macacos-da-noite, a predominância de células superficiais na fase de estro com média e desvio padrão de $70,67 \pm 4,3\%$. O mesmo autor relatou a maior prevalência de células intermediárias ($43,82 \pm 1,79\%$), parabasais ($15,41 \pm 1,45\%$) e basais ($4,22 \pm 0,34\%$) ocorrendo na fase de diestro. O ciclo estral nesses animais teve duração média de $14,87 \pm 0,14$ dias, com fase de estro de $1,31 \pm 0,1$ dias, e duração de metaestro de $3,62 \pm 0,15$ dias, diestro de $6,49 \pm 0,24$ dias e proestro de $3,43 \pm 0,05$ dias. O mesmo autor indica a citologia vaginal como possível método de monitoramento do ciclo estral nesta espécie.

Como em todos os primatas, os órgãos genitais consistem de dois ovários, duas tubas uterinas, útero e vagina (VERAS et al., 2007). NAGLE et al. (2005) destacaram a importância do ligamento útero-ovariano (LUO), responsável pela sustentação dos órgãos. O LUO funciona ainda como “caminho”, onde estão vasos e tecido nervoso, que levam informações neuroendócrinas, garantindo a homeostase útero-ovariana.

Os ovários têm formato ovóide ou elipsóide e são proporcionalmente maiores e mais compactos na infraordem *Platyrrhini* quando comparados aos *Catarrhini* (ECKSTEIN, 1958; MONTEIRO et al., 2009). O ligamento próprio do ovário em *Aotus* é curto e achatado (HILL, 1957), apesar disto, o posicionamento dos ovários dentro da cavidade abdominal pode variar muito entre animais, de acordo com a repleção da bexiga e dos intestinos (MONTEIRO et al., 2009).

O útero dos macacos-da-noite é muito semelhante ao da espécie humana. Sua localização anatômica topográfica é descrita por ultrassom, localizando-o medialmente na cavidade pélvica e ventralmente à bexiga (MONTEIRO et al., 2006). O órgão é simples e tem conformação piriforme formando uma cavidade única, que é dividida em: fundo, corpo e cérvix (HERTIG et al., 1976). Em função disso, vários estudos biomédicos com PNH estão contribuindo para melhorias no tratamento clínico dos distúrbios uterinos prevalentes em mulheres (ABBOTT et al., 2004; COUTINHO et al., 2011).

HERTIG et al. (1976) descreveram a morfologia do trato genital na espécie *Aotus trivigartus*. O comprimento do útero variou de 10,5 a 20 mm e o segmento cervical

apresentou-se curto e não se observou porção infravaginal. Uma característica dessa espécie foi a continuidade da parede cervical anterior com a parede da vagina, de modo que só observou-se uma projeção da cérvix na vagina na porção dorsal.

Em *Cebus*, *Aotus*, *Saimiri* e *Ateles*, a porção fúndica do útero é quase globóide, sendo a parede ventral achatada e a dorsal mais projetada, dando à região do fundo uma aparência piramidal em um plano transversal (VERAS, 2004). MONTEIRO et al. (2009) verificou por meio de exame ultrassonográfico de macacos-da-noite, comprimento uterino variando entre $1,71 \pm 0,12$ cm em nulíparas, $1,99 \pm 0,14$ cm em primíparas e $1,96 \pm 0,24$ cm em pluríparas.

O segmento inferior do útero apresenta-se revestido por um epitélio colunar simples sobre uma lâmina própria com glândulas ligeiramente tortuosas e muito ramificadas. Em *Aotus*, identificou-se epitélio vaginal estratificado escamoso com poucas camadas de células, apresentando ligeira cornificação. O comprimento da vagina variou de 13,5 a 23 mm (HERTIG et al., 1976).

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).

MONTEIRO et al. (2009) não observaram, ao exame de ultrassom, o fenômeno ovulatório e presença do corpo lúteo, mas observaram folículos em ovários de *Aotus azarai infulatus*. Esses autores definiram a visibilização dos folículos como estruturas anecóicas, em comparação ao parênquima do ovário, porém, não puderam correlacionar esses achados ao ciclo reprodutivo da espécie, pois consideraram a amostragem insuficiente (n=2). Os mesmos autores também demonstraram que o volume do ovário direito foi significativamente 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: 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 ± 0.11 cm, espessura 0.55 ± 0.09 cm a 0.61 ± 0.08 cm e volume variando de 0,19 ± 0,07 cm³ a 0,26 ± 0,06 cm³.

1.2.3 Ultrassonografia ginecológica em PNH

A ultrassonografia é uma técnica de imagem que auxilia na visualização de estruturas e órgãos, por meio da geração e captação de ondas sonoras refletidas do tecido alvo (MOORE & DALLEY, 2006). As primeiras técnicas ultrassonográficas, em medicina veterinária, surgiram na década de 70 (ERIKSON et al., 1974 *apud* SEONE et al., 2011) e, especificamente a visualização da estrutura uterina e ovariana, foi inicialmente demonstrada por KRATOCHWIL et al. (1972).

Esta técnica de imagem é uma das alternativas para o monitoramento reprodutivo e pesquisas sobre reprodução de PNH em cativeiro (SEIER et al., 2000; OERKE et al., 2002; ORTIZ et al., 2005; ALVES et al., 2007; DOMINGUES et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; COUTINHO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011a). A ultrassonografia reprodutiva fornece a otimização para indução do ciclo sexual a regimes de superovulação, programas de contracepção, colheita de sêmen e técnicas de extração testicular do esperma, como também auxilia na aspiração folicular e procedimentos de transplante ovariano, além da aplicação da inseminação artificial, colheita e transferência de embriões.

Em geral, a maioria dos estudos realizados em primatas por ultrassom está relacionada ao acompanhamento gestacional (SEIER et al., 2000). Em *Callithrix jacchus*, OERKE et al. (1996) avaliaram o potencial da ultrassonografia para detectar e monitorar a gestação.

Em relação ao controle do estro, DOMINGUES et al. (2007) descreve a detecção de folículos pré-ovulatório até seis dias antes da ovulação em *Cebus apella*. Semelhante ao observado por ORTIZ et al. (2005), que observaram o crescimento e as dimensões do folículo pré-ovulatório em macacos-prego, assim como OERKE et al. (1996) e OERKE et al. (2002), quando monitoraram a atividade ovariana de *Callithrix jacchus* e ALVES et al. (2007) que realizaram varredura ultrassonográfica da cavidade

abdominal de *Cebus apella* e descreveram as características anatômicas normais na espécie.

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 (2007), 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, 2007).

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; HILL, 1957; MONTEIRO, 2007). A observação dos eventos cíclicos se mostra bastante difícil, principalmente devido ao fato do tecido lúteo e o estroma ovariano possuírem ecogenicidade semelhante (MONTEIRO, 2007).

SATOMURA, 1956 *apud* MURTA et al. (2002) mostrou que era possível detectar o fluxo sanguíneo nas artérias periféricas, usando a diferença das frequências refletidas das células sanguíneas em movimento. Esse efeito, denominado efeito doppler, está sendo gradativamente empregado em estudos reprodutivos, com excelentes resultados. Atualmente, o estudo da hemodinâmica, de forma não invasiva, permite a varredura tripla (Triplex doppler). A velocidade do fluxo, assim como a direção e a magnitude da velocidade são informações obtidas pela técnica.

CARVALHO et al. (2008) descrevem que para realizar o exame de um vaso sanguíneo é necessário localizá-lo, por meio do modo bidimensional em corte longitudinal, evidenciar o padrão de doppler colorido ajustados a uma área de fluxo homogêneo e proceder análise pelo doppler pulsado seguido de correção do ângulo de insonação (formado entre o transdutor e o vaso) e finalmente a análise das ondas. O ultrassom Doppler tem sido utilizado em ginecologia e obstetrícia, identificando a relação do fluxo sanguíneo da artéria uterina e umbilical para avaliação fetal, no mapeamento dos vasos ovarianos, que permite o diagnóstico ecográfico de processos patológicos ovarianos, principalmente para determinar o fluxo sanguíneo nos tumores de ovário com características neoplásicas e na detecção da instalação do processo de ovulação antes da ruptura folicular (BICUDO et al., 2010)

Os índices hemodinâmicos, assim como a média da velocidade do fluxo sanguíneo, podem ser calculados automaticamente pelo transdutor, permitindo uma comparação do fluxo durante a sístole e a diástole. Os índices mais utilizados são: índice de resistência vascular (IR), que examina a diferença entre o pico sistólico e velocidade diastólica final e é expressa por $IR = (S - D) / S$ onde S é o pico de velocidade sistólica e D é o mínimo ou velocidade diastólica final, o índice de pulsatividade (IP), onde $IP = (S - D) / \text{velocidade}$, S é o pico de velocidade sistólica, D é a velocidade diastólica final e velocidade é o tempo médio de velocidade máxima ao longo do ciclo cardíaco. O IP não é tão preciso quanto IR devido à variabilidade inerente a medição da velocidade média com programas de software atuais (CARVALHO, 2009).

Para avaliar o processo de ovulação por meio do mapeamento Doppler, os valores dos IR e IP são importantes. 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).

Em mulheres, o fluxo sanguíneo ovariano foi avaliado pelo Doppler pulsado transvaginal e ciclos de hiperestimulação ovariana controlada (HOC) para fecundação

in vitro (BICUDO et al., 2010). Após a transferência de embriões, os resultados demonstraram um IR menor no corpo lúteo de fêmeas que se tornaram gestantes, comparado às não gestantes, sugerindo um padrão de modificação do fluxo sanguíneo por modulação embrionária ou ainda pela presença do corpo lúteo altamente irrigado (BABER et al., 1988). A segunda hipótese parece ter maior validade se levarmos em consideração que na comparação entre os dois ovários de uma mesma mulher, o ovário que abriga o folículo dominante e posteriormente o corpo lúteo, apresenta uma diminuição do IR, enquanto o ovário contralateral tende a permanecer com índices significativamente inalterados (CAETANO et al., 1995).

Em cadelas, o estudo por dopplerfluxometria realizado por BICUDO et al. (2010) avaliou a dinâmica do desenvolvimento folicular e determinou valores de IR e IP para a artéria intra-ovariana, determinando com segurança o dia da ovulação. A média obtida da velocidade máxima do pico sistólico da artéria intraovariana foi de 26,41cm/s. O IR apresentou um declínio no dia da ovulação até 24 horas após, e o seu valor médio variou de 0,44 – 0,59 neste período. O IP apresentou oscilações com declínio desde 120 horas antes até 24 horas depois da ovulação e seu valor médio nesse período foi de $0,57 \pm 1,1$.

Em primatas, a dopplerfluxometria já foi utilizada para estudos na área de obstetrícia em PVM (SANTOLAYA-FORGAS et al., 2006) e calitriquídeos (TCHIRIKOV et al., 1998). DOMINGUES et al. (2007) avaliou dentre outros aspectos, o IR e IP da artéria do LUO e uterina de macacas *Cebus apella* e pôde-se verificar que os índices sofreram alteração na artéria ipsilateral próximo ao período ovulatório. Em macacos-da-noite, as únicas referências à utilização da técnica foram descritos para o exame obstétrico e no cálculo da frequência cardíaca em *Aotus azarai infulatus* (MONTEIRO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2011a).

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA IDADE E DO NÚMERO DE PARTOS NAS VARIÁVEIS UTERINAS E OVARIANAS EM MACACOS-DA-NOITE (*Aotus azarai infulatus*)

RESUMO – Realizou-se o exame ultrassonográfico de macacos-da-noite para avaliar os volumes uterino e ovariano e analisar a interação entre diferentes faixas etárias e número de partos. Foram realizados exames ultrassonográficos da região pélvica, a fim de comparar as dimensões uterinas com o peso, idade (infantil, juvenil, subadulta, adulta jovem e adulta) e número de partos (nulípara, primípara e múltipara) e comparar as dimensões ovarianas com o peso e a idade. O volume uterino (VU) foi diretamente proporcional ao número de partos, fator mais importante no crescimento uterino das fêmeas adultas ($p < 0,05$). O peso e a idade demonstraram uma correlação positiva com o VU ($r = 0.5354$, $r = 0.6489$, $p < 0.01$), respectivamente. O volume dos ovários cresceu proporcionalmente a idade das fêmeas ($p < 0,05$). A puberdade foi o período de maior crescimento tanto do útero como do ovário.

Palavras-Chave: *Aotus sp.*, biometria, ginecologia, ultrassom

CHAPTER 2 – EFFECT OF AGE AND NUMBER OF PARTURITIONS ON UTERINE AND OVARIAN VARIABLES IN OWL MONKEYS (*Aotus azarai infulatus*)

SUMMARY - We aimed to evaluate the uterine and ovarian volumes of owl monkeys in different age groups with different numbers of live births and to analyze the interaction between both. We performed pelvic ultrasound exams to compare the uterine measurements with weight, age (infant, juvenile, subadult, young adults, and adults) and the number of live births (nulliparous, primiparous, and multiparous) and to compare the ovarian measurements with weight and age. The uterine volume (UV) was directly proportional to the number of parturitions, which was the most important factor in the uterine growth of adult females ($P < 0.05$). The body weight and age of the animals showed a high positive correlation with UV ($r = 0.5354$, $r = 0.6489$, $P < 0.01$),

respectively. The volume of the ovaries grew in proportion to the age of the females ($P < 0.05$). Puberty was the period of greatest uterine and ovarian growth.

Keywords: *Aotus sp.*, biometrics, gynecological, ultrasound

2.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Aotus azarai infulatus* (macacos-da-noite) faz parte das 105 espécies e subespécies que ocorrem na Amazônia (RYLANDS et al., 2000), das quais 53 são endêmicas (MACHADO et al., 2005). A diversidade da fauna, porém, convive com o avanço do desmatamento e destruição dos recursos naturais em face da ação antrópica desordenada, levando a degradação do habitat e conseqüente comprometimento da conservação das espécies de primatas. A atividade madeireira nas florestas tropicais é seguramente um dos principais fatores que contribuem para essa ameaça, além da caça e exploração comercial de algumas espécies.

Em 2002, a Fundação Biodiversitas coordenou o projeto de revisão da “Lista da fauna Brasileira Ameaçada de Extinção”. Esse estudo resultou na listagem de 26 primatas classificados como “ criticamente em perigo – CR” (10), “Em perigo – EN” (seis) e “Vulnerável – VL” (10). Desse total, 11 na Amazônia. Dos primatas amazônicos ameaçados, quatro tem ocorrência no estado do Pará (*Ateles marginatus*, *Cebus kaapori*, *Chiropotes satanas* e *C. utahicki*) (MACHADO et al., 2005).

Algumas espécies de macacos-da-noite podem estar susceptíveis a serem ameaçadas ou em risco a partir do ano 2000, por causas como o crescimento das criações de gado, monoculturas e da indústria madeireira (AQUINO & ENCARNACIÓN, 1994). Entretanto, de acordo com o “International Union for Conservation of Nature” (IUCN), as espécies do gênero *Aotus* estão listadas como “menor risco”, isso porque mesmo que o desmatamento esteja acontecendo de forma preocupante, particularmente no Brasil, a população não deve diminuir rápido o suficiente para qualificar a espécie como em maior risco (IUCN, 2010). É importante caracterizar cuidadosamente todas as espécies de primatas, ameaçados ou não, para fornecer uma base sólida de informações para o manejo dos animais e suas colônias de reprodução.

Nesse contexto, a utilização de biotécnicas para a reprodução de animais selvagens vem sendo proposta, em diversos países, como uma ferramenta estratégica para a conservação de espécies ameaçadas em extinção (BUENO & PEREIRA 2008). Para que as biotécnicas sejam implementadas, é necessário desenvolver pesquisas a

respeito da biologia reprodutiva. Segundo WILDT (1989), o desconhecimento dos aspectos reprodutivos inviabiliza o uso eficiente de técnicas de reprodução assistida para conservação. MACHADO et al. (2005) cita que, 15 espécies e subespécies de primatas da Amazônia foram listadas na categoria “Dados insuficientes” (DD), evidenciando a falta de conhecimento sobre os primatas da região e sua biologia reprodutiva.

Segundo MAUAD et al. (2001), o volume do útero de mulheres sofre alterações com a idade, número de partos e influência hormonal. Estudos recentes demonstraram o efeito do número de partos sobre o volume uterino de macacos-da-noite (MONTEIRO et al., 2006, MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, o efeito da idade não foi avaliado nos estudos anteriores.

O desenvolvimento tecnológico de equipamentos de ultrassom e o uso de transdutores de alta frequência facilitaram as pesquisas sobre a avaliação do ovário, por permitirem imagens de alta resolução que podem ser associados com modernas técnicas de análise de imagem. Conforme LASS & BRINSDEN (1999), o ovário humano é um órgão que sofre mudanças no tamanho e na atividade ao longo da vida. Existe um crescimento lento e contínuo dos ovários durante a infância. Eles crescem, aumentam cerca de 30 vezes de peso e mudam de forma, até a puberdade, quando atingem o tamanho, forma, e peso do ovário adulto e se encontram dentro da cavidade pélvica. No entanto, há poucas referências na literatura relacionada com a avaliação ultrassonográfica dos ovários em primatas não humanos, especialmente nas espécies neotropicais (MONTEIRO et al., 2009)

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os volumes do útero e dos ovários de macacos-da-noite em diferentes faixas etárias, número de partos e a interação entre ambos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre junho de 2008 e janeiro 2009. Foram utilizadas 40 fêmeas pertencentes à colônia de reprodução do 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 experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais do Instituto Evandro Chagas (protocolo CEPAN / IEC – nº 036/2008).

Os animais foram divididos em cinco faixas etárias: infantil (0-150 dias, n = 3); juvenil (151 - 364 dias, n = 4); subadulto (1 - 2 anos, n = 6); adultos jovens (3 - 4 anos, n = 9) e adultos (> de 5 anos, n = 18). As faixas etárias foram similares às estabelecidas por AQUINO & ENCARNACIÓN (1994). A análise do número de partos não incluiu fêmeas infantis, juvenis e subadultas, por serem muito novas para a reprodução. Portanto, somente as fêmeas adultas jovens e adultas foram classificadas quanto ao número de partos (nulípara – nunca pariu, n = 9; primípara – com um parto, n = 10; e plurípara – com dois ou mais partos, n = 8). Todos os animais estavam identificados com um código de três letras tatuado na face interna da coxa direita e microchip implantado na região interscapular.

2.2.1 Alimentação

Os animais foram alimentados conforme o manejo adotado pelo CENP: diversos tipos de frutas, legumes, leite, ovos, ração para primatas Megazoo P18^{®1} como fonte de suplementação proteica, suplementos vitamínicos e minerais em água *ad libitum*.

2.2.2 Instalações

Os animais foram mantidos em sistema fechado, recinto de alvenaria revestido em suas laterais e piso por azulejos e tela metálica em suas extremidades superior, fundo e frente, divididos entre os galpões de reprodução número I e IV. Os recintos

¹ Rações Megazoo. Contagem, MG, Brasil

apresentaram 3,85 m de comprimento x 1,20 m de largura x 2,40 m de altura. Externamente, os recintos possuíam uma caixa de dimensões 35 cm x 30 cm x 30 cm, com porta tipo guilhotina e suporte para bebedouro. Internamente continham duas pranchas de madeira para locomoção, sustentadas por dois puleiros transversais e acesso aos recipientes de alimentação.

2.2.3 Captura e contenção física

Cada indivíduo foi capturado seguindo os métodos descritos por MONTEIRO et al. (2009). Antes de iniciar o exame ultrassonográfico, as fêmeas foram pesadas ainda no interior da caixa transporte por meio da tara em balança eletrônica Filizola[®] MF-30². Em seguida foram contidas manualmente, utilizando-se luvas de couro, e realizou-se tricotomia da região pélvico-abdominal. Durante a realização dos exames, os animais receberam alimentação com diversos tipos de frutas, principalmente abacate, abacaxi, banana, goiaba, mamão, melancia e melão, seguindo os métodos descritos por MONTEIRO et al. (2009).

2.2.4 Exame ultrassonográfico ginecológico

As fêmeas estavam em recintos individuais, não acasaladas e não estavam prenhas no momento da avaliação ultrassonográfica. O exame ultrassonográfico foi realizado utilizando-se aparelho Medical SonoAce 9900^{®3} equipado com transdutor de banda larga, transabdominal linear e multifrequencial (5-12 MHz). As imagens obtidas foram analisadas em monitor de 14", e arquivadas no disco rígido do próprio aparelho e em CD-ROM.

Por meio de exame ultrassonográfico foram avaliados os seguintes parâmetros uterinos: contorno, forma, ecotextura e ecogenicidade, localização e dimensões. Para isso, foram obtidas imagens do parênquima uterino nos planos sagital e transversal. O diâmetro crâniocaudal (DCC) e o diâmetro dorsoventral (DDV) foram obtidos em plano sagital e a variável diâmetro transversal (DT) foi mensurada em plano transversal. Cada

² Indústrias Filiziola S/A. São Paulo, SP, Brasil.

³ Medison Co., Ltd. Seoul, Korea.

diâmetro foi mensurado três vezes, empregando a média das mesmas para o cálculo do volume. Sendo assim, o cálculo do volume uterino (VU) foi realizado pela aproximação com o modelo geométrico esferoidal de três distâncias, conforme descrito por MONTEIRO et al. (2006) e MONTEIRO et al. (2009). As dimensões e o volume uterino foram realizados considerando-se as cinco faixas etárias, o peso corporal e o número de partos das fêmeas para efeito de comparação com as variáveis uterinas.

Os ovários foram avaliados individualmente quanto: aos contornos, forma, e ecotextura e ecogenicidade, localização na cavidade abdominal, dimensões e presença ou ausência de folículos. Para isso, foram obtidas imagens ultrassonográficas nos planos sagital e transversal, pelo maior diâmetro do parênquima ovariano. O útero foi utilizado como referência para identificação dos ovários, que foram localizados movendo-se o transdutor levemente para cada um dos lados do útero. A técnica utilizada para mensuração dos ovários foi semelhante à descrita por MONTEIRO et al. (2009). O comprimento (COD - COE) foi obtido em plano sagital. A espessura (EOD - EOE) e a largura (LOD - LOE) foram mensuradas em plano transversal, obtido perpendicularmente ao comprimento. Os parâmetros ovarianos foram mensurados, por três vezes, empregando a média dos mesmos para o cálculo do volume. De posse dessas médias foi possível calcular o volume de cada ovário (VOD - VOE) e compará-los com a idade e peso corporal dos animais, semelhantemente ao descrito para o útero.

2.2.5 Análise estatística

Foram calculados parâmetros básicos da estatística descritiva (média, variância e desvio padrão) para todas as variáveis analisadas. Os resultados obtidos foram analisados, levando-se em consideração a faixa etária, o número de partos e a interação. Para comparação das médias das variáveis uterinas e ovarianas, foi realizada análise de variância (ANOVA - dois critérios) e aplicado teste de média (Tukey). Foram realizados testes de correlação de Pearson entre o peso e os volumes uterinos e ovarianos. Todas as análises foram realizadas de acordo com STEEL et al. (1997), com nível de significância de até 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS

As estruturas uterinas e ovarianas mostraram-se anatomicamente e fisiologicamente como descritas anteriormente para a espécie. Os contornos uterinos foram bem visibilizados por meio da ultrassonografia transabdominal com a utilização do transdutor linear (5-12Mhz), evidenciando o útero simples em formato alongado a globóide, com ecogenicidade hipoecóica e isoecóica de seu parênquima em relação aos órgãos adjacentes e característica hiperecogênica da superfície endometrial (figura 1). O Posicionamento uterino ventrocaudal em relação à vesícula urinária foi invariável, enquanto que as dimensões uterinas foram variáveis, em função da idade, número de partos e peso.

Em geral, as dimensões uterinas das fêmeas infantis e juvenis foram significativamente menores que as demais faixas etárias. A variável DDV conferiu ao útero, um formato menos globóide e mais alongado do que nas fêmeas subadultas e adultas.

Na Tabela 1 verificou-se o efeito da faixa etária nas variáveis uterinas (média \pm desvio padrão) em fêmeas de *Aotus azarai infulatus*. Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) em função do efeito da idade sobre a maioria das variáveis analisadas. À medida que a faixa etária aumentou, houve tendência de aumento do VU. Entretanto, essas comparações foram mais significativas na transição da fase juvenil para a fase subadulta. Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis uterinas em relação à interação entre as faixas etárias e o número de partos das fêmeas.

A Correlação de Pearson realizada entre os pesos das fêmeas e o VU apresentou coeficiente de correlação (r) positivo, com significância estatística ($r = 0,5340$, $p < 0,01$). Quando foi avaliada a correlação entre a idade dos animais e VU, observamos a mesma tendência ($r = 0,6498$; $p < 0,01$).

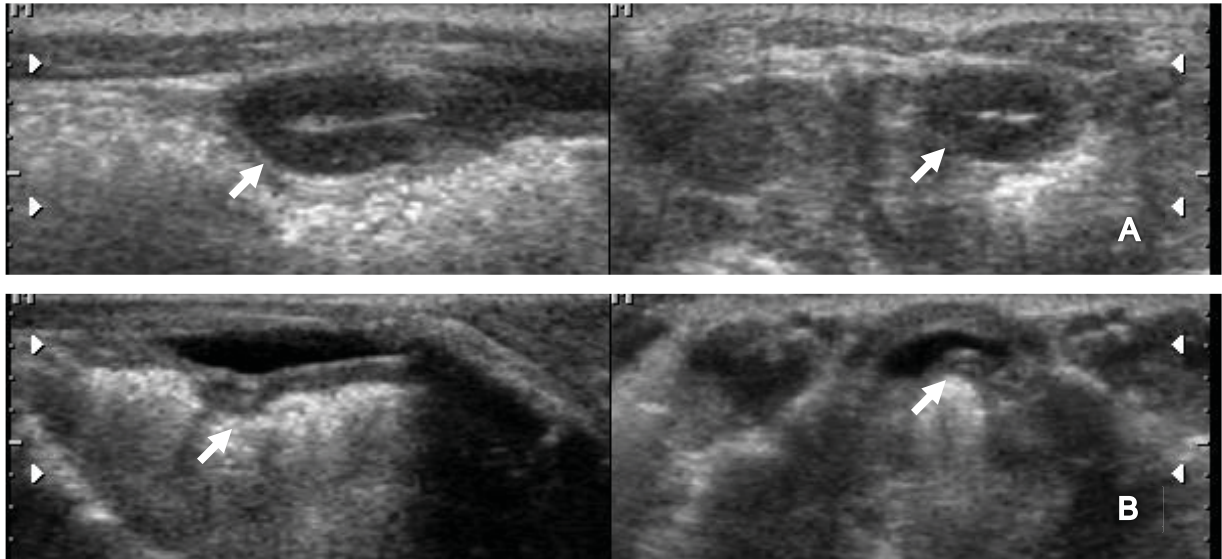


Figura 1. (A) Imagem ultrassonográfica do útero de fêmea de macaco-da-noite adulta em corte sagital e transversal. Contornos regulares e visibilização do endométrio. (Setas); (B) Imagem ultrassonográfica do útero de fêmea infantil apresentando aspecto mais alongado e menos globóide em corte sagital e transversal (Setas). (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Tabela 1 – Efeito da faixa etária nas variáveis uterinas (média \pm desvio padrão) em fêmeas de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Variáveis uterinas	Infantil 0-150 dias	Juvenil 151-364 dias	Subadulto 1 a 2 anos	Adulto Jovem 3 a 4 anos	Adulto > de 5 anos
DCC (cm)	0,56 ^c \pm 0,25	0,90 ^c \pm 0,19	1,35 ^b \pm 0,36	1,61 ^b \pm 0,24	1,93 ^a \pm 0,30
DDV (cm)	0,17 ^c \pm 0,05	0,22 ^c \pm 0,03	0,43 ^b \pm 0,14	0,55 ^b \pm 0,14	0,68 ^a \pm 0,16
DT (cm)	0,28 ^c \pm 0,07	0,25 ^c \pm 0,04	0,59 ^b \pm 0,22	0,68 ^b \pm 0,19	0,87 ^a \pm 0,18
VU (cm ³)	0,02 ^c \pm 0,01	0,03 ^c \pm 0,01	0,23 ^{bc} \pm 0,20	0,34 ^b \pm 0,21	0,64 ^a \pm 0,35

DCC, diâmetro crânio caudal; DDV, diâmetro dorso ventral; DT, diâmetro transversal, VU, volume uterino. Letras diferentes na mesma linha indicam $p < 0,05$.

Entre as fêmeas adultas, observou-se que existe o efeito do número de partos nas variáveis uterinas: DCC, DDV e DT em nível significativo para a comparação entre nulíparas e parturientes. O VU, por sua vez, variou significativamente entre as

nulíparas, primíparas e múltíparas (Figura 2). Fêmeas nulíparas apresentaram VU médio de $0,24 \pm 0,07 \text{ cm}^3$, as primíparas apresentaram VU de $0,50 \pm 0,15 \text{ cm}^3$, e as pluríparas tiveram valor médio igual a $0,94 \pm 0,33 \text{ cm}^3$ (Tabela 2).

Nas fêmeas de faixa etária infantil, os ovários não puderam ser mensurados em função da limitada visibilização das estruturas ovarianas nesta faixa etária, mesmo com a utilização de transdutor de alta frequência (12MHz), impossibilitando a avaliação adequada dos mesmos. Entretanto, os ovários foram observados em todos os animais da faixa juvenil à adulta e apresentaram ecotextura homogênea, ecogenicidade hipoecóica em relação aos órgãos adjacentes, formato elipsóide, com contornos bem definidos. Encontravam-se, em geral, próximos ao corpo uterino, porém foram observadas localizações variáveis dependendo da repleção da bexiga ou dos intestinos, além disso, o ligamento útero-ovariano (LUO) permitiu uma relativa mobilidade destes órgãos. O útero foi utilizado como referência ao exame ultrassonográfico do ovário, já que esta estrutura, em geral, tende a ter limitada visibilização em comparação ao útero. Não foi monitorada a presença de folículos, ovulação e corpo lúteo (CL).

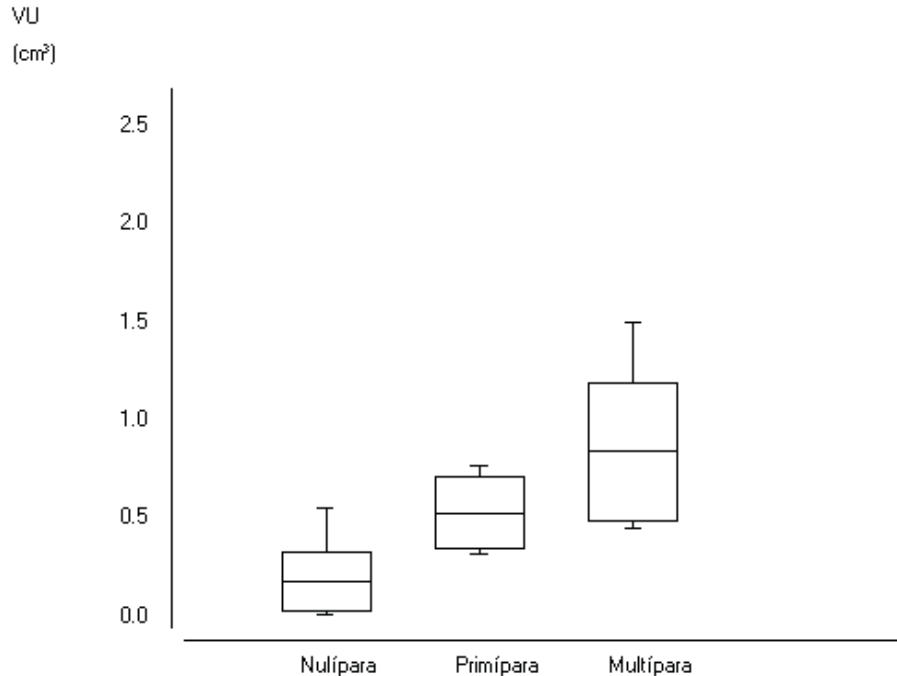


Figura 2. Boxplot descrevendo a distribuição do efeito do número de partos no volume uterino (VU) em fêmeas nulíparas (n=9), primíparas (n=10) e plurípara (n=8) de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*). (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Tabela 2 – Efeito do número de partos nas variáveis uterinas (média \pm desvio padrão) em fêmeas adultas nulíparas, primíparas e plurípara de macacos- da-noite (*Aotus azarai infulatus*) (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Variáveis uterinas	Nulípara (n=8)	Primípara (n=10)	Multípara (n=9)
DCC (cm)	1,30 ^b \pm 0,47	1,70 ^b \pm 0,19	2,07 ^a \pm 0,30
DDV (cm)	0,38 ^b \pm 0,15	0,68 ^a \pm 0,09	0,76 ^a \pm 0,14
DT (cm)	0,50 ^b \pm 0,21	0,85 ^a \pm 0,13	0,98 ^a \pm 0,12
VU (cm ³)	0,18 ^c \pm 0,15	0,53 ^b \pm 0,18	0,84 ^a \pm 0,35

DCC, diâmetro crânio caudal; DDV, diâmetro dorso ventral; DT, diâmetro transversal, VU, volume uterino. Letras diferentes na mesma linha indicam $p < 0,05$.

A correlação estabelecida entre o peso e o volume ovariano apresentou coeficiente de correlação baixo, sem significância estatística para o VOD ($r = 0,1958$, $p > 0,05$) e VOE ($r = 0,1188$, $p > 0,05$). Quando avaliamos a correlação entre a faixa etária e o volume ovariano, observamos diferença estatística para o VOD ($r = 0,4827$, $p < 0,01$) e VOE ($r = 0,5526$, $p < 0,01$)

Na tabela 3, os dados mostram a comparação entre as dimensões ovarianas e as faixas etárias, onde foi possível a observação segura do órgão. Esse aumento foi estatisticamente significativo na maioria das variáveis quando ocorreu a mudança da faixa etária juvenil para a subadulta. O VOD e VOE mostraram aumento gradativo até a faixa etária adulta. Após esse período, mantiveram-se sem alteração significativa de volume ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre as variáveis ovarianas (COD x COE; EOD x EOE; LOD x LOE; VOD x VOE), demonstrando que não houve diferença entre o volume dos ovários dentro da mesma faixa etária.

Tabela 3 – Efeito da faixa etária nas dimensões ovarianas (média \pm desvio padrão) de macacos-da-noite. (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Variáveis	Juvenil	Subadulto	Adulto Jovem	Adulto
Ovarianas	151-364 dias	1 a 2 anos	3 a 4 anos	> 5 anos
COD (cm)	0,41 ^{ca} \pm 0,09	0,73 ^{ba} \pm 0,09	0,92 ^{aa} \pm 0,12	0,90 ^{aa} \pm 0,10
COE (cm)	0,33 ^{ca} \pm 0,01	0,70 ^{ba} \pm 0,14	0,88 ^{aa} \pm 0,16	0,95 ^{aa} \pm 0,12
EOD (cm)	0,24 ^{ca} \pm 0,03	0,42 ^{ba} \pm 0,10	0,53 ^{aa} \pm 0,12	0,54 ^{aa} \pm 0,08
EOE (cm)	0,24 ^{ca} \pm 0,02	0,41 ^{ba} \pm 0,08	0,53 ^{aa} \pm 0,12	0,57 ^{aa} \pm 0,10
LOD (cm)	0,32 ^{ba} \pm 0,05	0,58 ^{ba} \pm 0,10	0,80 ^{aa} \pm 0,10	0,74 ^{aa} \pm 0,13
LOE (cm)	0,27 ^{ca} \pm 0,03	0,60 ^{ba} \pm 0,12	0,69 ^{abA} \pm 0,12	0,78 ^{aa} \pm 0,15
VOD (cm ³)	0,01 ^{ba} \pm 0,00	0,10 ^{ba} \pm 0,04	0,21 ^{aa} \pm 0,09	0,19 ^{aa} \pm 0,07
VOE (cm ³)	0,01 ^{ca} \pm 0,00	0,09 ^{bca} \pm 0,05	0,18 ^{abA} \pm 0,08	0,23 ^{aa} \pm 0,11

Médias com letras diferentes indicam $p < 0,05$. Letras maiúsculas comparação realizada nas linhas, Letras minúsculas comparação nas colunas.

2.4 DISCUSSÃO

A relação entre o tamanho dos órgãos reprodutivos das fêmeas de macacos-da-noite e a maturidade sexual é muito importante para estabelecer parâmetros reprodutivos em populações de cativeiro. Os resultados encontrados na avaliação uterina foram muito próximos dos descritos na literatura para essa mesma espécie, em estudos realizados na mesma população em cativeiro (MONTEIRO et al., 2006, MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, o presente estudo destaca-se dos anteriores por ter avaliado o efeito da idade sobre o crescimento das variáveis uterinas e ovarianas.

Em humanos, MAUAD et al. (2001) não asseguraram a acurácia das medidas uterinas, sem a visibilização ultrassonográfica do colo e localização adequada da cérvix. Em macacos-da-noite, a não visibilização adequada da cérvix não influenciou nas medidas uterinas, uma vez que os valores das variáveis uterinas encontrados foram concordantes com o estudo anatômico de HERTIG et al. (1976) e os estudos ultrassonográficos de MONTEIRO et al. (2006) e MONTEIRO et al. (2009).

As fêmeas infantis e juvenis que demonstraram útero alongado, apresentaram o formato justificado pela característica de achatamento dorsoventral descrito por MONTEIRO et al. (2009) em nulíparas independente da faixa etária.

Houve um crescimento maior do útero durante a transição da faixa de idade juvenil para a subadulta, caracterizado como o período em que os animais atingem a maturidade sexual descrita por GOZALO & MONTOYA (1990) e FERNANDEZ-DUQUE & HUNTINGTON (2002), sugerindo crescimento maior desse órgão ocorre durante a puberdade. Em mulheres, observou-se que não ocorrem mudanças no tamanho do útero até o início da puberdade, época a partir da qual ele cresce de forma rápida e homogênea (PIIROINEN & KAIHOLA 1975, ORSINI et al., 1984). Fato semelhante ao observado por HABER (1994), que avaliou o útero e os ovários de 178 adolescentes de idade entre o nascimento e 14 anos e encontrou maior crescimento das variáveis durante o período puberal. MAUAD et al. (2003) também observou esta relação entre a maturidade feminina e o volume uterino.

Em *Aotus*, a alta correlação encontrada entre os pesos e os volumes uterinos foi particular a este estudo, visto que demais trabalhos em humanos (COHEN et al., 1990) e também no gênero *Aotus* (MONTEIRO et al., 2009) não observaram relação entre as variáveis peso e VU. Isto sugere um aumento do VU relacionado com o ganho de peso em função da idade. Em *Macaca fuscata*, observamos que os tamanhos do útero de fêmeas maduras sexualmente foram maiores do que o de fêmeas imaturas (HAYAMA et al., 1997). Em humanos, foi demonstrada uma correlação positiva entre a faixa etária e o volume uterino na faixa dos 10 aos 40 anos (MAUAD et al., 2003). Esse resultado é similar ao encontrado no presente estudo; ou seja, a medida que a faixa etária aumenta, o volume uterino de macacos-da-noite também aumenta.

Semelhante aos estudos de MONTEIRO et al. (2006) e MONTEIRO et al. (2009), as faixas etárias analisadas no estudo de comparação entre o VU e o número de partos foram aquelas que possuíam fêmeas sexualmente maduras, acasaladas e em reprodução. O número de partos foi fator determinante no aumento da maioria das variáveis uterinas e principalmente do VU, em *Aotus azarai infulatus*. Em humanos, estudo semelhante foi conduzido por MAUAD et al. (2001), que observaram também em mulheres, a variação do volume uterino em função do número de partos, utilizando o exame de ultrassom. A fraca interação presente entre a faixa etária e o número de partos é um indicativo de que o número de partos é o mais importante fator de crescimento uterino após o estímulo hormonal do período de maturidade sexual.

O estudo da estrutura ovariana nessa espécie por meio da ultrassonografia é recente e tem se mostrado dificultosa inclusive em fêmeas adultas. A grande mobilidade do LUO e a proximidade entre os ovários obrigam a uma varredura cuidadosa do transdutor sobre a superfície abdominal (MONTEIRO et al., 2009). A não visualização ovariana em fêmeas infantis deve estar relacionada ao tecido intersticial deste órgão que é composto por apenas um tipo celular em fêmeas jovens tornando a ecogenicidade do órgão homogênea (VERAS, 2004). Fato semelhante ao que ocorreu impedindo a observação de folículos durante os exames, devido à constituição do parênquima ovariano descrito por ECKSTEIN (1958) e HERTIG et al. (1976).

Os valores das variáveis ovarianas estão de acordo com os achados de MONTEIRO et al. (2009). Os resultados demonstraram que as dimensões ovarianas aumentam em função da faixa etária. O crescimento ovariano deve ser relacionado mais à faixa etária em fêmeas de macacos-da-noite, do que ao peso, por causa da correlação significativa entre as faixas etárias e VOD e VOE. O aumento progressivo do volume dos ovários em função da idade foi observado em primatas da espécie *Macaca fuscata fuscata* (NOZAKI et al., 1997) e também em humanos (LASS & BRINSDEN, 1999), mas não havia antes sido descrito para os *Aotus*. O período de maturidade sexual da espécie, descrito por DIXSON (1994) coincidiu com o período de maior crescimento dos ovários em nosso estudo, e tem provável relação com ação hormonal e o início da atividade cíclica com consequente presença de suas estruturas, como folículos e CL.

O VOD e VOE também não variaram significativamente entre as adultas, sugerindo que não havia animais em fase de senescência reprodutiva ou a presença de processos patológicos. Dessa forma, já que não houve a visibilização de CL e folículos, apenas estudos endocrinológicos e histológicos associados à ultrassonografia poderiam confirmar esta relação para macacos-da-noite.

2.5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que há uma enorme necessidade de apoiar os estudos voltados à obtenção de maior conhecimento sobre reprodução em cativeiro da fauna de primatas na Amazônia, para os quais informações básicas sobre uma ampla gama de aspectos de sua biologia reprodutiva, ainda são escassas. Além disso, a pesquisa sobre a reprodução de primatas neotropicais em cativeiro é importante porque pode aumentar o desempenho reprodutivo das espécies utilizadas na pesquisa biomédica e eliminar a necessidade de usar animais de vida livre. Neste contexto, os resultados apresentados neste estudo podem contribuir para aumentar o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de macacos-da-noite, pois evidenciaram que o volume uterino dos macacos-da-noite é diretamente proporcional ao peso, à idade e ao número de partos, assim como o volume ovariano é proporcional ao peso e a idade das fêmeas e que o período de maior crescimento ovariano corresponde ao intervalo entre os 150 dias de vida e a maturidade sexual.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO EVENTO FOLICULAR DE MACACO-DA-NOITE (*Aotus azarai infulatus*) POR ULTRASSOM MODO B E DOPPLER E CITOLOGIA VAGINAL

RESUMO – Realizou-se exame ultrassonográfico para determinação da viabilidade da técnica, associado à citologia vaginal para o estudo do evento folicular em fêmeas de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*). Foram utilizados 12 animais, condicionados ao exame ultrassonográfico. Os animais foram analisados durante três meses consecutivos, a cada 48 horas, para avaliação e mapeamento do padrão do crescimento folicular em ambos os ovários, avaliação por meio da dopplerfluxometria das alterações hemodinâmicas locais durante o período peri-ovulatório, e por colpocitologia, afim de avaliar o padrão de proliferação das células vaginais em função da presença de folículos. As fêmeas apresentaram 44 eventos de crescimento folicular, com duas a três ondas foliculares cada, com intervalo médio de $17 \pm 1,13$ (média \pm erro padrão) dias entre eles. Os índices, IR e IP demonstraram a alteração na atividade hemodinâmica em função do crescimento folicular com diminuição dos índices, IR = $0,79 \pm 0,06$ ($p < 0,05$) e IP = $1,80 \pm 0,34$ ($p < 0,05$), próximo ao período com folículos de maior diâmetro. A citologia vaginal não foi eficaz para determinar as fases do ciclo ovariano. O ultrassom mostrou-se um bom método auxiliar para o monitoramento do evento folicular de macacos-da-noite, em modo-B e Doppler.

Palavras-Chave: *Aotus* sp.; colpocitologia; doppler; foliculogênese; ginecologia; primatas neotropicais

CHAPTER 3 – STUDY OF FOLLICULAR EVENT IN OWL MONKEYS (*Aotus azarai infulatus*) BY B-MODE AND DOPPLER ULTRASOUND AND VAGINAL CYTOLOGY

SUMMARY – Ultrasonography was performed to determine the viability of the technic associated to vaginal cytology for the study in female follicular the owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*). We used 12 animals, used to ultrasound examination. The animals were analyzed for three consecutive months, every 48 hours for evaluation and mapping of follicular growth in both ovaries, by the Doppler ultrasound assessment of local hemodynamic changes during the peri-ovulatory, and cytology in order to analyze the pattern of vaginal cell proliferation due to follicles. Females had 44 events of follicular growth, with two to three follicular waves each, with a mean interval of 17 ± 1.13 (mean \pm SEM) days between them. The indexes, RI and PI showed the change in hemodynamic activity as a function of follicular growth with decreasing rates, $RI = 0.79 \pm 0.06$ ($p < 0.05$) and $PI = 1.80 \pm 0.34$ ($p < 0.05$), with follicles around the time of greatest diameter. The vaginal cytology was not effective for determining stages of ovarian cycle. Ultrasound proved to be a good auxiliar method for follicular event monitoring in owl monkeys, by B-mode and Doppler.

Keywords: *Aotus* sp. cytology; folliculogenesis; gynecology; hemodynamics; neotropical primates

3.1 INTRODUÇÃO

Os primatas não humanos são animais extremamente importantes para a biodiversidade, uma vez que contribuem com a variedade de suas espécies dentro do ecossistema (WOLFE et al., 2000). Reverter o quadro de desaparecimento de espécies de PNH ameaçados de extinção é um dos objetivos de pesquisas envolvendo a reprodução de primatas. Pesquisas desenvolvidas com animais criados em condições controladas fornecem informações relevantes sobre a base fisiológica dos eventos reprodutivos.

O Centro Nacional de Primatas (CENP), instituição vinculada ao Instituto Evandro Chagas e à secretaria de vigilância em saúde do Ministério da Saúde, está voltado ao desenvolvimento de pesquisas biomédicas na região Amazônica e possui uma colônia de macacos-da-noite destinada a esses estudos reprodutivos. A reprodução em cativeiro da espécie já foi considerada difícil (DIXSON, 1994). MÁLAGA et al. (1997) sugeriram, que a capacidade reprodutiva de macacos-da-noite depende de práticas de manejo que simulem ao máximo a estrutura social observada em seu ambiente natural.

Nos últimos anos, aumentaram os estudos relacionados à reprodução em cativeiro de animais do gênero *Aotus* (MONTEIRO et al., 2006; VALLE et al., 2006; SCHULER et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; SCHULER et al., 2010; COUTINHO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011a; MONTEIRO et al., 2011b). Entretanto, o sucesso reprodutivo alcançado em cativeiro, em geral, não está acompanhado de estudos básicos sobre a fisiologia reprodutiva desse gênero. O monitoramento do ciclo estral é um procedimento básico, mesmo que sua execução em animais selvagens seja mais complexa.

Com o advento de equipamentos cada vez mais modernos, a ultrassonografia tem se tornado uma excelente ferramenta no estudo ginecológico em primatas (MONTEIRO et al., 2009, COUTINHO et al., 2011), permitindo o acompanhamento não invasivo de órgãos internos (ORTIZ et al., 2005). Associado a outras técnicas, como a dopplerfluxometria, que tem sido utilizada no monitoramento gestacional e do ciclo em animais domésticos e selvagens (DOMINGUES & CALDAS-BUSSIÈRE, 2007) e a

citologia vaginal, técnica mais simples e barata, com excelentes resultados em primatas de ciclo menstrual, o ultrassom pode ser utilizado como uma ferramenta para monitorar o evento folicular de macacos-da-noite.

O presente estudo tem como objetivo monitorar o evento folicular de macacos-da-noite e ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva dessa espécie por meio da ultrassonografia, doppler e citologia vaginal.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Centro Nacional de Primatas (CENP/Ananindeua, PA). Foram utilizadas 12 fêmeas adultas, pertencentes à colônia de reprodução de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) do CENP, sendo seis multíparas, quatro primíparas e duas nulíparas. As fêmeas utilizadas foram separadas dos machos e alojadas em recintos individuais de alvenaria, revestidos em suas laterais e piso por azulejos e com tela metálica em suas extremidades superior, fundo e frente, mantidas em sistema fechado, no galpão de reprodução número I, permanecendo não acasaladas.

Todos os animais foram avaliados por meio de exames físicos e laboratoriais, além de exame coproparasitológico utilizando exame direto, técnicas de flutuação (WILLIS, 1927) e sedimentação (HOFFMANN et al., 1934).

Os animais foram alimentados conforme o manejo adotado pelo CENP, recebendo diversos tipos de frutas, legumes, raízes, tubérculos, leite, ovos, ração comercial para cebídeos⁴. Também foi fornecida suplementação diária de aminoácido a 0,5g/Kg de massa corporal, vitaminas, macro e micro minerais⁵ e água *ad libitum*.

3.2.1 Condicionamento dos animais ao exame ultrassonográfico

Diariamente, durante 30 dias, as fêmeas foram condicionadas ao exame de ultrassom, por meio de recompensa de alimentos. As fêmeas foram levadas ao ambulatório do galpão de reprodução do CENP em caixa de transporte animal e após serem retiradas da caixa, foram contidas fisicamente, com auxílio de luvas de couro, para realização do exame.

⁴ Cebidae P18 Megazoo, Rações Megazoo, Betim-MG, Brasil

⁵ Aminomix Pet - Vetnil Indústria e Produtos Veterinários Ltda, Louveira-SP, Brasil

3.2.2 Estudo ultrassonográfico do evento folicular

Foram realizados exames ultrassonográficos modo-B e Doppler Triplex da região abdominal, com intervalo de 48 horas entre eles, para o monitoramento do ciclo ovariano, durante 90 dias, totalizando 45 repetições para cada animal.

As fêmeas, após contenção, foram colocadas em posição supina e foi realizada a tricotomia da região abdominal, sempre que necessário. Para auxílio no exame, foi utilizado gel a base de água. Durante a realização do exame as fêmeas foram recompensadas com diversos tipos de frutas, seguindo os métodos descritos por MONTEIRO et al. (2009) e MONTEIRO et al. (2011a).

Utilizou-se o equipamento de ultrassom MyLab30 VET Gold⁶, equipado com transdutor linear multifrequencial (LA435 - 6 a 18 MHz). As imagens obtidas foram analisadas em monitor de LCD 15" de alta performance, realizadas a cega por meio de um avaliador experiente, objetivando-se localizar e avaliar os ovários de acordo com tamanho, forma, posição, padrão de crescimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo.

A identificação dos folículos foi definida pela visibilização de estruturas com conteúdo anecogênico e de contorno regular no estroma ovariano. Para estimar a ovulação, o parâmetro utilizado foi a visibilização do folículo com maior diâmetro, seguido da não visibilização da mesma estrutura no exame seguinte. O intervalo entre dois períodos de crescimento folicular foi definido como um ciclo.

Ao modo doppler triplex foram avaliadas as características hemodinâmicas das artérias ilíacas interna direita (AIID) e esquerda (AIIE), os vasos foram identificados e avaliados em corte longitudinal. As ondas de velocidade do fluxo sanguíneo foram obtidas posicionando uma amostra do volume ao doppler colorido seguido do doppler espectral, segundo descrito por DOMINGUES et al. (2007). Os índices de resistência (IR) e pulsatividade (IP) foram calculados automaticamente pelo equipamento após medição adequada da imagem congelada, utilizando os calipers.

⁶ Esaote, Genoa Via A. Siffredi, 58 16153 Genova, Itália.

Os resultados dos cálculos ginecológicos foram resumidos em relatórios de exame de ultrassom, contidos no próprio equipamento e posteriormente gravados em dispositivo de armazenamento de dados, HD externo portátil 250 GB⁷.

3.2.3 Citologia Vaginal

Após o exame ultrassonográfico, as fêmeas passaram por exame de colpocitologia. Para a coleta foram utilizadas escovas ginecológicas cervicais⁸, com cerdas de formato levemente cônico (2.0cm de comprimento). Realizou-se previamente a limpeza da região vulvar com algodão embebido em solução fisiológica e em seguida a escova cervical foi introduzida no vestíbulo vulvar até o fundo do saco vaginal e rotacionado em sentido horário. Após a realização dos exames as fêmeas eram novamente recompensadas, seguindo os métodos descritos por MONTEIRO et al. (2009) e MONTEIRO et al. (2011a).

O material coletado foi disposto, por suave rolamento em toda superfície de lâmina para microscopia. As lâminas foram secas ao ar e devidamente identificadas, sendo coradas em panótico rápido⁹. As leituras foram realizadas em microscopia de luz¹⁰ com objetivas de 10X e 20X ou, ocasionalmente, em objetiva de 40X, para confirmação do tipo celular. A diferenciação dos tipos celulares foi realizada a partir do índice cariopicnótico segundo BLAKLEY (1969).

As células foram classificadas em três grupos formados por quatro tipos celulares: células basais e parabasais; intermediárias; e superficiais. Cem células foram contadas por lâmina e determinou-se a predominância celular de acordo com os tipos celulares citados.

Os ciclos observados foram divididos em três momentos (M1, M2 e M3), sendo M1 o primeiro dia estimado, portanto o início da fase luteínica. M2 a metade do ciclo, portanto início da fase proliferativa ou folicular e M3 o dia da observação do folículo de maior diâmetro, definido como último dia do ciclo.

⁷ Samsung eletrônica da Amazônia Ltda, Av. itauba, BR 319 km 03, Manaus-AM, Brasil

⁸ Kolplast® Kolplast ci Ltda. São Paulo-SP, Brasil

⁹ Larboclin Ltda, Pinhais - PR, Brasil

¹⁰ Leica CME, Buffalo, New York, USA

3.2.4 Análise estatística

Foram calculados parâmetros básicos da estatística descritiva para todas as variáveis analisadas, incluindo a duração média dos eventos foliculares observados e a análise dos dados ultrassonográficos doppler, comparando as médias dentre os períodos peri-ovulatório e a média de todo ciclo. Foram realizados testes de correlação de Pearson entre o número de partos e a número de eventos foliculares observados em cada fêmea.

Para avaliação dos dados de colpocitologia foi realizada análise de variância (ANOVA - um critério), com regressão polinomial e aplicado teste de média (Tukey) das médias obtidas para cada tipo celular e o período do ciclo. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de até 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS

Na avaliação física e laboratorial os animais selecionados mostraram-se saudáveis, apresentando valores hematológicos normais e coproparasitologia negativa.

O condicionamento dos animais aos exames foi eficiente após o período de aclimatação ao procedimento de contenção, durante a execução dos exames, as fêmeas se tornaram mais colaborativas. A vocalização, micção e defecação foram observadas apenas durante a captura no recinto e retirada do animal da caixa de transporte. Durante o exame ultrassonográfico, apenas tentativas de fuga foram observadas. Na colheita de exame colpocitológico as fêmeas apresentaram desconforto pela introdução da escova ginecológica na vagina e por isso, ocasionalmente defecavam.

O tempo médio de exame ultrassonográfico e colpocitológico foi de 10 minutos. As imagens adquiridas apresentaram boa qualidade e uma mensuração das dimensões dos ovários e útero foi suficiente para produzir medidas fidedignas.

3.3.1 Ultrassonografia

O ultrassom permitiu ótima visualização da estrutura ovariana, com ovários localizados em posição latero-cranial ao útero, em íntima relação com as artérias e veias ilíacas internas (Figura 3).

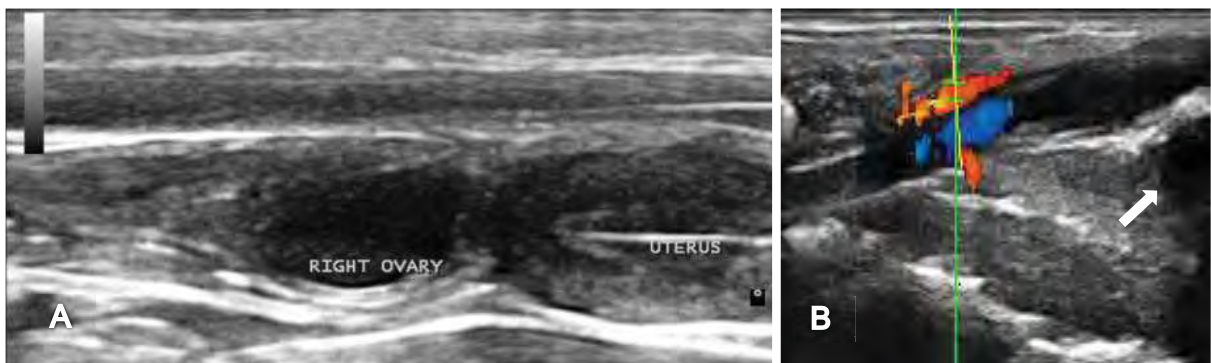


Figura 3. (A) Imagem ultrassonográfica do útero e ovário direito de fêmea primípara de macaco-da-noite em corte sagital. (B) Imagem ultrassonográfica da artéria e veia ilíaca interna esquerda em imagem Doppler colorido e parte do ovário (seta) (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Os ovários apresentaram formato arredondado, levemente ovalado, ecogenicidade homogênea, hipocóica e volume de $0,32 \pm 0,05 \text{ cm}^3$ (Média \pm D.P.) para o ovário direito e $0,38 \pm 0,09 \text{ cm}^3$ para o esquerdo. Observaram-se folículos em crescimento e em vários estágios de desenvolvimento.

Os folículos apresentaram aspecto ecogênico normal e crescimento mensurável na ultrassonografia, com ecogenicidade homogênea, anecóica, formato arredondado, ocupando o estroma ovariano e em geral não extrapolando os bordos do órgão. A presença dos folículos tornou o estroma ovariano heterogêneo ao ultrassom e permitiu diferenciá-los de CL. A visualização folicular ocorreu de forma frequente em intervalo médio de $17 \pm 1,13$ dias (média \pm E.P).

Foram observados 44 eventos compatíveis com o crescimento folicular, com 22 eventos em cada ovário. Duas fêmeas apresentaram dois eventos, quatro fêmeas apresentaram três, outras duas apresentaram quatro eventos e outras quatro apresentaram cinco. Dentre estes eventos, 21 (47%) apresentaram duas ou três ondas foliculares identificadas pela ultrassonografia, com crescimento e regressão de folículos não dominantes antes da expressão do folículo com maior diâmetro (Figura 4). Não houve correlação entre o número de partos e a presença de ciclos regulares ($r = 0,2315$ $p > 0,05$) e todas as fêmeas apresentaram pelo menos um ciclo dentro do intervalo médio.



Figura 4. Imagem ultrassonográfica do ovário direito de fêmea primípara em corte transversal, apresentando folículo pré-ovulatório (seta). (CENP – Ananindeua/PA, 2012).

O diâmetro médio dos folículos foi de 0,37 cm, com folículos de até 0,8 cm e não menores a 0,2 cm. O CL não foi visível, portanto os folículos maiores que 0,4 cm 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.

3.3.2 Dopplerfluxometria das artérias ilíacas

As artérias ovarianas e uterinas foram de difícil identificação e com isso as AIID e AIIE, de maior calibre, foram mais bem visualizadas e por isso, foram utilizadas para o exame de dopplerfluxometria. As AIID e AIIE bem visualizadas em modo B estão paralelas às veias ilíacas internas, com espectro de ondas normais, bem visualizado em modo Doppler (Figura 5).

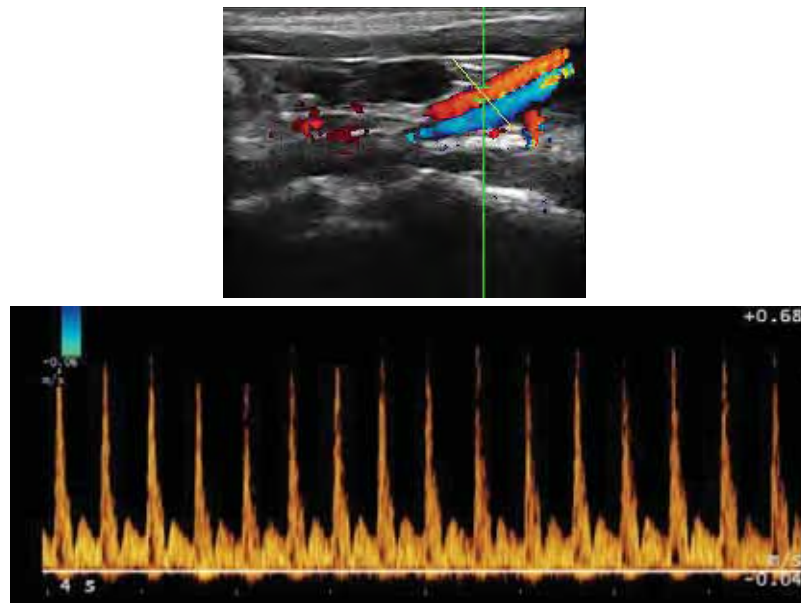


Figura 5. Imagem ultrassonográfica da artéria e veia íliaca interna direita com espectro de ondas normais, bem visualizadas em modo Triplex doppler em macaco-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

O IR apresentou variação significativa ($p < 0,05$) tendo sido o valor médio na AIID $0,84 \pm 0,07$, maior que o IR de exames próximos a observação de folículos de maior diâmetro (FMD), até 96 horas antes ou depois, no mesmo vaso ($0,79 \pm 0,06$). Para AIIE o IR sofreu a mesma variação, sendo a média igual a $0,85 \pm 0,06$, com diminuição ($0,78 \pm 0,04$) no período ovulatório.

O IP mostrou discreta diminuição próxima a possível ovulação, com aumento após este período. O IP médio da AIID apresentou média de $2,24 \pm 0,52$, enquanto no período próximo a visibilização de folículos com maior diâmetro, esse valor baixou para $1,80 \pm 0,34$ ($p < 0,05$), uma queda de quase 20%. Na AIIE, onde o IP médio foi de $2,31 \pm 0,49$ e de $1,80 \pm 0,31$, com queda pouco maior a 20 %, para período com maiores folículos ($p < 0,05$) (Tabela 4). O ovário com folículo de maior diâmetro apresentou sempre os IR e IP menores que o ovário contralateral.

Tabela 4 – Índices de resistência e pulsatividade nas artérias ilíacas esquerda e direita (média \pm D.P.), valor médio e valor na presença de folículo de maior diâmetro (FMD) em fêmeas de macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Artéria/Índice	IR		IP	
	Médio	FMD	Médio	FMD
AIID	$0,84^a \pm 0,07$	$0,79^b \pm 0,06$	$2,24^a \pm 0,52$	$1,80^b \pm 0,34$
AIIE	$0,85^a \pm 0,06$	$0,78^b \pm 0,04$	$2,31^a \pm 0,49$	$1,80^b \pm 0,31$

Médias com letras diferentes indicam $p < 0,05$. Letras minúsculas comparação realizada entre as colunas para cada índice.

3.3.3 Citologia vaginal

A utilização da escova ginecológica mostrou-se adequada para realizar o exame na espécie, promovendo leve incômodo mecânico, porém sem promover lesão vulvar ou vaginal. A presença de secreção vaginal mucosserosa, mostrou-se concidente com o período de observação de folículos pela ultrassonografia. O exame colpocitológico permitiu a visibilização de todos os tipos celulares (basais/parabasais; intermediárias e superficiais) em 540 exames.

As células basais, parabasais, intermediárias e superficiais foram caracterizadas de acordo com os estudos de BLAKLEY (1969) e DIXSON (1983). Comparativamente, as células basais e parabasais foram predominantes ($p < 0,05$) ao longo de todo o estudo e não houve diferenças estatísticas entre os tipos celulares influenciadas pela presença de folículos ($p > 0,05$), como descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Frequência (Média \pm D.P.) de células basais/parabasais, intermediárias e superficiais observadas no ciclo ovariano em macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus*), por meio do esfregaço vaginal (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Dia	Basais/ Parabasais	Intermediárias	Superficiais
1	50,12 \pm 20,14 ^{aA}	28,69 \pm 14,42 ^{bA}	21,17 \pm 16,36 ^{bA}
3	48,97 \pm 19,81 ^{aA}	29,42 \pm 14,77 ^{bA}	21,60 \pm 19,38 ^{bA}
5	47,87 \pm 20,33 ^{aA}	29,30 \pm 16,00 ^{bA}	22,82 \pm 14,61 ^{bA}
7	39,52 \pm 18,68 ^{aA}	29,13 \pm 13,95 ^{bA}	28,71 \pm 19,59 ^{bA}
9	46,14 \pm 17,37 ^{aA}	28,82 \pm 16,18 ^{bA}	25,02 \pm 13,63 ^{bA}
11	45,48 \pm 18,51 ^{aA}	29,25 \pm 14,70 ^{bA}	25,25 \pm 17,78 ^{bA}
13	50,34 \pm 22,64 ^{aA}	27,71 \pm 14,34 ^{bA}	21,93 \pm 18,74 ^{bA}
15	44,42 \pm 19,58 ^{aA}	27,39 \pm 13,36 ^{bA}	28,17 \pm 17,30 ^{bA}
17	47,54 \pm 16,98 ^{aA}	30,20 \pm 09,98 ^{bA}	22,25 \pm 14,32 ^{bA}

Médias com letras diferentes indicam $p < 0,05$. Letras maiúsculas comparação realizada nas linhas, Letras minúsculas comparação nas colunas.

Quando foram comparados os momentos do ciclo estimado (M1, M2 e M3) e a predominância dos tipos celulares, também não se observou diferença estatística ($p > 0,05$). Foi possível verificar que não houve diferença entre os tipos celulares nos períodos foliculares e luteínico ($p > 0,05$) do ciclo de macacos-da-noite e com isso, não se determinou a duração de cada uma das fases (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequência de células basais/parabasais, intermediárias e superficiais presentes em três momentos (início - M1, meio - M2 e fim - M3) do ciclo ovariano de *Aotus azarai infulatus* mantidos em cativeiro (CENP – Ananindeua/PA, 2011).

Tipos Celulares	Momentos	Média ± D.P.	Variação	
			Mínimo	Máximo
Basais/parabasais	M1	50,12 ± 20,14 ^a	7,00	86,00
	M2	45,05 ± 15,60 ^a	7,00	82,00
	M3	45,64 ± 18,74 ^a	3,00	53,00
Intermediárias	M1	28,69 ± 14,42 ^a	5,00	70,00
	M2	29,05 ± 16,40 ^a	4,00	85,00
	M3	29,82 ± 11,86 ^a	9,00	62,00
Superficiais	M1	21,17 ± 16,36 ^a	2,00	78,00
	M2	23,89 ± 12,88 ^a	3,00	53,00
	M3	24,53 ± 16,92 ^a	1,00	72,00

Médias com letras iguais entre linhas indicam $p > 0,05$, dentro de cada tipo celular.

3.4 DISCUSSÃO

Diferente dos trabalhos, realizados por MONTEIRO et al. (2006), MONTEIRO et al. (2009) e COUTINHO et al. (2011), que adotaram o sistema de três medições para cada ovário, neste estudo as mensurações ovarianas, para o cálculo do volume dos ovários foram realizadas a partir de uma única imagem. Com a utilização de um equipamento mais avançado e transdutor de alta resolução, em comparação ao utilizado nos estudos anteriores, percebeu-se que a análise das imagens após os exames foi viável e contribuiu para a agilidade dos exames, com menor tempo de contenção e consequente diminuição do comportamento de estresse.

A diminuição do comportamento de estresse dos animais durante o estudo foi importante para evitar que mecanismos neuroendócrinos interferissem no ciclo estral. Sabe-se que o aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pode inibir a ação de hormônios reprodutivos e consequentemente interromper um ciclo ou levar o animal ao anestro (RIVIER & RIVEST, 1991). Juntamente ao menor tempo de contenção pela técnica de exame ultrassonográfico, o período de adaptação e a oferta de frutas tiveram resultados positivos, semelhantes ao de MONTEIRO et al. (2009) e MONTEIRO et al. (2011a). A mudança do comportamento dos animais durante o estudo e a observação frequente de folículos demonstra a eficácia da técnica.

Os resultados encontrados na citologia vaginal corroboram com a literatura (CICMANEK & CAMPBELL, 1977; BONNEY & SETCHELL, 1980 e DIXSON, 1983), que não encontra padrões repetidos de proliferação e diferenciação celulares em função de um evento cíclico em macacos-da-noite. Outros autores citam a mesma característica para outras espécies neotropicais (HAMPTON & HAMPTON, 1979; HEARN, 1978; EPPLE & KATZ, 1983; MORAES et al., 2001). Todos utilizaram swabs para realizar suas coletas.

O presente estudo não concorda com FERREIRA (1998) que realizou estudo similar em *Aotus azarai infulatus*, e afirma que a presença de células superficiais durante a fase de estro pode ser observada pela citologia vaginal, com predominância de 70%. Esse autor utilizou a mesma população do presente trabalho, utilizando swabs

e não escovas ginecológicas, o que poderia ter contribuído para um resultado diferente, em função da capacidade distinta dos dois materiais de promover espoliação do epitélio. Entretanto, a maior capacidade espoliativa da escova deve levar a maior apreensão tanto de células basais, quanto intermediárias e superficiais. Portanto a maior capacidade de apreensão celular da escova, que possibilitou uma amostra celular de qualidade, diante de um epitélio modificado pela ação hormonal, não promoveu esfregaço vaginal com diferenças significativas entre os tipos celulares, provavelmente em função da não modificação deste epitélio durante o evento folicular.

Em PN, a citologia é um método eficaz na caracterização do período estral, com trabalhos em algumas espécies, como *Cebus apella* (WRIGHT & BUSH, 1977; ORTIZ et al., 2005; DOMINGUES et al., 2007), *Alouatta caraya* (KUGELMEIER et al., 2011), *Atelles geoffroyi* (HERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2007). O estudo de FERREIRA (1998) foi o único que apresentou resultados significativos para a predominância de células superficiais em *Aotus* sp.

BONNEY et al. (1979) observaram que não existe clara diferença hormonal entre as fases luteais e folicular em macacos-da-noite, por meio de dosagem de estrógeno e progesterona plasmáticas por radioimunoensaio, explicando os resultados obtidos no presente trabalho. Uma vez que não há diferença hormonal marcante entre as fases do ciclo, não ocorre a diferença entre os tipos celulares encontrados no exame de colpocitologia.

O período médio de 17 dias entre a observação de folículos de maior diâmetro pôde indicar um intervalo cíclico, que está bem próximo da média encontrada nos estudos de BONNEY et al. (1979) e FERREIRA (1998) para o ciclo de macacos-da-noite. A não visibilização do CL, pela ultrassonografia, dificultou a determinação dos períodos folicular e luteínico, que foram estimados a partir do intervalo de $17 \pm 1,13$ dias. FERNANDEZ-DUQUE et al. (2011) dosando hormônios a partir de amostras fecais de animais de vida livre, determinaram um ciclo médio de 22 ± 3 dias, diferente do encontrado em animais em cativeiro. O ambiente controlado e as condições nutricionais podem ser responsáveis por essa diferença, porém novos estudos devem ser conduzidos.

Nesta espécie, o útero é o melhor referencial anatômico para a localização dos ovários. A avaliação ultrassonográfica ovariana mostrou resultados semelhantes aos descritos por MONTEIRO et al. (2006), MONTEIRO et al. (2009) e COUTINHO et al. (2011). O volume ovariano superior ao observado nos estudos anteriores em macacos-da-noite foi influenciado pela presença de folículos, apenas observados no presente estudo que tornaram o volume médio dos ovários maior que o descrito anteriormente.

O ovário esquerdo foi significativamente maior que o ovário direito, diferente do estudo de MONTEIRO et al. (2009), e semelhante ao que acontece em humanos, e ao encontrado no estudo de COUTINHO et al. (2011). Entretanto, isso não demonstra uma maior atividade ovariana, diferente ao descrito por BRASIL (2008) em *Leontopithecus rosalia*.

Os folículos foram identificados como descrito por MONTEIRO et al. (2009), apresentando diâmetro semelhante ao encontrado em outras espécies de PN (DOMINGUES et al., 2007; BRASIL, 2008; ORTIZ et al., 2005). O padrão de crescimento folicular observado em quase 50% dos eventos foi o de ondas foliculares, semelhante às demais espécies de mamíferos domésticos (GINTHER et al., 1998; GINTHER, 2000; GINTHER, 2001; EVANS, 2003), sendo que a descrição de ondas foliculares em *Aotus* sp. não havia sido descrita anteriormente, e apenas as mulheres dentre os primatas, possuem essa característica (HODGEN, 1982).

Não existem dados sobre dopplerfluxometria na avaliação da função ovariana em *Aotus* sp.. DOMINGUES et al. (2007), realizaram exame doppler em *Cebus apella* utilizando contenção química que segundo GASCHEN et al. (2001) têm efeitos hemodinâmicos, podendo alterar o formato das ondas do exame. Com isso, outra característica única deste trabalho foi a realização dos exames apenas utilizando contenção física.

As artérias uterinas e ovarianas foram os vasos de escolha nos estudos realizados em *Cebus* (DOMINGUES et al., 2007) e em humanos (BABBER et al., 1988; THALER et al., 1990; CAETANO et al., 1995) para análises do IR e IP. Em *Aotus*, estes vasos possuem calibres razoavelmente diminutos e, portanto, a difícil localização ultrassonográfica e a colaboração limitada dos animais para a realização do exame

doppler inviabilizam a mensuração desses parâmetros. Para os vasos relacionados à irrigação de órgãos do sistema reprodutivo, a artéria ilíaca é o vaso de maior calibre e por isso, melhor visibilizado no exame ultrassonográfico. Segundo THALER et al. (1990), a forma do sinal ou onda doppler reflete a impedância na vascularização situada posteriormente ao local da medida, portanto a avaliação das artérias ilíacas seria válida para rastrear o comportamento hemodinâmico nos ovários em função do evento folicular.

Segundo COLLINS et al. (1991), o IR e o IP diminuíram progressivamente no início da elevação do pico de LH, momento em que se observou a presença de folículos pré-ovulatórios em estudo realizado em mulheres, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. A atividade dos hormônios sexuais e fatores do crescimento aumentam o metabolismo na região ovariana para o crescimento folicular, ovulação e formação do CL nas fêmeas, com neovascularização e dilatação dos vasos locais, indicando que a perfusão sanguínea ovariana também tem características cíclicas, com aumento no período periovulatório, e com a visibilização? deste aumento na modificação dos índices vasculares, assim como descrito por KÖSTER et al. (2001), em trabalho realizado em cadelas e DOMINGUES et al. (2007), que considerou que em *Cebus apela*, os índices IP e IR sofrem alteração nos dias próximos a ovulação.

3.5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que na metodologia adotada, a citologia vaginal não foi um método eficaz para determinar as fases do ciclo ovariano e não se modifica em função do evento folicular de macacos-da-noite. O ultrassom mostrou-se um bom método auxiliar para o monitoramento do ciclo ovariano de macacos-da-noite, em modo-B e doppler, que se mostrou uma alternativa para o acompanhamento do evento cíclico nessa espécie e em outros primatas.

4 REFERÊNCIAS

ABEE, C. R. Alternative new world primate models for non-AIDS Research. **ILAR Journal**, Washington, v. 44, p. 231-235, 2003.

ABLASHI, D. V.; CHOPRA, H. C.; AMSTRONG, G. R. A cytomegalovirus isolated from an owl monkey. **Laboratory Animal Science**, Memphis, 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**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 199-213, 1974. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90936-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(74)90936-6).

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**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 9, p. 377-382, 2007.

AQUINO, R.; ENCARNACIÓN, F. Owl monkey populations in Latin America: field work and conservation. In: BAER, J. F.; WELLER, R. E.; KAKAOMA, I. **Aotus: the owl monkey**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 59-95.

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**, Hoboken, v. 47, n. 3, p. 260-268, 1995. DOI: 10.1002/jmv.1890470312

ASHLEY, M. V.; VAUGHN, J. L. Owl monkeys (*Aotus*) are highly divergent in mitochondrial cytochrome oxidase (COII) sequences. **International Journal of Primatology**, New York, v 16, n. 5, p. 793-806, 1995. DOI: 10.1007/BF02735720.

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

BABER, R. J.; MCSWEENEY, M. B.; GILL, R. W.; PORTER, R. N.; PICKER, R. H.; WARREN, P. S.; KOSSOF, G.; SAUNDERS, D. M. Transvaginal pulsed doppler ultrasound assessment of blood flow to the corpus luteum in IVF patients following embryo transfer. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 95, n. 12, p. 1226-1230, 1988.

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**, Memphis, v. 26, n. 6.2, p. 1104-1112, 1976.

BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. **Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and** . 1 ed. San Diego:Academic Press, 1995. v. 1

BICUDO, A. L. C.; MAMPRIM, M. J.; LOPES, M. D.; VULCANO, L. C.; DERUSSI, A. A. P. Avaliação ultra-sonográfica convencional e dopplerfluxométrica durante a fase folicular do ciclo estral de cadelas. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 507-518, 2010.

BLAKLEY, G. A. Vaginal cytology and luteinizing hormone levels in the *Pongo pygmaeus* (Orang-utan). In: HOFER, H.O. **Recent advances in Primatology**. Proceedings of the Second International Congress of Primatology Atlanta, GA, 1968. Berne: Druckerei Benteli AG, 1969. v. 2, p. 22-29.

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**, Oxford, v. 12, p. 417-421, 1980. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-4731\(80\)90301-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-4731(80)90301-5).

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**, Cambridge, v. 56, p. 271-280, 1979. doi: 10.1530/jrf.0.0560271.

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.

BUENO, A. P.; PEREIRA, R. E. P. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres e seus aspectos éticos e conservacionistas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 11, 2008.

CAETANO, J. P. J.; ZIEGLER, D. DE B.; VASCONCELOS; F. S. C.; MUZZI, B. F. JR.; ALMEIDA; J. O.; MARINHO, R.; FRYDMAN, R. Estudo da vascularização ovariana através da dopplerfluxometria transvaginal colorida (DTC). **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, Rio de Janeiro, v 105, n. 7, p. 289-298, 1995.

CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2009, p. 288.

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

CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L. M. S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1 ed. Belém: MMA, 2008. p. 681-702,

CICMANEK, J. C.; CAMPBELL, A. K. Breeding the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) in a laboratory environment. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v.27, n.4, p. 512-517, 1977.

COHEN, H. L.; TICE, H. M.; MANDEL, F. S. Ovarian volumes measured by us: bigger than we think. **Radiology**, Oak Brook, v. 177, n.1, p. 189-192, 1990.

COLLINS, W.; JURKOVIC, D.; BOURNET, T.; KURJAK, A.; CAMPBELL, S.; Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. **Human Reproduction**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 319, 1991.

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**, Copenhagen, v. 40, n. 5, p. 310-316, 2011. doi: 10.1111/j.1600-0684.2011.00476.x.

DEFLER, T. R.; BUENO, M. L. *Aotus* Diversity and the Species Problem. **Primate Conservation**, Arlington, v. 22, n. 1, p. 55-70, 2007. <http://dx.doi.org/10.1896/052.022.0104>.

DIXSON, A. F. The owl monkey (*Aotus trivirgatus*). In: HEARN, J. P. **Journal of Reproduction in New World Primates**. Lancaster: MPT Press Limited, 1983. p. 71-113.

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.

DIXSON, A. F.; FLEMING, D. Parental behaviour and infant development in owl monkeys (*Aotus trivirgatus griseimembra*). **Journal of Zoology**, Oxford, v. 194, n. 1, p. 25–39, 1981. DOI: 10.1111/j.1469-7998.1981.tb04576.x

DOMINGUES, S. F. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de primatas neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, n. 1/2, p. 35-38, 2007.

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**, Philadelphia, v. 68, n. 9, p. 1251-1259, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.023>.

EPPLE, G.; KATZ, Y. The saddle back tamarin and other tamarins. In: HEARN, J. P. **Reproduction in New World Primates**. ed. Lancaster: MTP Press, 1983. p.115-148.

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

EVANS, A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 289-306, 2003.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3. ed. Philadelphia:Saunders, 2004. v. 1, p. 547-571.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; HUNTINGTON, C. Disappearances of individuals from social groups have implications for understanding natal dispersal in monogamous owl monkeys (*Aotus azarae*). **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 57, n. 4, p. 219-225, 2002. DOI: 10.1002/ajp.10045.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; DI FIORE, A.; CARRILLO-BILBAO, G. Behavior, ecology, and demography of *Aotus vociferans* in Yasuní National Park. **International Journal of Primatology**, New York, v. 29, n. 2, p. 421-431. 2008. DOI 10.1007/s10764-008-9244-y.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; BURKE, K.; SCHOENROCK, K.; WOLOVICH, C. K.; VALEGGIA, C. R. Hormonal monitoring of reproductive status in monogamous wild female owl monkeys (*Aotus azarae*) of the argentinean chaco. **Folia Primatologica**, Basel, v. 82, n. 3, p. 143-153, 2011.

FERREIRA, H. S. **Algumas características hormonais e da citologia vaginal durante o ciclo estral da espécie *Aotus infulatus* (macaco-da-noite) (Cebidae-Primates), em cativeiro**. 1998. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, 1998.

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.

GASCHEN, L.; MENNINGER, K.; SCHUURMAN, H. J. Ultrasonography of the normal kidney in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): morphologic and Doppler findings. **Journal of Medical Primatology**, Malden, v. 29, n. 2, p. 76–84, 2001. DOI: 10.1034/j.1600-0684.2000.290205.x.

GINTHER, O. J., Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p. 61-79, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00083-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00083-X).

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular wave development in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 50, n. 4, p. 507-519, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00157-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00157-5).

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology Reproduction**, Madison, v.65, n. 3, p. 638-647, 2001. DOI: 10.1095/biolreprod65.3.638.

GOMPEL, C.; KOSS, L. G. **Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. 1 ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 1, p. 79-105.

GOZALO, A.; MONTROYA, E. Reproduction of the owl monkey (*Aotus nancyma*) (primates: Cebidae) in captivity. **Americal Journal of Primatology**, Hoboken, v. 21, n. 1, p. 61-68, 1990. DOI: 10.1002/ajp.1350210107

GUIMARÃES, M. A. B. V. Order primates (primates) - reproduction. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z. S. **Tratado de animais selvagens**. Iowa: State University Press, p. 274-278, 2001.

HABER, H. P.; MAYER, E. I. Ultrasound evaluation of uterine and ovarian size from birth to puberty. **Pediatric Radiology**, Heidelberg, v. 24, n. 1, p. 11-13. 1994. DOI: 10.1007/BF02017650.

- HAMPTON, S. H.; HAMPTON, J. K. Detection of reproductive cycles and pregnancy in tamarins (*Saguinus* sp.). In: KLEIMAN, D.G. **The Biology and Conservation of the Callitrichidae**. 1 ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 1979. p.173-179.
- HAYAMA, S.; KAMIYA, S.; NIGI, H. Morphological changes of female reproductive organs of Japanese monkeys with reproductive conditions. **Primates**, Tokyo, v. 38, n. 4, p. 359–67, 1997. DOI: 10.1007/BF02381877
- HEARN, J. P. Fertility and infertility in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. In: ROTHE, H.; WOLTERS, H. J.; HEARN, J. P. **Biology and behaviour of marmosets: Proceedings of the Marmoset Workshop**, Göttingen: Hartmut Rothe, 1978. p. 59-64.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.; MAYAGOITIA, L.; ESQUIVEL-LACROIX, C.; ROJAS-MAYA, S.; MONDRAGÓN-CEBALLOS, R. The menstrual cycle of the spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 44, n. 3, p. 183–195, 1998.
- HERRON, M. A. Feline vaginal cytologic examination. **Feline Practice**, Mission Viejo, v.7, n. 2, p. 36-39, 1977.
- HERSHKOVITZ, P. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (cebidae: platyrrhini): a preliminary report on *Aotus* taxonomy. **American Journal of Primatology**, Hoboken, v. 4, n. 3, p. 209–243, 1983. DOI: 10.1002/ajp.1350040302.
- 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**, Memphis, v. 26, n. 6, p. 1041-1067, 1976.
- HILTON-TAYLOR, C.; RYLANDS, A. B.; AGUIAR, J. M. **IUCN Red List – Neotropical Primates**. Washington D C, 2004. v. 12, p. 33-35.

HODGEN, G. D. The dominant ovarian follicle. **Fertility and Sterility**, New York, v. 38, n. 3, p. 281, 1982.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. **The Puerto Rico Journal of Public Health tropical Medicine**, Porto Rico, v. 9, n. 3, p. 283-98, 1934.

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.

HUTCHINSON, T. C. Vaginal cytology and reproduction in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Folia primatologica**, Basel, v. 12, n. 3, p. 212-223, 1970. DOI: 10.1159/000155291.

IUCN [International Union for Conservation of Nature]: **The red list of threatened species**. Disponível em: <http://www.iucn.org>. Acesso em: 13 Out. 2010.

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**. Deerfield, v 84, n. 2, p. 43-50, 2011. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.09-0759

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**, Hoboken, v. 34, n. 4, p. 319-331, 1994.

KIERULFF, M. C. M.; PROCÓPIO-DE-OLIVEIRA, P.; MARTINS, C. S.; VALLADARES-PADUA, C. B.; PORFÍRIO, S.; OLIVEIRA, M. M.; RYLANDS, A. B.; BEZERRA, A. R. G. Manejo para conservação de Primatas Brasileiros. In: BICCA-MARQUES, J. C. A primatologia no Brasil. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Primatologia**, Porto Alegre, v.10, 2007.

KRATOCHWIL, A.; URBAN, G. U.; FRIEDRICH, F. Ultrasonic tomography of the ovaries. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae**, Helsinki, v.61, n. 4, p.211-214, 1972.

KUGELMEIER, T.; VALLE, R. D. 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 of Primatology**, New York, v. 32, n. 3, p. 605–615, 2011. DOI: 10.1007/s10764-010-9490-7

LASS, A.; BRINSDEN, P. The role of ovarian volume in reproductive medicine. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 256-266, 1999. DOI: 10.1093/humupd/5.3.256.

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**, Washington, v. 40, n. 2, p. 766-772, 1983.

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.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção incluindo as listas das espécies quase ameaçadas e deficiente em dados**. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação Biobiversitas, 2005. 157 p.

MAUAD, F. F.; BEDUSCHI, A. F.; MESCHINO, R. A. G.; MAUAD, F. M.; CASANOVA, M. S.; FERREIRA, A. C. Avaliação ultrassonográfica das variações do volume uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v. 23, n. 3, p.175-179, 2001.

MAUAD, F. F.; COSTA, A. G.; SPARA, P.; FERREIRA, A. C.; PINHEIRO FILHO, L.; MAUAD, F. M.; GELONEZI, G. Volume uterino em adolescentes avaliado pela ultrassonografia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. São Paulo, v. 25, n. 9, p. 673-678. 2003.

MAVES, R. C.; ORÉ, R. M. C.; PORTER, K. R.; KOHEL, T. J. Immunogenicity and protective efficacy of a psoralen-inactivated dengue-1 virus vaccine candidate in *Aotus nancymae* monkeys. **Vaccine**, Oxford, v. 29, n. 15, p. 2691-2696, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.077>.

MENEZES, A. N.; BONVICINO, C. R.; SEUÁNEZ, H. N. Identification, classification and evolution of owl monkeys (*Aotus*, Illiger 1811). **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, p. 248, 2010. DOI: 10.1186/1471-2148-10-248.

MONTEIRO, F. O. B. **Ultra-sonografia ginecológica e obstétrica em macaco-da-noite (*Aotus azarai infulatus*) Aotidae - "Primates"**. 2007. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

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**, Hoboken, v. 35, n. 3, p. 123-130. 2006. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2006.00155.x.

MONTEIRO, F. O. B.; COUTINHO, L. N.; POMPEU, E. S. S.; CASTRO, P. H. G.; MAIA, C. E.; PEREIRA, W. L. A.; VICENTE, W. R. R. Ovarian and uterine ultrasonography in *Aotus azarai infulatus*. **International Journal of Primatology**, New York, v. 30, n. 2, p. 327-336, 2009. DOI: 10.1007/s10764-009-9346-1.

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**, Belém, v. 54, n. 1, p. 5-11, 2011a.

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**, Belo Horizonte, v. 8, n. 1-2, p. 40-46, 2011b.

MORAES, I. A. **Investigações sobre a fisiopatologia da reprodução em micos-leões (*Leontopithecus sp.*, lesson, 1840) mantidos em cativeiro (Callitrichidae - Primates)**. 2004. 156 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

MORAES, I. A.; PISSINATTI, A.; FERREIRA, A. M. R. Colpocitologia em Micos-leões (*Leontopithecus sp*): proposta de modelo para estudos de ginecologia comparada. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 142, 2001.

MURTA, C. G. V.; BATISTUTA, P. N.; CUNHA, J. S. F. Dopplerfluxometria no estudo da circulação fetal: revisão do aspecto segurança. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 365-370, 2002.

NAGLE, C. A.; MENDIZÁBAL, A. F.; LAHOZ, M. M.; PORTA, M. M.; TORRES, M. I. Transfer pathways between the ovaries and the uterus in the cebus monkeys (*cebus apella*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 248-256. 2005.

NAGLE, C. A.; DENARI, J. H. The Cebus Monkey (*Cebus apella*). In: HEARN, J. P. **Reproduction of new world primates: new models in medical science**. 1 ed. Lancaster: MTP Press, 1983. p.149-179.

NOZAKI, M.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, K. Age-related changes in ovarian morphology from birth to menopause in the Japanese monkey, *Macaca fuscata fuscata*. **Primates Journal**, Tokyo, v. 38, n. 1, p. 89-100, 1997. DOI: 10.1007/BF02385925.

OERKE, A. K.; HEISTERMANN, M.; KÜDERLING, I.; MARTIN, R. D.; HODGES, J. K. Monitoring reproduction in callitrichidae by means of ultrasonography. **Evolutionary Anthropology**, Hoboken, v.1, n. S1, p. 183-185, 2002. DOI: 10.1002/evan.10087.

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**, Hoboken, v. 39, n. 2, p. 99-113, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2345(1996)39:2<99::AID-AJP2>3.0.CO;2-M

ORSINI, L. F.; SALARDI, S.; PILU, G.; BOVICELLI, L.; CACCIARI, E.; Pelvic organs in premenarcheal girls: real time ultrasonography. **Radiology**, Oak Brook, v. 153, n. 1, p. 113-116. 1984.

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**, Hoboken, v. 66, n. 3, p. 233-244, 2005. DOI: 10.1002/ajp.20141

PERELMAN, P.; JOHNSON, W. E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H. N.; HORVATH, J. E., et al. A molecular phylogeny of living primates. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 3, 2011. doi:10.1371/journal.pgen.1001342.

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**, Tokyo, v. 34, n. 2, p. 197-204, 1993. DOI: 10.1007/BF02381390.

PIIROINEN, O.; KAIHOLA, H. L. Uterine size measured by ultrasound during the menstrual cycle. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 247-250, 1975. DOI: 10.3109/00016347509157770

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**, Maryland Heights, v. 51, p. 382–387, 2009.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic – pituitary - gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 45, n. 4, p. 523-532, 1991. doi: 10.1095/biolreprod45.4.523.

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**, Oxford, v. 27, n. 21, p. 2870-2876, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.083>.

ROSENBLUM, L. A.; NATHAN, T.; NELSON, J.; KAUFMAN, I. C. Vaginal cornification cycles in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Folia Primatologica**, Basel, v. 6, n. 1-2, p. 83-91, 1967. DOI: 10.1159/000155069.

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

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA Jr., J. S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**. Oxford, (No Prelo). DOI: 10.1111/j.1748-1090.2011.00152.x.

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**, Lima, 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**, West Sussex, v. 28, n. 4, p. 481, 2006. DOI: 10.1002/uog.3277.

SCHULER A. M.; PARKS V. L.; ABEE C. R.; SCAMMELL J. G. Ultrasonographic monitoring of a spontaneous abortion in an owl monkey (*Aotus nancymaae*). **Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 46, n. 4, p. 74-76, 2010.

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**, Hoboken, v. 36, n. 2, p.113-117, 2007. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2007.00219.x.

SHILLE, V. M.; WING, A. E.; LASLEY, B. L.; BANKS, J. A. Excretion of radiolabeled estradiol in the cat (*Felis catus*): a preliminary report. **Zoo Biology**, Hoboken, v. 3, n. 3, p. 201-209, 1984. DOI: 10.1002/zoo.1430030303.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. **Principles and procedures of statistics a biometrical approach**. 3 ed. New York: Mcgraw-Hill, 1997. v. 1, 666 p.

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**, West Sussex, v. 11, n. 6, p. 426–431, 1998. DOI: 10.1046/j.1469-0705.1998.11060426.x.

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**, Cary, v. 165, n. 5, p. 835-845, 1992. DOI: 10.1093/infdis/165.5.835.

THALER, I.; MANOR, D.; BRANDES, J.; ROTTEM, S.; NICOLAIDES, K. H. - Basic principles and clinical applications of the transvaginal doppler duplex system in reproductive medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v 7, n. 2, p. 74-85, 1990. DOI: 10.1007/BF01135578

VALLE, C. M. del R.; VALLE, R. del R.; MONTEIRO, F. O. B.; CASTRO, P. H. G.; VALENTIM, R.; CARVALHO, R. A.; MUNIZ, J. A. P. C.; BOMBONATO, P. P. Pelvimetria em macacos-da-noite (*Aotus azarai infulatus* – KUHL, 1820). **Brazilian Journal of veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 370-378, 2006.

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.

VERAS, M. M.; MIGLINO, M. A.; SILVA, Z. Morfologia do aparelho reprodutor em fêmeas de bugio marrom (*Alouatta guariba clamitans*). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 1, 2007. Disponível em http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141395962007000100002&lng=pt&nrm=iso.

WILDT. Reproductive research in conservation biology: Priorities and avenues for support. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 20, n. 4, p. 391- 395, 1989.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, Strawberry Hills, v. 8, p. 375-376, 1927.

WOLFE, N. D.; ESCALANTE, A. A.; KARESH, W. B.; KILBOURN A.; SPIELMAN, A.; LAL, A. A. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 149-158. 2000. DOI: 10.3201/eid0402.980202

WRIGHT, E. M. Jr; BUSH, D. E. The reproductive cycle of the capuchin (*Cebus apella*), **Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 27, 5.1, p. 651-654. 1977.