



**Universidade Federal do Pará  
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental  
Universidade Federal Rural da Amazônia  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Stefânia Araújo Miranda**

**Ecobiometria e Triplex Doppler para avaliação da vitalidade fetal  
em *Cebus apella***

**Belém  
2011**

**Stefânia Araújo Miranda**

**Ecobiometria e Triplex Doppler para avaliação da vitalidade fetal  
em *Cebus apella***

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal. Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sheyla Farhayldes S. Domingues

**Belém  
2011**

**Stefânia Araújo Miranda**

**Ecobiometria e Triplex Doppler para avaliação da vitalidade fetal  
em *Cebus apella***

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 28 / 02 / 2011

Banca Examinadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sheyla Farhayldes S. Domingues  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro  
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Clara Caldas-Bussiere  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

À minha mãe, Maria das Graças Araújo  
Miranda, que sempre lutou sozinha, porém com  
todo amor e dedicação, para que eu concluísse  
meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, pelo amor, esforço, dedicação e incentivo, deixando muitas vezes sua vida em segundo plano para dar o melhor às filhas.

Às minhas irmãs, Mônica e Maria Luiza, pelo companheirismo e amizade ao longo de toda minha jornada.

Ao namorado Mário, pelo apoio, amor, carinho, paciência e companheirismo, até mesmo nas incansáveis coletas dos domingos e feriados. Obrigada por sempre querer ajudar, amenizando as dificuldades encontradas durante esses dois anos de trabalho e estudo.

À Dr<sup>a</sup>. Sheyla Farhayldes Souza Domingues, professora e amiga, que sempre foi um incentivo para que eu desse o melhor de mim e foi de fundamental importância na produção desse trabalho.

Aos amigos Aline Imbeloni e Dr. Messias, pelos ensinamentos e por abrirem portas para meu enriquecimento profissional.

Ao Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM), e amigos: Karol, Adriel, Nilda, Danuza, Gustavo, Débora, Valéria, Luana e Daniele, que foram essenciais para a execução do meu experimento.

Ao Centro Nacional de Primatas, pelo apoio estrutural, e seus funcionários, em especial a Sarah, Sr. Miguel, Rosa, Sr. Oswaldo, Sr. Sefatil, Obadias, Rosivaldo, Tico, Marcos, Abraão, Léo, Givanildo, Max, Alessandra, Jack, Cleise, Sheyla, Carla, Sra. Laura, Sr. Joaquim, Sr. Diniz, Sr. Rufino, Sr. Souzimar, Gilmar, Dr. Muniz, Dr. Paulo e Sr. Carlos Faro, por sempre estarem a disposição para ajudar.

À FINEP e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais do meu experimento, pois por maior que fosse meu esforço para garantir o seu bem estar, não estavam no seu habitat natural.

“É melhor atirar-se em luta, em busca de dias melhores, do que permanecer estático como os pobres de espírito, que não lutaram, mas também não venceram”

Bob Marley

## RESUMO

Os objetos do trabalho foram: 1) realizar a ecobiometria do concepto para acompanhar o crescimento fetal e determinar a idade gestacional em *Cebus apella*; 2) descrever o momento em que os órgãos do feto são observados; 3) realizar a sexagem fetal; 4) avaliar o fluxo sanguíneo das artérias uterinas (AU) e umbilical (Aum), mensurando os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP); 5) observar a presença ou ausência da incisura protodiastólica (IPD) e do componente diastólico nas ondas de fluxo sanguíneo das AU e Aum, respectivamente, durante a gestação em *C. apella*. Seis fêmeas adultas da espécie *C. apella* foram selecionadas e, posteriormente, condicionadas para os procedimentos de colpocitologia ou contenção química. Para o monitoramento do ciclo reprodutivo das fêmeas e crescimento folicular, foram realizados exames colpocitológicos e ultrassonografia (US), respectivamente, para a escolha do melhor dia da monta natural ou inseminação artificial. Vinte dias após a cópula ou inseminação, era realizado o diagnóstico da gestação por meio da US. O dia de cada exame em relação ao parto foi contado em retrospecto (nascimento = dia 0). Os exames ultrassonográficos foram feitos nos dias -133, -113, -83, -53, -21 e -1 antes do parto. A US bidimensional em modo B foi utilizada para mensurar o saco gestacional do dia -133 até -113; os diâmetros biparietal, fronto-occipital, circunferência da cabeça e circunferência abdominal do dia -113 a -1; e comprimento do fêmur do dia -53 até -23, mostrando o aumento desses parâmetros com o avanço da gestação. O coração e o estômago começaram a ser visualizados no dia -113 e, os demais órgãos e a sexagem no dia -83. O Triplex Doppler foi empregado para avaliar o fluxo sanguíneo durante o período gestacional, mostrando uma diminuição nos IR e IP das AU e Aum, do dia -133 a -1, bem como observar o desaparecimento da IPD (dia -1) e aparecimento do componente diastólico (dia -53) na onda de fluxo sanguíneo das AU e Aum, respectivamente. Entre os dias -113 a -1, a média da frequência cardíaca fetal, obtida pelo Triplex Doppler, foi de  $189 \pm 2,43$  bpm. O presente trabalho permitiu determinar a idade gestacional, avaliar o crescimento anatômico do feto, descrever o momento em que os órgãos são visualizados e realizar a sexagem em *C. apella*. Constatou-se, também, que o fluxo sanguíneo das AU e Aum são importantes parâmetros para avaliar a vitalidade fetal em *C. apella*.

**Palavras-chave:** Macaco-prego. Gestação. Ultrassonografia. Desenvolvimento fetal. Artéria uterina. Artéria umbilical.

## ABSTRACT

The objectives were to: 1) perform conceptus ecobiometry for fetal growth assessment and determine the gestational age in *Cebus apella*; 2) describe the moment that the fetal organs are observed; 3) perform fetal sex identification; 4) evaluate blood flow in the uterine (UA) and umbilical (Uma) arteries, by measuring the resistive index (RI) and pulsatility index (PI); 5) to note the presence or absence of the early diastolic notch (EDN) and diastolic flow in the UA and Uma flow waveforms, respectively, during gestational period in *C. apella*. Six adult females were selected and trained to allow vaginal swabs or sedation. Vaginal smears and ultrasonography (US) were used to monitor the menstrual cycles and follicular growth, respectively, for choose the better day to natural mating or artificial insemination. Twenty days after mating or insemination, the diagnosis of gestation by US was done. The day of the examination relative to whelping was calculated in retrospect (whelping = Day 0). Ultrasonographic examinations were done on Days -133, -113, -83, -53, -21 and -1 before whelping. The B-mode US was used to measure the gestational sac on Days -133 to -113; the biparietal diameter, occipito-frontal diameter, head circumference and abdominal circumference on Days -113 to -1; and femur length on Days -53 to -23, showing that these parameters increased as gestational age advanced. The fetal heart and stomach were observed on Day -113 and, the other organs and fetal sex identification on Day -83. The Triplex Doppler was used to evaluate the blood flow during the gestational period, showing decrease on RI and PI of UA and Uma, on Days -133 to -1, as well as to note the absence of the EDN in the UA waveform on Day -1 and the presence of the Uma diastolic flow on Day -53. From Days -113 to -1, the mean of fetal heart rate, obtained by Triplex Doppler, was  $189 \pm 2,43$  bpm. The current study enabled to determine the gestational age, to assess the fetal anatomical growth, to describe the moment that the organs were observed and to perform fetal sex identification in *C. apella*. We inferred that UA and Uma blood circulation were important end points to assess fetal vitality in *C. apella*.

**Key-words:** Capuchin monkey. Gestation. Ultrasonography. Fetal development. Uterine arteries. Umbilical artery.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AU - Artéria uterina

Aum - Artéria umbilical

CA - Circunferência abdominal

CC - Circunferência da cabeça

CCN - Comprimento cabeça-nádegas

CF - Comprimento do fêmur

DAP – Dias antes do parto

DBP - Diâmetro biparietal

DFO - Diâmetro fronto-occipital

DVL - Dorso-ventral longitudinal

DVT - Dorso-ventral transversal

LLL - Látero-lateral longitudinal

LLT - látero-lateral transversal

IR - Índice de resistividade

IP - Índice de pulsatilidade

SG - Saco gestacional

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1. OBJETIVO GERAL.....	11
<b>1.1.1. Objetivos específicos</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1. A ESPÉCIE <i>Cebus apella</i> .....	13
<b>2.1.1. A fêmea de <i>Cebus apella</i></b> .....	14
<b>2.1.2. O macho de <i>Cebus apella</i></b> .....	15
2.2. COMPORTAMENTO SEXUAL.....	16
2.3. MIGRAÇÃO ESPERMÁTICA NO TRATO REPRODUTOR DA FÊMEA DE <i>Cebus apella</i> APÓS A CÓPULA.....	17
2.4. GESTAÇÃO E PERÍODO DE AMAMENTAÇÃO EM <i>Cebus apella</i> .....	17
2.5. ULTRASSONOGRRAFIA.....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	20
3.2. LOCAL DE EXECUÇÃO.....	20
3.3. SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	20
3.4. MANEJO DOS ANIMAIS.....	21
3.5. CONDICIONAMENTO DAS FÊMEAS.....	21
3.6. MONITORAMENTO DO CICLO REPRODUTIVO.....	22
<b>3.6.1. Colpocitologia</b> .....	22
<b>3.6.2. Ultrassonografia para acompanhamento do crescimento folicular</b> .....	23
3.7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU CÓPULA.....	24
<b>3.7.1. Seleção dos machos</b> .....	24
<b>3.7.2. Inseminação artificial guiada por ultrassonografia</b> .....	25
<b>3.7.3. Cópula</b> .....	26
3.8. ACOMPANHAMENTO DA GESTAÇÃO POR MEIO DA ULTRASSONOGRRAFIA.....	26
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Seier et al. (2000), a ultrassonografia ginecológica e obstétrica tem se tornado uma ferramenta indispensável na rotina de manejo, avaliação da saúde e pesquisa em primatas não-humanos em cativeiro.

Vários autores utilizaram a técnica de ultrassom para estudos relacionados à gestação de *Macaca mulata* (NYLAND et al., 1984), *Macaca fascicularis* (CONRAD; SACKETT; BURBACHER, 1989), *Saguinus fuscicollis* (KUEDERLING; HEISTERMANN, 1997), *Cebus apella* (CORRADINI et al., 1998), *Callithrix jacchus* (TARDIF et al., 1998), *Aotus azarai infulatus* (MONTEIRO et al., 2006), *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Mandrillus sphinx* e *Erythrocebus patas* (BOURRY et al., 2006) e *Papio anubis* (VAN CALSTEREN, et al., 2009).

O uso crescente de primatas não-humanos gestantes e de seus fetos nas pesquisas científicas, torna importante o estudo do desenvolvimento fetal durante gestações normais, como base para se avaliar futuras gestações experimentais (CORRADINI et al., 1998) ou avaliar a eficácia biotecnologias utilizadas em programas de reprodução assistida, como a produção *in vitro* e transferência de embrião, inseminação artificial, entre outros.

A espécie *C. apella* vem se destacando como modelo no desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para outros primatas não-humanos do gênero *Cebus*, que se encontram ameaçados de extinção (DOMINGUES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011) e, também, como modelo biológico muito utilizado na pesquisa biomédica (WRIGHT; BUSH, 1977; NAGLE et al., 1979; LINN et al., 1995; FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998). No entanto, o desenvolvimento fetal intrauterino em *C. apella* ainda é pouco estudado. Nesta espécie, os parâmetros fisiológicos normais durante a gestação foram descritos somente por meio da relação entre a ecobiometria do concepto e frequência cardíaca fetal com a idade gestacional (CORRADINI et al., 1998), não sendo ainda avaliados parâmetros relacionando a idade gestacional com as características de fluxo sanguíneo das artérias uterinas (AU) e artéria umbilical (Aum).

Em mulheres, estudos demonstraram a importância das relações entre a ecobiometria fetal, a frequência cardíaca do feto e as características do fluxo sanguíneo das artérias uterinas (NORTH et al., 1994; FARRELL; CHIEN; MIRES, 1998; COLEMAN; McCOWAN; NORTH, 2000; HERNÁNDEZ-ANDRADE et al., 2002) e artéria umbilical (FLEISCHER et al., 1985; SHIPP; BROMLEY; BENACERRAF, 1995; SAKAI et al., 1997; SEYAM; AL-

MAHMEID; AL-TAMIMI, 2002) para a avaliação da vitalidade fetal, utilizando a ultrassonografia (US).

A US bidimensional em modo B associada ao Doppler Colorido e Doppler de Fluxo (Triplex Doppler) têm sido descrita na clínica ginecológica e obstétrica de humanos (TAYLOR; QUEDENS-CASE, 1995; FARRELL; CHIEN; MIRES, 1998; SEYAM; AL-MAHMEID; AL-TAMIMI, 2002; FREITAS et al., 2004) e de várias espécies animais (MU; ADAMSON, 2006; DOMINGUES et al., 2007; MIRANDA; DOMINGUES, 2010; BRITO et al., 2010).

Neste sentido, é essencial o conhecimento dos parâmetros fisiológicos normais da gestação em *C. apella*, em especial a perfusão sanguínea das AU e Aum, para monitorar futuras gestações experimentais, avaliar a eficácia de programas de reprodução assistida, bem como tornar a espécie *C. apella* um modelo para estudar a gestação de mulheres e de primatas não-humanos ameaçados de extinção.

Para uma melhor compreensão da proposta do trabalho será apresentada uma breve revisão de literatura acerca da espécie *C. apella*, aspectos gerais da fisiologia reprodutiva já descrita sobre a fêmea e o macho de *C. apella*, bem como o comportamento sexual, migração espermática no trato reprodutor da fêmea após a cópula, gestação, período de amamentação nesta espécie, e finalmente aspectos gerais da técnica de ultrassonografia bidimensional em modo B e Triplex Doppler.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

- Estudar a fisiologia da gestação na espécie *C. apella*, por meio da ultrassonografia, para estabelecer parâmetros de referência que poderão ser utilizados para monitorar gestações normais e de risco.

### 1.1.1. Objetivos específicos

- Realizar a ecobiometria do conceito por meio da ultrassonografia bidimensional em modo B para acompanhar o crescimento fetal e determinar a idade gestacional em *C. apella*;
- Descrever o momento em que os órgãos do feto são observados;
- Realizar a sexagem fetal;
- Analisar qualitativamente, utilizando o Triplex Doppler, os componentes sistólicos e diastólicos das ondas de fluxo sanguíneo das AU e Aum, bem como a presença ou ausência da incisura protodiastólica nas ondas de fluxo sanguíneo das AU durante a gestação em *C. apella*;
- Avaliar quantitativamente, por meio do Triplex Doppler, o comportamento dos índices de resistividade e pulsatilidade das ondas de fluxo sanguíneo das AU e Aum durante o período gestacional em *C. apella*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A ESPÉCIE *Cebus apella* (LINNAEUS, 1758)

Os primatas do novo mundo ou primatas neotropicais pertencem à Ordem Primates, Subordem Haplorrhini, Infra-ordem Simiiformes e Parvordem Platyrrhini (WILSON; REEDER, 2005). A espécie *Cebus apella* é um platirrino da Família Cebidae e Gênero *Cebus* (FREESE; OPPENHEIMER, 1981). Uma de suas características mais marcantes é a presença de tufo pretos no alto da cabeça, coloração mais escura da pelagem dos membros e cauda (HIRSCH et al., 2008) e uma linha dorsal longitudinal marrom enegrecido (SILVA JÚNIOR, 2001) (Figura 1).

Apresentam ampla distribuição geográfica na América do Sul: Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Guianas, Suriname e Venezuela (FRAGASZY; VISALBERGHI; FEDIGAN, 2004). No ambiente natural, os primatas da espécie *C. apella* formam grupos de 8 a 12 indivíduos, podendo chegar até 14 indivíduos (TERBORGH, 1983). Alimentam-se principalmente de frutos, e também, de flores, folhas, néctar, ramos novos, castanhas, insetos, ovos de pássaros e pequenos vertebrados (FREESE; OPPENHEIMER, 1981; TERBORGH, 1983).

A maturidade sexual em *C. apella* ocorre entre 5-8 anos nos machos e 4-5 anos nas fêmeas, sobrevivendo em cativeiro até 20 ou 40 anos (PARADISO; NOVAK, 1983). No entanto, a maturidade sexual pode ser também estimada quando ocorre a erupção dos dentes caninos e quando as fêmeas e os machos apresentam pesos de aproximadamente 1,8 e 2,5 kg, respectivamente (NAGLE; DENARI, 1983).



**Figura 1:** Exemplo de macho adulto da espécie *Cebus apella* (ROWE, 1996).

### 2.1.1. A Fêmea de *Cebus apella*

A fêmea de *C. apella* possui um útero simples, contendo dois ovários, uma vagina curta e um clitóris longo e pendular (NAPIER; NAPIER, 1986). Por meio da ultrassonografia (US) bidimensional, demonstrou-se que o comprimento, altura, largura e volume do útero são  $1,79 \pm 0,04$  cm;  $1,24 \pm 0,03$  cm;  $1,36 \pm 0,03$  cm e  $1,55 \pm 0,08$  mL, respectivamente, e dos ovários direito e esquerdo são:  $1,34 \pm 0,02$  cm;  $0,82 \pm 0,01$  cm;  $0,77 \pm 0,01$  cm e  $0,45 \pm 0,02$  mL, respectivamente para fêmeas adultas nulíparas (DOMINGUES et al., 2007).

O ciclo menstrual nesta espécie tem duração de 18 a 21 dias (WRIGHT; BUSH, 1977; NAGLE et al., 1979; LINN et al., 1995), podendo ser dividido nas fases menstrual (1-5 dias) e folicular (7-9 dias) que ocorrem concomitantemente, e fase luteal (12-13 dias) (NAGLE et al., 1979). Por meio da citologia vaginal (WRIGHT; BUSH, 1977; NAGLE et al., 1979; 1980) e dosagem hormonal de estrógeno e progesterona (NAGLE et al., 1979; 1980) foi constatado que ocorre um sangramento não pronunciado na fase menstrual, logo após a fase luteal, e não no período periovulatório, como acontece em fêmeas de ciclo estral. Este pequeno sangramento durante a fase menstrual nos Platyrrhines é decorrente da presença de arteríolas uterinas retas ao invés de espiraladas (STRASSMANN, 1996).

As fêmeas de *C. apella* apresentam mudanças cíclicas do epitélio vaginal que acompanham a ciclicidade ovariana (NAGLE et al., 1980; HEARN, 1994). Estas mudanças como, por exemplo, o aumento da quantidade de células intermediárias, superficiais e queratinizadas, bem como a presença ou ausência de eritrócitos e leucócitos, podem ser utilizadas para determinar o período em que a ovulação irá ocorrer (MARTINS, 2004). Consequentemente, a colpocitologia funciona como um método auxiliar de baixo custo, que pode ser empregado no diagnóstico da fase periovulatória e menstrual, especificamente no caso de *C. apella*, sendo este um aspecto importante em programas de reprodução assistida (DOMINGUES et al., 2007).

O folículo dominante pode ser reconhecido até 6 dias antes da ovulação com o uso US bidimensional, sendo visualizado como uma estrutura anecóica, redonda ou levemente ovóide dentro do ovário, com uma borda bem delimitada (DOMINGUES et al., 2007). Já o corpo lúteo aparece como uma estrutura mais ecogênica e com borda irregular. O diâmetro e volume médio do folículo pré-ovulatório, mensurados por meio da US no dia da ovulação, são de 8-10 mm (ORTIZ et al., 2005; DOMINGUES et al., 2007) e 0,54 mL (DOMINGUES et al., 2007), respectivamente. O folículo dominante de 5,0 mm leva de 01 a 05 dias para atingir o seu

diâmetro máximo, sendo este um parâmetro importante para se estimar o provável dia da ovulação em fêmeas de *C. apella* (ORTIZ et al., 2005). Domingues et al. (2007) demonstraram, por meio da US bidimensional, que a ovulação ocorre em média no dia 9 (7-11) do ciclo menstrual, sendo que 86% das ovulações ocorreram no ovário direito e 17% no ovário esquerdo.

Domingues et al. (2007) relataram, por meio do Triplex Doppler, que os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) da artéria uterina (AU) ipsilateral ao ovário dominante apresentaram-se constantes nos dias 6 (0,72 e 1,5), 4 (0,8 e 2,2) e 2 (0,82 e 1,9) antes da ovulação, ocorrendo um pico no dia da ovulação, dia 0 (0,99 e 2,4), sugerindo aumento do fluxo sanguíneo do útero para o ovário dominante.

### **2.1.2. O Macho de *Cebus apella***

O sistema reprodutor do macho de *C. apella* é constituído por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, duas vesículas seminais, uma próstata, duas glândulas bulbo-uretrais (TEIXEIRA, 2005), um pênis dotado de um vestígio de osso peniano (báculo) e uma glândula muito desenvolvida em formato de prego, sendo por isso conhecido vulgarmente como “macaco-prego” (NAPIER; NAPIER, 1986).

Segundo Araújo et al. (2009), os diâmetros testiculares longitudinais, dorsoventrais e transversais são  $2,00 \pm 0,10$  cm;  $1,40 \pm 0,06$  cm e  $1,65 \pm 0,10$  cm, respectivamente, sendo os testículos direito e esquerdo simétricos. A avaliação testicular quanto à posição, simetria, mobilidade, consistência, forma e tamanho é necessária na escolha de animais experimentais que farão parte de programas de reprodução assistida (GARNER; HAFEZ, 2004), uma vez que patologias como o criptorquidismo e anorquidismo podem ser limitantes ao sucesso de determinadas técnicas reprodutivas e podem ser detectadas por essas avaliações (ARAÚJO et al., 2009).

O ejaculado dessa espécie é opaco e consistente, formando um coágulo seminal (ARAÚJO et al., 2009). Os valores máximos dos parâmetros espermáticos citados na literatura para o sêmen dessa espécie são: 0,98 ml de volume;  $1,6 \times 10^9$  espermatozóides/ml de concentração (ARAÚJO et al. 2009); 38% de motilidade e 3 de vigor no coágulo liquefeito em diluente Tes-tris (OLIVEIRA et al., 2011).

Descrevendo as características do sêmen de *Papio anubis*, Amboka e Mwethera (2003) relataram que a formação do coágulo seminal deve-se à reação entre as secreções provenientes do lobo cranial da próstata e da vesícula seminal. Dixon e Anderson (2002) denominam o sêmen de primatas não-humanos com aspecto gelatinoso firme de “*plug* copulatório”. Segundo esses autores, ele se molda no contorno da vagina da fêmea após a cópula, atuando como uma barreira que impede a inseminação por outros machos, agindo como um mecanismo de seleção sexual, especialmente em regimes poligâmicos, que é o caso da espécie *C. apella*. O *plug* ou coágulo seminal também pode servir como um veículo dos espermatozoides para o interior da cérviz da fêmea, constituindo uma barreira física e química, pois apresenta pH alcalino, aumentando o índice de sobrevivência dos espermatozoides no meio ácido vaginal (HERNANDEZ-LÓPEZ et al., 2008).

## 2.2. COMPORTAMENTO SEXUAL

A espécie *C. apella* tem um sistema poligâmico de acasalamento e as fêmeas reproduzem-se preferencialmente com o macho dominante (FORBES; MACKEITH, 1984; EMMONS, 1990; ROWE, 1996). O sistema de acasalamento dessa espécie é precedido por uma corte, caracterizada pela solicitação ativa da fêmea pelo macho (WELKER et al., 1987). Para obter a atenção do macho, a fêmea exhibe comportamentos, tais como: expressões faciais, vocalizações e algumas vezes contato físico com os machos. Caso o macho responda positivamente antes da cópula, acontece uma seqüência de aproximações, fugas e perseguições. As solicitações das fêmeas de *C. apella* em relação aos machos, bem como as cópulas, ocorrem durante todo o ciclo menstrual, mas a frequência deste comportamento sexual feminino aumenta durante o período periovulatório (JANSON, 1984; WELKER et al., 1987; LINN et al., 1995). Entretanto, vale ressaltar que a solicitação do macho em relação às fêmeas não modifica de acordo com o período do ciclo menstrual (LINN et al., 1995).

### 2.3. MIGRAÇÃO ESPERMÁTICA NO TRATO REPRODUTOR DA FÊMEA DE *Cebus apella* APÓS A CÓPULA

Ortiz et al. (1995) estudaram a migração espermática no trato reprodutor feminino de *C. apella*, por lavados do trato reprodutor de 18 fêmeas, nos intervalos de 1-7 h, 19-31 h e 45-56 h após o coito. O ciclo menstrual de cada fêmea foi monitorado, por meio da citologia vaginal, para a identificação do período menstrual (1-5 dias) e periovulatório (3-5 dias). O macho e a fêmea foram colocados juntos das 10:00 as 18:00 h por 1 a 3 dias durante o período periovulatório. O casal foi então observado para determinar o momento da cópula.

Segundo estes autores, a população espermática encontrada na cérviz e no útero diminuiu progressivamente entre o primeiro (1-7 h após o coito) e o último intervalo (45-56 h após o coito). Uma hora após o acasalamento foi possível recuperar espermatozóides da ampola. Do primeiro para o último intervalo de tempo pós-coito, a quantidade de espermatozóides diminuiu na ampola, mas não no istmo. O número de espermatozóides recuperado na ampola do lado que ocorreu a ovulação foi maior no período pós-ovulatório do que no pré-ovulatório. Enquanto que no lado oposto à ovulação, a quantidade de espermatozóides recuperados foi semelhante nas duas condições. Por isso, os autores sugerem que a migração espermática no trato genital da fêmea de *C. apella* até o local de fertilização está sobre controle local e é sincronizado com a ovulação.

### 2.4. GESTAÇÃO E PERÍODO DE AMAMENTAÇÃO EM *Cebus apella*

A fêmea de *C. apella* pode conceber pela primeira vez aos 5 anos de idade, quando apresenta 90% do peso de um indivíduo adulto (FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998). O período de gestação é em média de  $155 \pm 7$  dias, contados a partir da cópula, resultando em uma única cria por gestação (NAGLE; DENARI, 1983). O filhote nasce em média com 9% do peso da mãe, o que equivale a aproximadamente 210 g (170 – 260 g). O intervalo entre partos é de 576 dias (FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998) e o intervalo entre gerações é de 5 a 6 anos (HEARN, 1994).

Hearn (1994) afirmou que o período de lactação estende-se de 16-20 meses após o nascimento. As fêmeas de *C. apella* podem aceitar o macho para cópula uma semana após o

nascimento do filhote, contudo, acasalamentos durante este período, em geral, não resultaram em gestação (FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998). Durante o período de amamentação, as fêmeas apresentam amenorréia lactacional, pois as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona durante o período de amamentação são baixas, quando comparadas com a fase folicular do ciclo menstrual (RECABARREN et al., 2000).

## 2.5. ULTRASSONOGRAFIA

A US bidimensional em modo B fornece em tempo real a imagem ultrassonográfica em escala de cinza, podendo-se por meio desta avaliar a ecogenicidade das estruturas anatômicas e realizar a ecobiometria do concepto (NYLAND; MATTOON, 1995).

Utilizando a US bidimensional em modo B, equipada com transdutor linear de 5 MHz, Corradini et al. (1998) diagnosticou a gestação em *C. apella* visualizando o saco gestacional (SG) a partir do dia 23 (15 – 27 dias) após a cópula. O coração do embrião pôde ser visualizado em média no dia  $32,7 \pm 2,8$  e a partir deste momento foi possível medir o comprimento do embrião. Os comprimentos do tórax e o diâmetro biparietal tornam-se mensuráveis no dia  $45,4 \pm 1,4$  após a cópula. O comprimento do fêmur, por sua vez, só foi possível ser medido no dia  $70,6 \pm 2,1$ . Com o avanço da idade gestacional (IG), os parâmetros fetais mensurados aumentaram e a frequência cardíaca (FC) diminuiu ( $FC \text{ bpm/min.} = -1,53 \text{ IG (dias)} + 374,78$ ).

Contudo, Corradini et al. (1998) avaliaram o desenvolvimento do concepto somente por meio da ecobiometria do saco gestacional (SG), do comprimento cabeça-nádegas (CCN), do diâmetro biparietal (DBP), altura do tórax e comprimento do fêmur (CF). Alguns parâmetros, como o diâmetro fronto-occipital (DFO), circunferência da cabeça (CC) e circunferência abdominal (CA) ainda não foram descritos para esta espécie. Definir estes parâmetros para a espécie é importante uma vez que, segundo Roberts et al. (1999), uma CA pequena é um marcador preciso para o diagnóstico de restrição do crescimento intra-uterino. Nyberg, Abuhamad e Ville (2004) também relataram que o DBP e a CC refletem o crescimento do crânio. O monitoramento da ecobiometria do concepto durante toda a gestação é extremamente importante para avaliar o desenvolvimento e a vitalidade fetal, pois um crescimento anormal do feto pode ser representado pela restrição do crescimento intra-uterino ou crescimento acelerado anormal (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004).

A US bidimensional em modo B, associada ao Doppler Colorido e Doppler de Fluxo (Triplex Doppler) pode ser utilizado para identificar a irrigação sanguínea, fornecendo informações acerca da presença ou ausência, direcionamento e qualidade do fluxo sanguíneo (SZATMÁRI; SOTONYI; VOROS, 2001). Essa técnica permite a avaliação quantitativa e qualitativa do fluxo sanguíneo. As informações quantitativas produzidas pela dopplerfluxometria incluem os IR e IP das artérias do ligamento útero-ovariano (DOMINGUES et al., 2007), AU e Aum (NORTH et al., 1994; GASCHEN; MENNINGR; SCHUURMAN, 2000). A vantagem de utilizar os IR e IP é que os seus valores independem do ângulo de insonação. A elevação dos valores de ambos IR e IP representam a diminuição do fluxo sanguíneo na amostra avaliada pelo Triplex Doppler (GASCHEN; MENNINGR; SCHUURMAN, 2000). Por sua vez, informações qualitativas incluem a presença ou ausência da incisura protodiastólica na onda de fluxo das AU (FAY et al., 1994; FREITAS et al., 2004) e o surgimento do componente diastólico na onda de fluxo da Aum (MU; ADAMSON, 2006). No entanto, em *C. apella* foram relatados somente os valores dos IR e IP das AU, por meio do Triplex Doppler, durante a fase folicular (DOMINGUES et al., 2007). Os valores dos IR e IP dessas artérias, bem como da Aum durante a gestação ainda não foram descritos para esta espécie.

A frequência do transdutor é muito importante e deve ser selecionada de acordo com a anatomia da região a ser examinada e com o porte do animal. Frequências maiores possibilitam melhor definição, mas menor penetração. Dessa forma, frequências mais altas são indicadas para pequenos animais e para o exame de estruturas superficiais. No entanto, quando a velocidade do fluxo sanguíneo, identificada pelo Doppler, estiver alta, deve-se optar por frequências menores, pois a velocidade é inversamente proporcional a frequência do transdutor (NYLAND; MATTOON, 1995). Em ginecologia e obstetrícia de primatas do Novo Mundo as frequências de 5 MHz (CORRADINI et al., 1998), 7,5 MHz (MONTEIRO et al., 2006), 10 MHz (OERKE; EINSPANIER; HODGES, 1996) e multifrequenciais de 7-11 MHz (DOMINGUES et al., 2007) foram as mais citadas na literatura.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais, descritos neste projeto, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPAN) do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS) e aprovados (Nº 055/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS). Os procedimentos a seguir descritos foram acompanhados por, pelo menos, um médico veterinário para verificação do estado de saúde do animal manipulado.

#### 3.2. LOCAL DE EXECUÇÃO

O trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Primatas, órgão da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (CENP/SVS/MS), localizado na cidade de Ananindeua, estado do Pará (latitude: 1° 22' 57" sul, longitude: 48° 22' 52" oeste).

#### 3.3. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram selecionadas seis fêmeas (n=6) adultas, da espécie *C. apella*, com características fenotípicas normais para a espécie. As fêmeas fazem parte do plantel reprodutivo do Centro Nacional de Primatas. Para a seleção dos animais foi feito um levantamento do histórico reprodutivo, bem como avaliação do estado de saúde, confirmado por análises clínicas e laboratoriais de rotina. Além dos exames de rotina, cada fêmea foi submetida a um exame ultrassonográfico para avaliação do sistema reprodutor, seguindo os parâmetros normais descritos para a espécie por Domingues et al. (2007). Somente as fêmeas saudáveis, sexualmente maduras, que exibiram um ciclo menstrual regular, tinham o histórico de gestação sem complicação e com nascimento de filhote saudável, foram utilizadas no experimento.

### 3.4. MANEJO DOS ANIMAIS

As fêmeas selecionadas encontravam-se instaladas em gaiolas coletivas (dimensões 3,85 x 2,30 x 2,55 m) de alvenaria e tela, dentro do galpão de reprodução telado. Cada gaiola coletiva possui um grupo reprodutivo composto por, em média, um macho e 3 fêmeas.

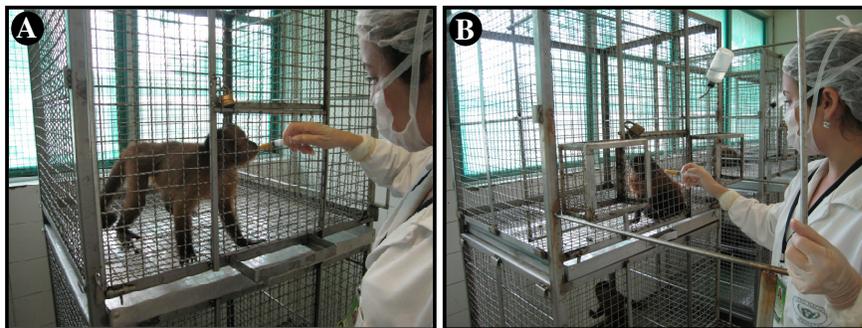
Porém, no período do projeto que correspondeu ao condicionamento até o monitoramento do ciclo reprodutivo, as fêmeas selecionadas foram transferidas para o galpão de experimento telado, onde permaneceram juntas em uma sala, dentro de gaiolas individuais de alumínio com fundo retrátil (dimensões de 80 x 90 x 80 cm), até a confirmação do período periovulatório.

Todos os animais foram sujeitos ao fotoperíodo natural (12 h de luz e 12 h de escuro), receberam alimentação diária à base de hortifrutigranjeiros, ração peletizada específica para Cebídeos (MEGAZOO P18, Betim/MG, Brasil), e água *ad libitum*.

### 3.5. CONDICIONAMENTO DAS FÊMEAS

Esta etapa do projeto foi realizada diariamente até que as fêmeas fossem condicionadas a se aproximar na frente da gaiola (Figura 2A) e ficassem menos agressivas com a diminuição do espaço da gaiola, permitindo a contenção física (Figura 2B) para os procedimentos de colpocitologia ou de contenção química.

As fêmeas foram submetidas primeiramente a um estímulo eliciador incondicionado (oferta de uvas, iogurte, leite condensado ou tenébrios), para gerar uma resposta condicionada, caracterizada pela tranquilização do animal durante o procedimento de contenção física, que consistia na diminuição do espaço da gaiola individual pela movimentação do fundo retrátil.

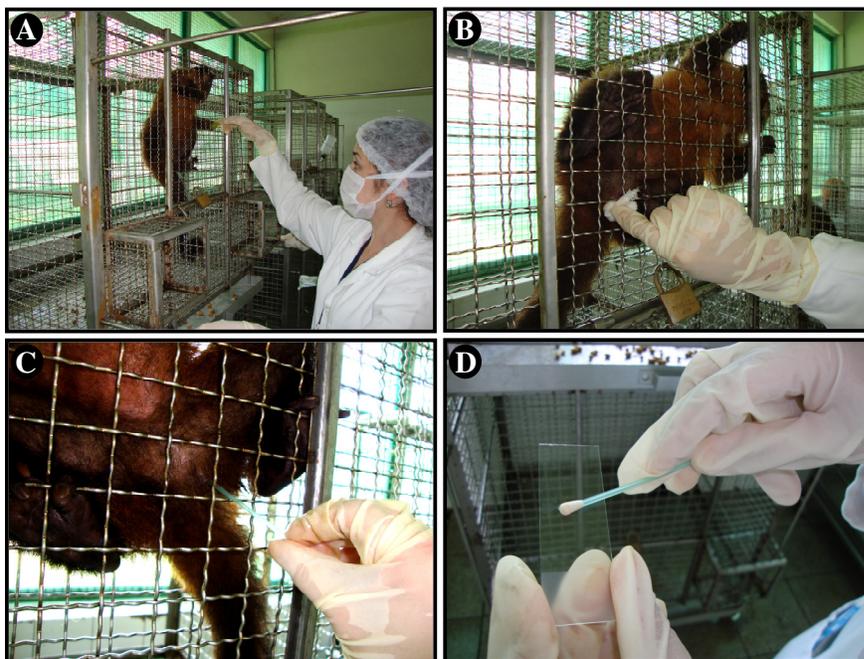


**Figura 2.** Oferta de leite condensado em uma seringa sem agulha. **(A)** Condicionamento para a fêmea se aproximar na frente da gaiola. **(B)** Diminuição do espaço da gaiola, pela movimentação do fundo retrátil, para a contenção física.

### 3.6. MONITORAMENTO DO CICLO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS

#### 3.6.1. Colpocitologia

Para determinar o início do ciclo menstrual foram realizados exames colpocitológicos diários nas fêmeas até a detecção da menstruação (dia 1 do ciclo menstrual). Para este exame foi necessária a contenção física das fêmeas, nas suas respectivas gaiolas, com o auxílio de um estímulo eliciador (Figura 3A). Em seguida, foi feita a higienização da região vulvar, com gaze e solução fisiológica (Figura 3B), e a introdução do swab de algodão (CB Products, Corumbatai/SP, Brasil) no canal vaginal, fazendo-se movimentos no sentido horário (Figura 3C). Posteriormente, foi feita a impressão do material colhido em uma lâmina, também em movimentos no sentido horário (Figura 3D). Por último, a lâmina era corada por meio da técnica de Panótico Rápido (Laborclin Ltda., Pinhais/PR, Brasil) e analisada ao microscópio.



**Figura 3.** Procedimento de colpocitologia. (A) Contenção física da fêmea na gaiola individual, juntamente com a oferta de uva. (B) Higienização da região vulvar com gaze e solução fisiológica. (C) Introdução do swab de algodão no canal vaginal, fazendo-se movimentos no sentido horário. (D) Impressão do material colhido em uma lâmina, também em movimentos no sentido horário.

### 3.6.2 Ultrassonografia para acompanhamento do crescimento folicular

Com a ultrassonografia (US) bidimensional em modo B, o folículo dominante era monitorado até alcançar o diâmetro máximo, para que as fêmeas retornassem ao grupo de origem e acasalassem, ou até que a ovulação fosse detectada, para a inseminação artificial com sêmen a fresco.

Em torno de 20 minutos antes do exame ultrassonográfico, realizado sempre pela manhã, era ofertado um suco de fruta instantâneo dissolvido em água, para assegurar que a bexiga urinária ficasse repleta no momento do exame, facilitando a visualização dos ovários (DOMINGUES et al., 2007). Posteriormente, a fêmea era contida fisicamente na sua respectiva gaiola, com o auxílio de um estímulo eliciador, e anestesiada com a associação de cloridrato de ketamina (Dopalen 10%, Vetbrands, Paulínia/SP, Brasil), na dose de 12 mg/kg e cloridrato de xilazina (Anasedan 2%, Vetbrands, Paulínia/SP, Brasil), na dose de 1 mg/kg, administrados juntos na mesma seringa, por via intramuscular.

A fêmea era posicionada em decúbito dorsal e uma ampla tricotomia das regiões abdominal e pélvica eram realizadas sempre que necessário. Em seguida, era aplicado gel ultrassonográfico à pele (Maxicor produtos médicos Ltda., Pinhais/PR, Brasil) para assegurar o bom contato do transdutor. Os exames ultrassonográficos foram conduzidos com o ultrassom Modelo HDI 4000 da PHILIPS (Philips Medical Systems, Bothel/WA, Estados Unidos), equipado com transdutores multifrequênciais microconvexo (5-8 MHz) e linear (5-12 MHz), dispositivos Doppler Colorido e Doppler de Fluxo.

Os ovários e as estruturas ovarianas eram localizados com a US bidimensional em modo B, usando a bexiga urinária visualmente anecóica e o útero como órgãos de referência. O folículo, visualizado como uma estrutura anecóica, redonda e com uma borda bem delimitada dentro do ovário, era mensurado nos planos vertical e horizontal, utilizando-se a média desses dois diâmetros. Logo após a ovulação, o mesmo era visualizado como uma estrutura hipocogênica e com borda irregular (DOMINGUES et al., 2007).

### 3.7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU CÓPULA

#### 3.7.1. Seleção dos machos

Os machos utilizados para o acasalamento (n=6) faziam parte do grupo reprodutivo das fêmeas selecionadas do galpão de reprodução, enquanto que os utilizados na inseminação artificial (n=3) faziam parte do experimento de coleta e congelamento de sêmen, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais do Instituto Evandro Chagas (Nº 013/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS).

Todos os machos foram submetidos a um exame andrológico, que consistiu na inspeção testicular e avaliação do sêmen. Os testículos foram avaliados quanto a defeitos, consistência, forma, calor, mobilidade, tamanho e simetria, seguindo os parâmetros normais descritos para a espécie por Araújo et al. (2009). Para a inseminação artificial, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor, viabilidade (vivos e mortos) e defeitos patológicos nos espermatozoides (morfologia) após a dissolução do coágulo.

A concentração espermática foi mensurada em câmara de Neubauer, após a diluição e dissolução do coágulo seminal. A motilidade (0 a 100%) e o vigor (0 a 5) dos

espermatozoides foram avaliados subjetivamente em microscópio óptico (Nikon E400, Yokohama/Ka, Japão). A morfologia espermática e a porcentagem de espermatozoides vivos foram avaliadas em microscópio óptico após a coloração com eosina e nigrosina (Vetec, Duque de Caxias/RJ, Brasil) (OLIVEIRA et al., 2011). Somente os machos que exibiram testículos normais e sêmen com concentração de 15 a 20 milhões de espermatozoides, motilidade de 60-90% e vigor de 3-5 foram selecionados para a inseminação. Para a cópula utilizou-se o macho do grupo social da fêmea.

### **3.7.2. Inseminação artificial guiada por ultrassonografia**

Foram realizadas duas inseminações artificiais por fêmea após a detecção da ovulação. Para a coleta de sêmen, os machos eram contidos fisicamente nas suas respectivas gaiolas individuais, sempre pela manhã e ainda em jejum, com o auxílio de um estímulo eliciador e anestesiados conforme descrito no tópico 3.6.2. Posteriormente, era realizada a limpeza do pênis com solução fisiológica e gaze. O eletro-ejaculador utilizado era equipado com uma probe retal bipolar, adaptada para primatas, composta por dois eletrodos anelares, medindo 9 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento (Autojac-Neovet, Uberaba/MG, Brasil). A probe retal era lubrificada com ganadol<sup>®</sup> (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas/SP, Brasil) e posicionada ventralmente no reto, estendendo-se a aproximadamente 5 cm do esfíncter anal para estimular a próstata. Cada coleta consistia de 5 séries, com estímulos elétricos crescentes (15, 20, 25, 30, 35 estímulos) variando de 25 mA a 100 mA (1 a 12 V) e com intervalos de 30 segundos entre cada série, conforme preconizado por Oliveira et al. (2011). Durante a eletro-ejaculação, o pênis era posicionado dentro de um microtubo de 1,5 mL para coletar o sêmen. Depois do procedimento, o macho retornava para a gaiola individual onde era observado até a completa recuperação da anestesia.

Após a coleta, o sêmen foi diluído em TES-TRIS e mantido em banho-maria a 36°C até a dissolução do coágulo seminal. O diluidor TES-TRIS era composta por 4,9 g de TES, 1,06 g de TRIS, 0,2 g de D-frutose, 0,1 g de penicilina, 0,2 g de estreptomicina e 100 mL de água ultrapura (OLIVEIRA et al., 2011).

Para o procedimento de inseminação artificial, realizado sempre pela manhã, cada fêmea, ainda em jejum hídrico e alimentar, era contida fisicamente na sua respectiva gaiola, juntamente com a oferta de um estímulo eliciador. Em seguida, as fêmeas eram anestesiadas

conforme descrito no tópico 3.6.2. A fêmea foi posicionada em decúbito dorsal sobre uma calha cirúrgica, inclinada (30°) de modo que a pelve permaneça elevada durante todo o procedimento. Foi realizada a tricotomia e limpeza com solução fisiológica e gaze da região vulvar.

O sêmen foi aspirado com uma sonda uretral para gatos (PROVAR<sup>®</sup>, São Paulo/SP, Brasil) acoplada a uma seringa de 1 mL. A sonda foi introduzida na vagina e, com o auxílio da US bidimensional em modo B, foi guiada até alcançar o útero, onde o sêmen foi depositado. Após o procedimento, a fêmea retornava para o seu grupo reprodutivo de origem.

### **3.7.3. Cópula**

No período periovulatório da espécie (7 - 11 do ciclo menstrual) e quando o folículo alcançava o diâmetro máximo, identificado pela US, a fêmea retornava ao grupo reprodutivo de origem para ocorrer a cópula. Foi realizadas duas montas naturais por fêmea.

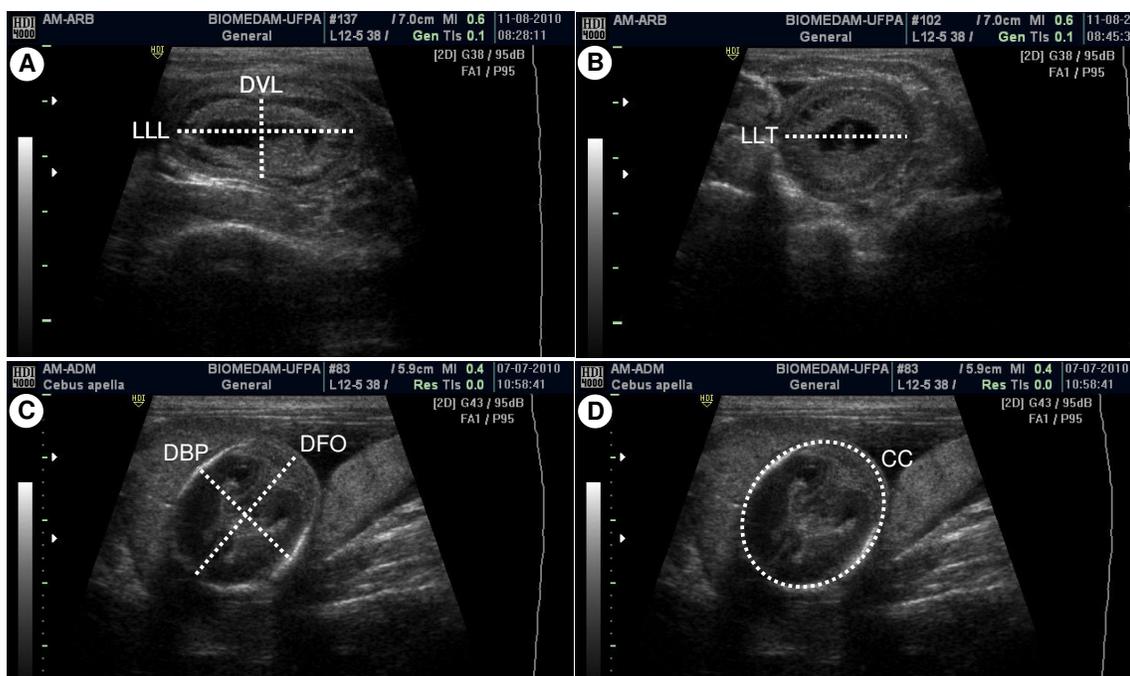
## **3.8. ACOMPANHAMENTO DA GESTAÇÃO POR MEIO DA ULTRASSONOGRAFIA**

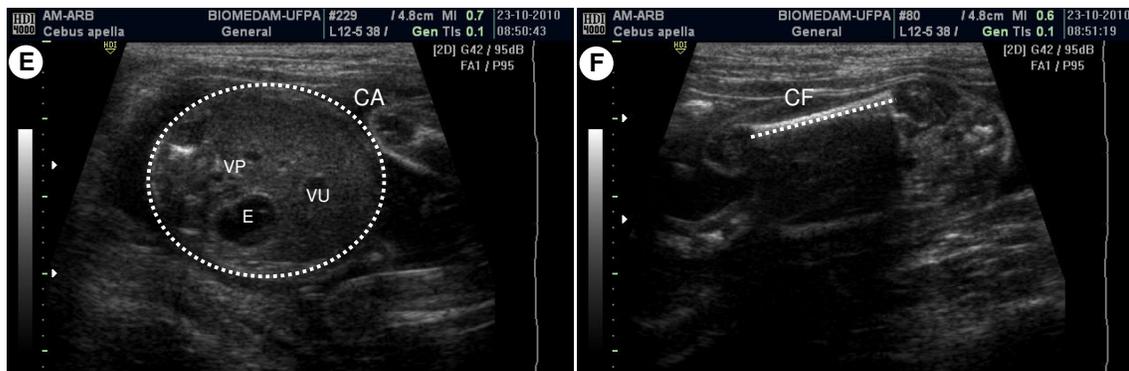
O diagnóstico da gestação foi realizado em todas as fêmeas, por meio da US, a partir do 24° dia após a inseminação ou período copulatório. O dia de cada exame em relação ao parto foi contado em retrospecto (nascimento = dia 0). Os exames ultrassonográficos foram feitos nos dias -133, -113, -83, -53, -21 e -1 antes do parto, sempre pelo mesmo ultrassonografista.

Para cada exame, a fêmea era contida fisicamente com puçá e sedada com a associação de cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoletil<sup>®</sup> 50, Virbac, Jurubatuba/SP, Brasil), na dose de 4,4 mg/kg, administrada por via intramuscular. A escolha deste anestésico, para o uso no diagnóstico da gestação, foi devido ao fato deste não ter efeito teratogênico. Em seguida, os procedimentos de preparo das fêmeas para o exame ultrassonográfico foram realizados conforme já descrito no tópico 3.6.2. Cada exame tinha a duração de aproximadamente 40 minutos.

Inicialmente, o útero era localizado utilizando-se a US bidimensional em modo B. A avaliação do desenvolvimento fetal era feita a partir da ecobiometria do concepto de cada fêmea, mensurando-se os diâmetros do saco gestacional (SG), os diâmetro biparietal (DBP), fronto-occipital (DFO), circunferência da cabeça (CC), circunferência abdominal (CA) e comprimento do fêmur (CF). Sendo cada um desses parâmetros obtidos e medidos pelo menos três vezes.

Os diâmetros látero-lateral e dorso-ventral do SG foram mensurados na secção longitudinal do útero (LLL e DVL; Figura 4A) e os diâmetro látero-lateral do SG na secção transversal do útero (LLT; Figura 4B). Os DBP, DFO (Figura 4C) e CC (Figura 4D) foram determinados na secção transversal da cabeça, ao nível do tálamo posicionado equidistante a linha média têmporo-parietal (CORRADINI et al., 1998; NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004). A CA (Figura 4E) foi obtida na secção transversal do abdômen ao nível do estômago, porção intraabdominal da veia umbilical e da bifurcação da veia porta principal, tendo o cuidado para não deformar a circunferência com uma pressão do transdutor (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004). O CF (Figura 4F) foi estabelecido a partir da distância externa entre cada metáfise (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004). Todas as mensurações ecobiométricas do concepto foram aferidas em centímetros. Quando os órgãos genitais foram visualizados era realizada a sexagem do feto.





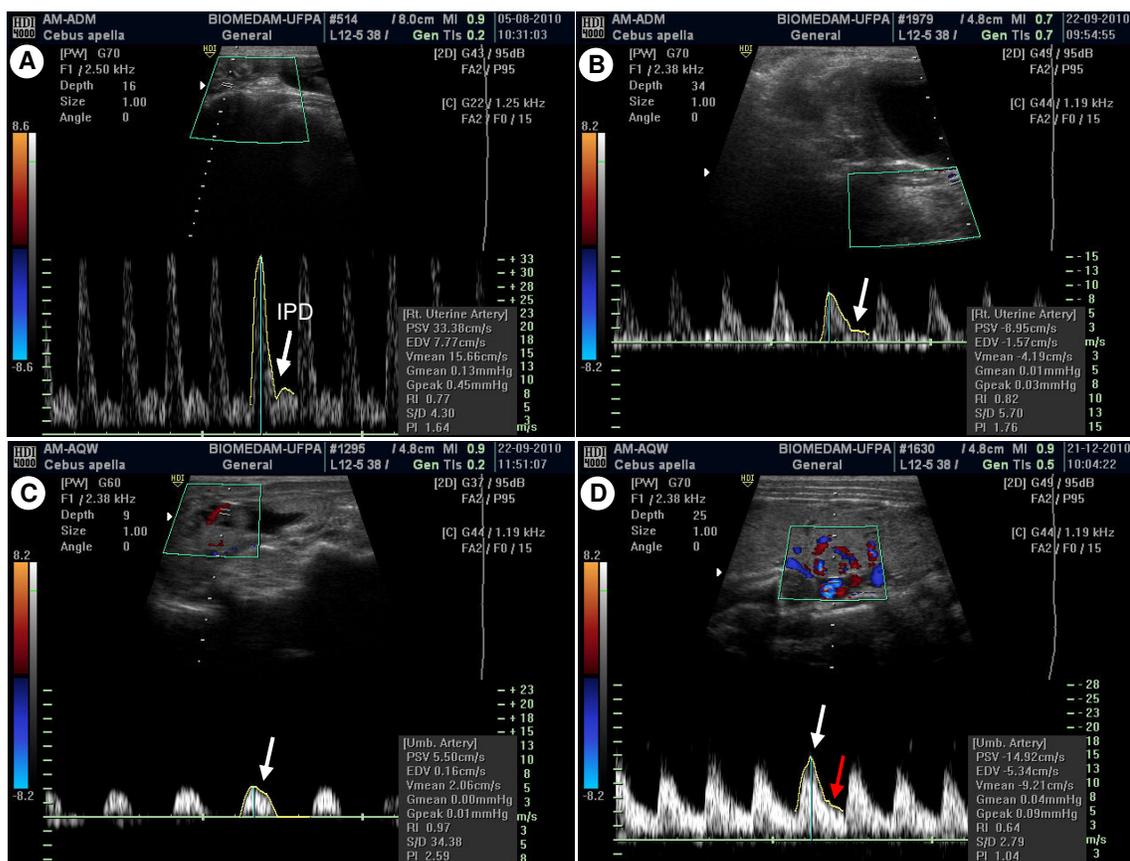
**Figura 4.** Ecobiometria do conceito por meio da ultrassonografia bidimensional em modo B em macaca-prego. **(A)** Diâmetros látero-lateral (LLL) e dorso-ventral (DVL) do saco gestacional na secção longitudinal do útero no dia -133 (nascimento = dia 0). **(B)** Diâmetro látero-lateral (LLT) do saco gestacional na secção transversal do útero no dia -133. Secção transversal da cabeça, ao nível do tálamo posicionado equidistante a linha média têmporo-parietal, mostrando os diâmetros **(C)** biparietal (DBP), fronto-occipital (DFO) e **(D)** circunferência da cabeça (CC) no dia -83. **(E)** Secção transversal do abdômen mostrando a circunferência abdominal (CA), ao nível do estômago (E), porção intraabdominal da veia umbilical (VU) e da bifurcação da veia porta principal (VP), no dia -53. **(F)** Mensuração do comprimento do fêmur (CF) a partir da distância externa entre cada metáfise no dia -53.

Com o auxílio do Doppler Colorido, as artérias uterinas (AU) direita e esquerda foram mapeadas na secção longitudinal, próximo ao útero, e a artéria umbilical (Aum) próximo à superfície da placenta. Após a identificação dos vasos sanguíneos de interesse, o modo Doppler de Fluxo era acionado para a obtenção do amostral do Doppler pulsátil. O calípter era posicionado, aproximadamente, no centro da AU (Figura 5A e B) e Aum (Figura 5C e D) para o registro das ondas de fluxo e cálculo de ambos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP). Considerou-se alcançada a correta identificação do fluxo arterial, quando o padrão gráfico do Doppler de Fluxo apresentava no mínimo três picos sistólicos consecutivos, com a mesma velocidade e amplitude de onda. Os IR e o IP foram calculados automaticamente pelo software do ultrassom de acordo com as seguintes fórmulas estabelecidas por Pourcelot (1974) e Gosling et al. (1971), respectivamente:

$$IR = \frac{\text{Pico de velocidade sistólica} - \text{Velocidade diastólica final}}{\text{Pico de velocidade sistólica}}$$

$$IP = \frac{\text{Pico de velocidade sistólica} - \text{Velocidade diastólica final}}{\text{Velocidade média do ciclo}}$$

A presença e a ausência da incisura protodiastólica, em todas as ondas de fluxo das AU (Figura 5A e B), e o momento em que o fluxo sistólico e diastólico da Aum apareceram (Figura 5C e D) foram anotados durante o período gestacional analisado. A frequência cardíaca fetal foi mensurada usando o Triplex Doppler, tendo como parâmetro à secção longitudinal do coração. Ao final de cada procedimento e total recuperação anestésica as fêmeas retornavam ao grupo de origem.



**Figura 5.** Triplex Doppler das artérias uterinas (AU) e umbilical (Aum) de macaca-prego gestante. (A) AU no dia -53 (nascimento = dia 0) com a incisura protodiastólica (IPD). (B) AU no dia -1 sem a IPD (seta). (C) Aum no dia -113 somente com o componente sistólico (seta) (D) Aum no dia -23 com o componente sistólico (seta branca) e diastólico (seta vermelha).

### 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

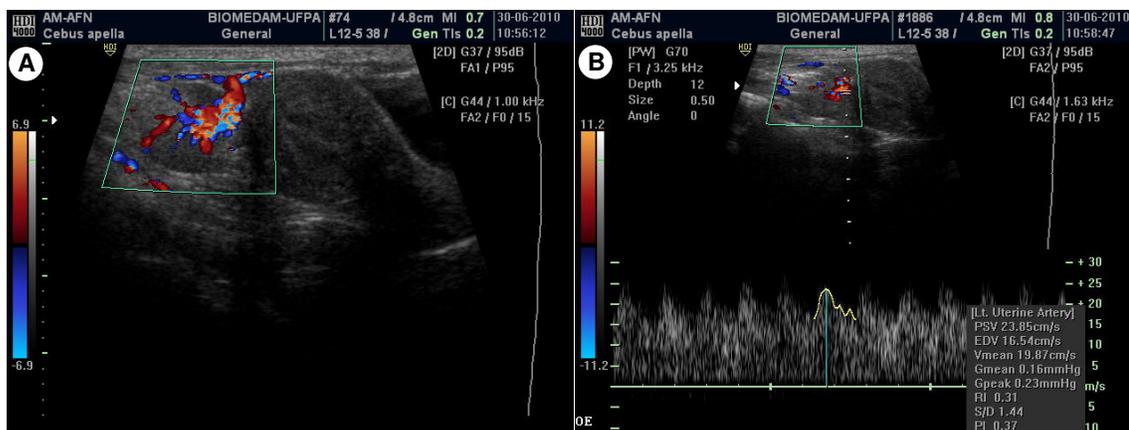
A análise de regressão foi utilizada para fornecer equações representando as relações entre os dias antes do parto com a ecobiometria do concepto, IR, IP das AU e Aum. Todas as análises foram feitas com o software Stat View (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e foi considerado significativo o  $P < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Após a primeira semana de condicionamento diário, as fêmeas se aproximavam na frente da gaiola e, depois da segunda ficaram menos agressivas com a diminuição do espaço, permitindo a contenção física. Na terceira semana, foi possível a realização da colpocitologia, somente com a contenção física e oferta de uvas, iogurte, leite condensado ou tenébrio.

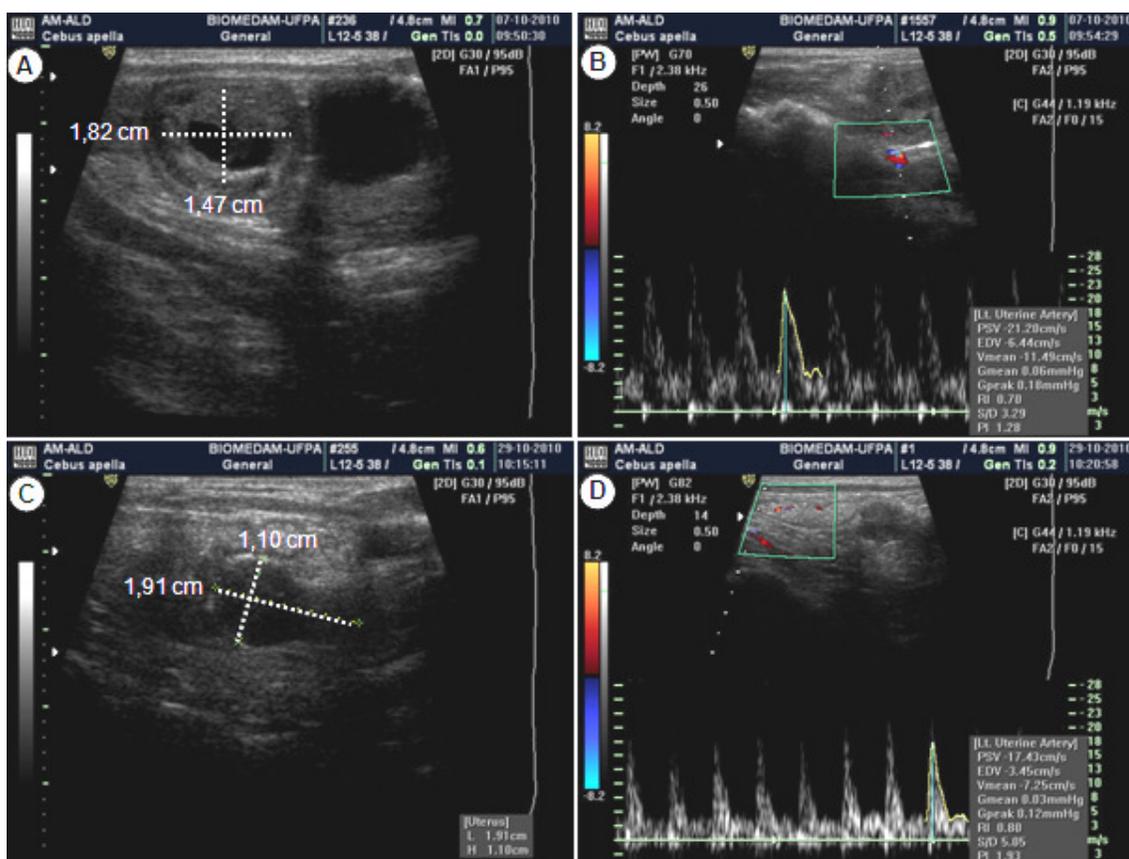
Foram realizadas 9 inseminações artificiais e 13 montas naturais. As inseminações foram realizadas no 8º (1 fêmea) ou 9º dia (5 fêmeas) do ciclo menstrual, após observada a ovulação pela US. Na monta natural, as fêmeas retornavam ao grupo reprodutivo no 7º (1 fêmea) ou 8º dia (5 fêmeas), quando o folículo dominante alcançava o maior diâmetro. O diâmetro máximo do folículo dominante foi em média  $0,87 \pm 0,07$  cm.

Das seis fêmeas inseminadas, nenhuma resultou em nascimento de filhotes. No entanto, após 24 dias da inseminação, em uma das fêmeas foi observado, pela US bidimensional em modo B, um aumento do comprimento (2,25 para 2,42 cm) e altura (1,53 para 1,74 cm) do útero, bem como aumento da perfusão sanguínea na artéria do ligamento útero-ovariano direita e esquerda (Figura 6A), representado pela diminuição dos índices de resistividade (IR: 0,41 e 0,31) e pulsatilidade (IP: 0,57 e 0,37), respectivamente (Figura 6B), podendo ter ocorrido uma reabsorção.



**Figura 6.** (A) Doppler Colorido mostrando aumento da perfusão sanguínea e (B) Triplex Doppler mostrando baixos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) na artéria do ligamento útero-ovariano de uma macaca-prego, 24 dias após a inseminação.

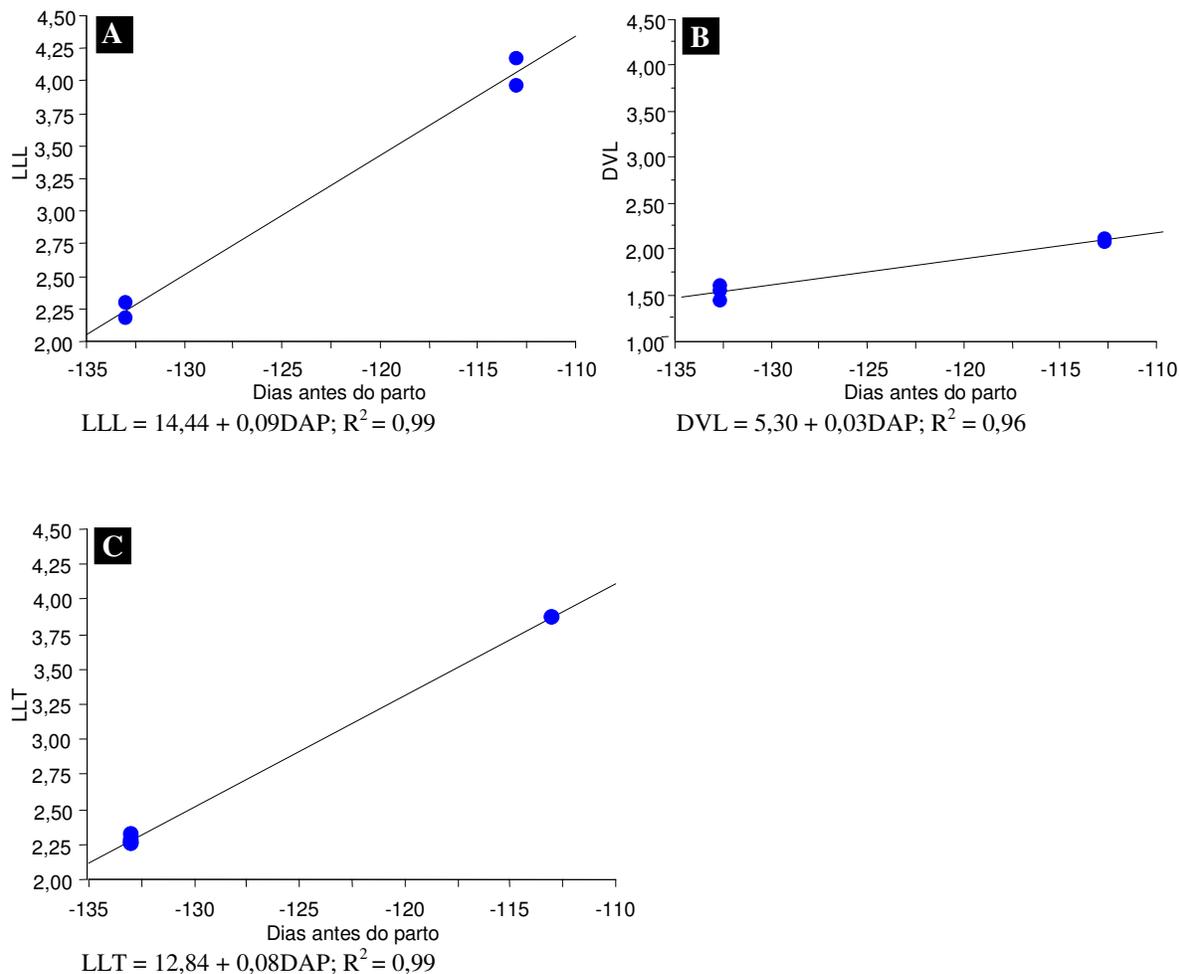
Das seis fêmeas que copularam com os machos dos seus respectivos grupos sociais, ocorreram quatro gestações, sendo que três resultaram em nascimento de um filhote saudável por fêmea (três filhotes) e em uma ocorreu abortamento (Figura 7). A fêmea que abortou apresentou sangramento no dia seguinte após o exame ultrassonográfico (dia -133). Após 22 dias do abortamento, foi feita a avaliação do útero, quando se observou a ausência do saco gestacional (Figura 7C) e aumento dos IR e IP das artérias uterinas (Figura 7D).



**Figura 7.** (A) Ultrassonografia (US) bidimensional em modo B do útero com o saco gestacional (SG) e (B) Triplex Doppler da artéria uterina (AU) antes do abortamento. (C) US bidimensional em modo B do útero sem o SG e (D) Triplex Doppler da AU mostrando aumento dos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) 22 dias após o abortamento.

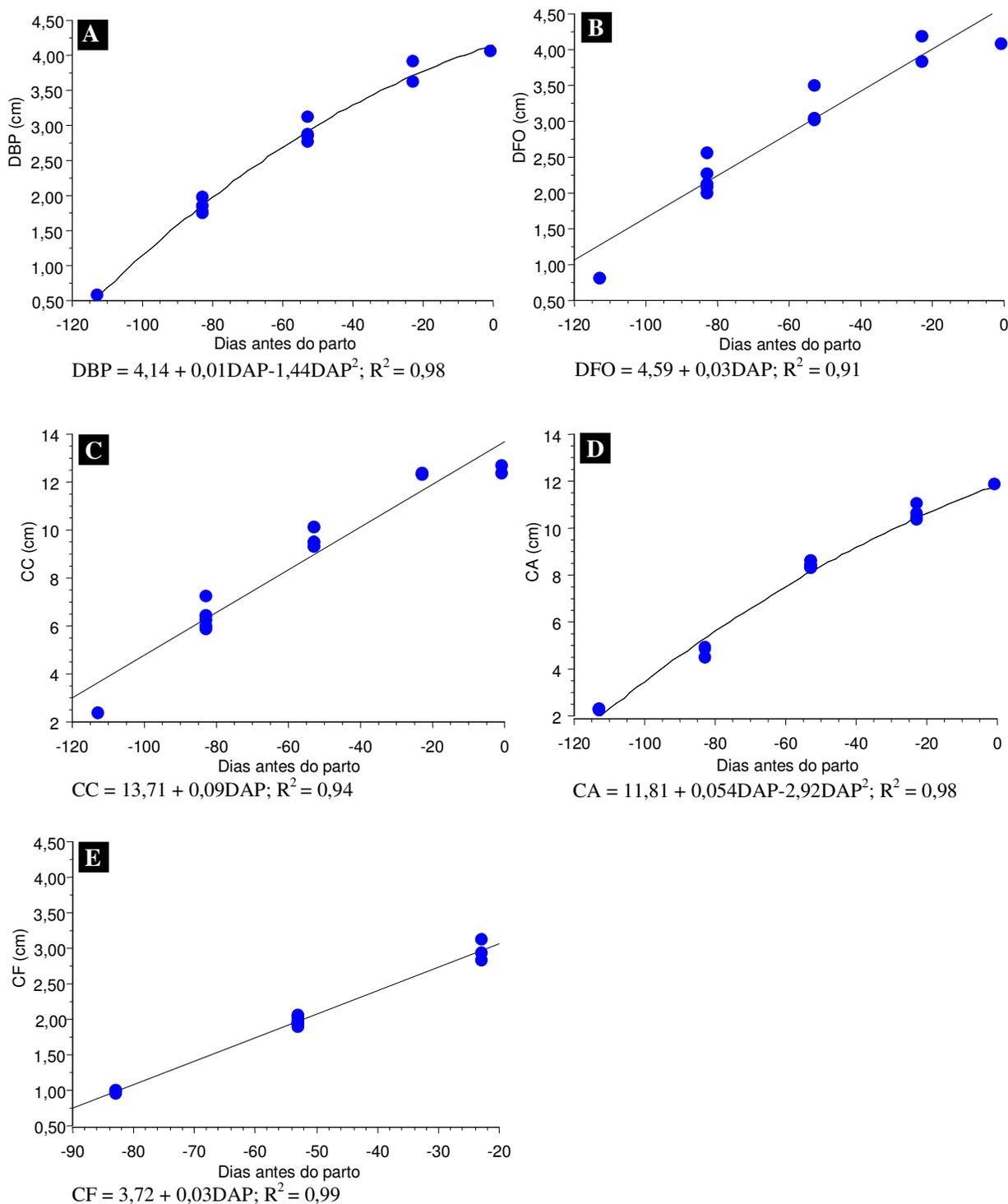
Foram realizados 18 exames ultrassonográficos. Cada gestação durou em média  $160 \pm 3$  dias. A partir do dia -133 até -113, o SG apresentou uma forma ovóide que facilitou a mensuração do seu diâmetro, com valor máximo no dia -113 (Figura 8). Os diâmetros do SG não foram mensurados após o dia -113, devido ao seu tamanho que excedeu o campo de imagem. Com a análise de regressão foi possível observar a relação dos dias antes do parto

(DAP) com os diâmetros LLL, DVL e LLT do saco gestacional (Figura 8). A figura 8 mostra as equações de regressão para a relação entre os DAP e os diâmetros LLL, DVL e LLT do saco gestacional. Para cada equação, tanto o intercepto quanto o coeficiente de regressão foram significativos.



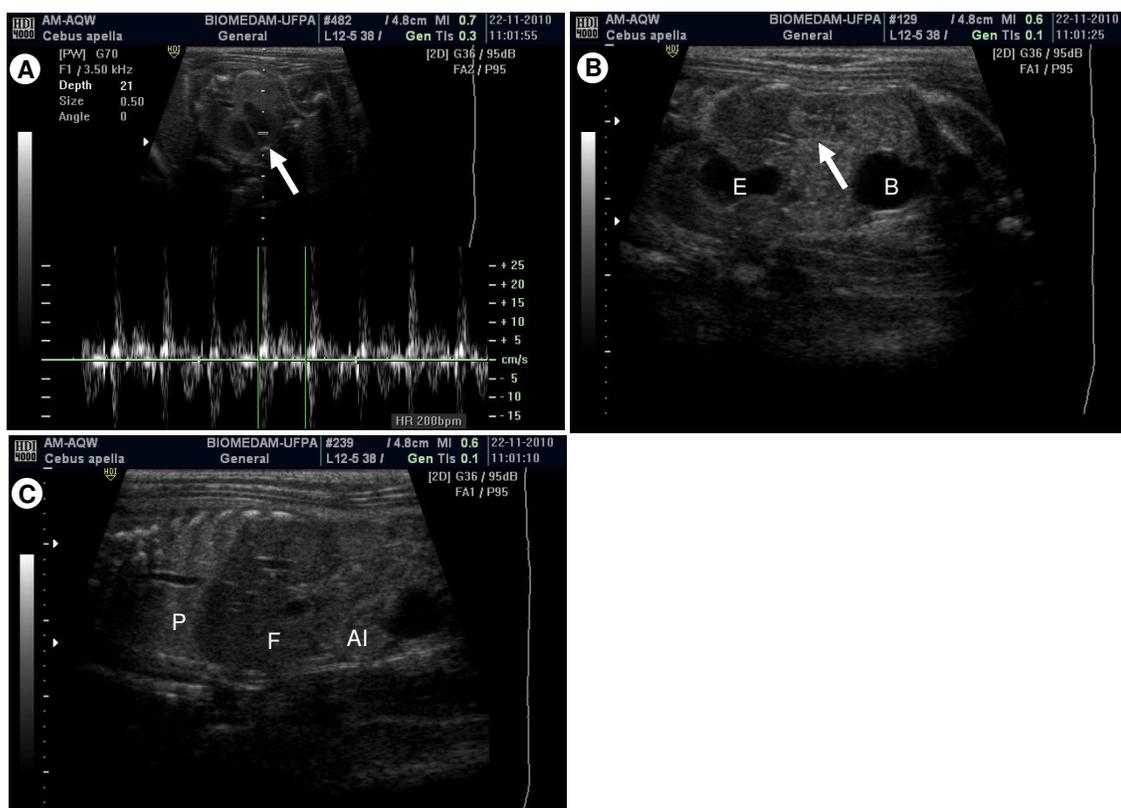
**Figura 8.** Gráfico da análise de regressão mostrando o aumento dos diâmetros (A) látero-lateral (LLL) e (B) dorso-ventral do saco gestacional na secção longitudinal, e (C) látero-lateral (LLT) do saco gestacional na secção transversal com o avanço da gestação.

A partir do dia -113 o feto foi visualizado, dando início as mensurações dos DBP, DFO, CC e CA entre os dias -113 a -1 e CF do dia -53 até -23 (Figura 9). A análise de regressão demonstra a relação dos DBP, DFO, CC, CA e CF com os DAP (Figura 9). Nas equações de regressão para as relações entre os DAP e a ecobiometria fetal (Figura 9), tanto o intercepto quanto o coeficiente de regressão foram significativos.



**Figura 9.** Gráfico da análise de regressão mostrando o aumento dos diâmetros (A) biparietal (DBP), (B) fronto-occipital (DFO), (C) circunferência da cabeça (CC), (D) circunferência abdominal (CA) e (E) comprimento do fêmur (CF) com o avanço da gestação.

O coração e estômago foram visualizados no dia -113 (Figura 10A e B). A partir do dia -83, a bexiga, pulmões, fígado, rins e alças intestinais foram observados (Figura 10B e C), bem como foi possível realizar a sexagem dos fetos, quando foi constatado que, dos 3 fetos monitorados pela US, 1 era macho (Figura 11A) e 2 eram fêmeas (Figura 11B), confirmando após o nascimento.



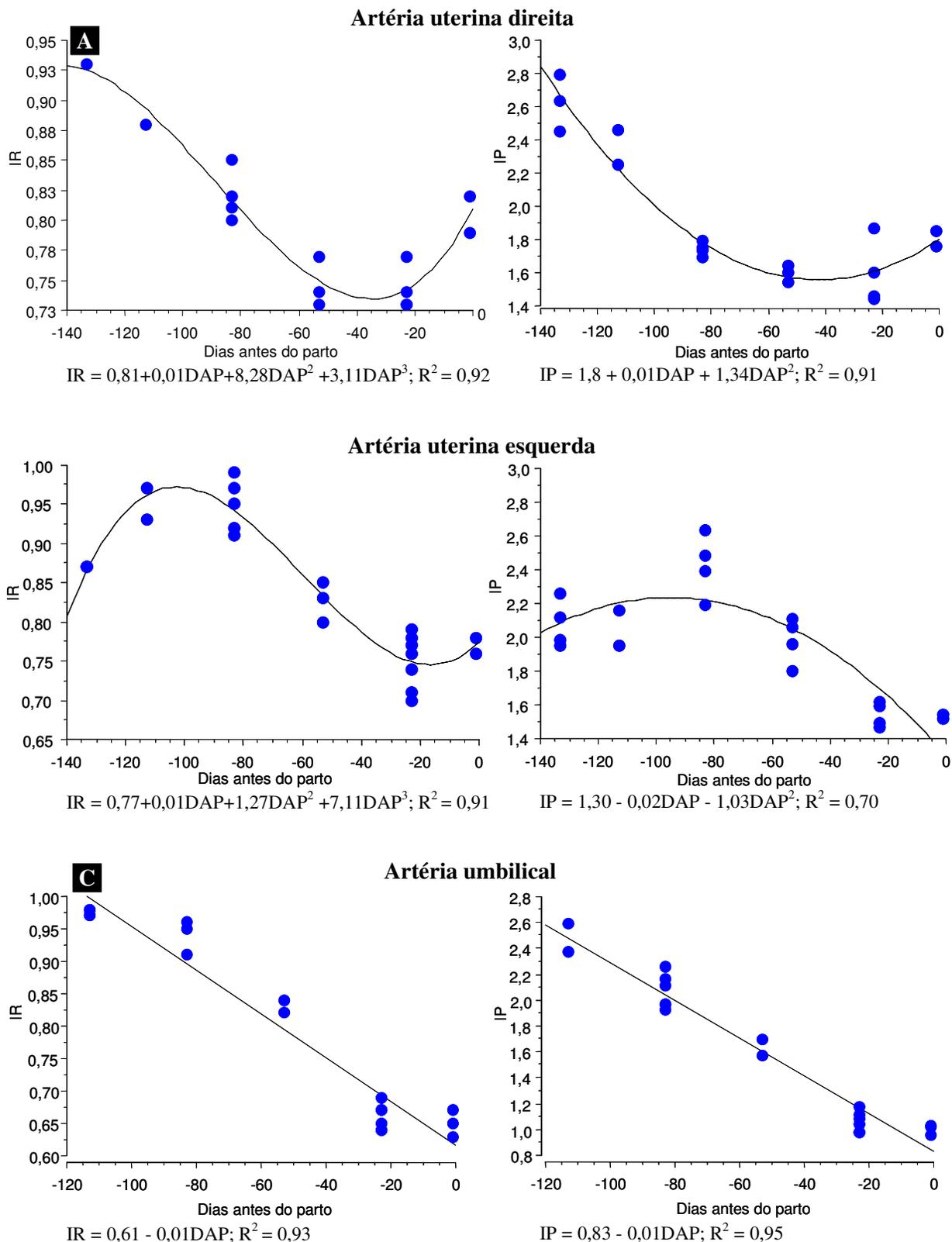
**Figura 10.** Ultrassonografia bidimensional em modo B mostrando a organogênese fetal em *C. apella* no dia -53 antes do parto. (A) Coração (seta); (B) Estômago (E), bexiga (B) e rim (seta); (C) Pulmão (P), fígado (F) e alças intestinais (AI).



**Figura 11.** Sexagem de fetos de macacas-prego por meio da ultrassonografia bidimensional em modo B a partir do dia -83 antes do parto. (A) Macho e (B) Fêmea. As setas indicam o sexo do feto.

Do dia -133 a -1, a análise de regressão demonstra a relação dos dias antes do parto com o fluxo sanguíneo das artérias uterinas (AU), representado por mudanças nos IR e IP (Figura 12A e B). A incisura protodiastólica estava presente na onda de fluxo das AU direita e esquerda do dia -133 até -23 antes do parto (Figura 5A), estando ausente no dia -1 (Figura 5B).

Entre os dias -113 a -1, ocorreram mudanças nos IR e IP da artéria umbilical (Aum), demonstrando a relação dos dias antes do parto com fluxo sanguíneo dessa artéria (Figura 12C). Na onda de fluxo da Aum, o componente sistólico foi observado a partir do dia -113 antes do parto (Figura 5C), enquanto que o componente diastólico foi detectado no dia -53 (Figura 5D). Nas equações de regressão para os dias antes do parto e os IR e IP das AU direita, esquerda e umbilical (Figura 12), tanto o intercepto quanto o coeficiente de regressão foram significativos. A média da frequência cardíaca, entre os dias -113 a -1, foi de  $189 \pm 2,43$  bpm.



**Figura 12.** Gráfico da análise de regressão mostrando mudanças nos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) das artérias uterinas (A) direita, (B) esquerda e (C) artéria umbilical (Aum) com o avanço da gestação.

## 5. DISCUSSÃO

A relação do fluxo sanguíneo da artéria uterina (AU) com os dias antes do parto, representado por mudanças nos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP), com o avanço da gestação (Figura 11A e B), fornece suporte para a hipótese de que essas variações podem estar interligadas ao aumento da demanda nutricional para o feto em crescimento (FERRELL; FORD, 1980; MIRANDA; DOMINGUES, 2010), visto que ocorrem transformações concomitantes nas dimensões do feto (Figura 9). Em mulheres, a diminuição acentuada do IR da AU, no início do segundo trimestre da gestação, foi atribuída à invasão trofoblástica no endométrio durante a placentação e vascularização (GUZMAN et al., 1990). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar a relação da implantação embrionária e placentação com o fluxo sanguíneo uterino em *Cebus apella*.

Outro importante fator a ser avaliado na onda de fluxo sanguíneo da AU é a incisura protodiastólica (IPD), pois a presença dessa, no final da gestação, está associada a um fluxo de alta resistência retornando da AU (MO et al., 1988) ou da circulação fetoplacentária (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004). Assim, como em mulheres (MEEKINS et al., 1994) e em outras espécies animais (MIRANDA; DOMINGUES, 2010; BRITO et al., 2010), a IPD está normalmente presente na onda de fluxo sanguíneo das AU de macacas-prego (Figura 5A), representando uma diminuição na velocidade do fluxo sanguíneo logo após a sístole (THALER; WEINER; ITSKOVITZ, 1992). Entretanto, ela desaparece completamente no dia -1 antes do parto (Figura 5B). É importante observar que a AU pôde ser monitorada ao longo de toda a gestação, enquanto que a ecobiometria do concepto e a artéria umbilical (Aum) foram limitadas a determinados períodos.

O surgimento do componente diastólico na onda de fluxo sanguíneo da Aum (Figura 5D), no dia -53 antes do parto, e o desenvolvimento da circulação fetal e placentária podem ser responsáveis pelas mudanças nos IR e IP da Aum durante a gestação (Figura 11C), corroborando com os achados similares em mulheres (GUZMAN et al., 1990), cadelas (MIRANDA; DOMINGUES, 2010), gatas (BRITO et al., 2010) e camundongos (MU; ADAMSON, 2006) após o fim da organogênese. A presença do componente diastólico na onda de fluxo sanguíneo da Aum pode estar associada à maturação da placenta e/ou desenvolvimento cardiovascular do feto (MU; ADAMSON, 2006).

A partir do dia -23, a ausência do componente diastólico e elevados valores para os IR e IP da Aum podem ser interpretados como fluxo de alta resistência presente na placenta,

talvez relacionado com uma restrição do crescimento fetal (SEYAM; AL-MAHMEID; AL-TAMIMI, 2002). Além disso, a placentação e a invasão trofoblástica anormais podem resultar em alterações nas ondas de fluxo sanguíneo das AU (BASCHAT, 2003; NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004) e Aum (BASCHAT, 2003), manifestando elevados IR e IP, que podem ser identificados pelo Triplex Doppler para prever um desenvolvimento fetal anormal ou uma restrição do crescimento intrauterino. No entanto, apesar de já relatado a importância de se avaliar a AU e Aum em mulheres gestantes (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004), alguns trabalhos anteriores com primatas não-humanos (NYLAND et al., 1984; CORRADINI et al., 1998; TARDIF et al., 1998; VAN CALSTEREN et al., 2009) realizaram somente a ecobiometria do concepto por meio da US bidimensional em modo B.

Neste estudo, foi avaliado também o desenvolvimento do concepto por meio da ecobiometria do SG, DBP, DFO, CC, CA e CF. No início da gestação (dia -133 a -113), os diâmetros do SG foram os mais precisos para relacionar o crescimento do concepto com os dias antes do parto (Figura 8). A partir do dia -113 a -1, as mensurações dos DBP, DFO, CC e CA, e do dia -53 até -23, o CF, foram as mais precisas para relacionar o desenvolvimento do feto com os dias antes do parto (Figura 9). Os períodos em que o SG, DBP e CF foram obtidos, bem como os respectivos valores encontrados, estão dentro das médias descritas por Corradini et al. (1998). No entanto, este autor mensurou o SG somente em dois diâmetros e não avaliou o DFO, CC e CA. Van Calsteren et al. (2009), em *Papio anubis*, e Nyland et al. (1984), em *Macaca mulata*, mensuraram também os DBP, CC, CA e CF, demonstrando que houve um aumento progressivo nesses parâmetros com o avanço da gestação.

A análise de regressão mostrou que existe uma relação entre os dias antes do parto com a ecobiometria do concepto, concomitante com as mudanças nos IR, IP e onda de fluxo das AU e Aum. Portanto, o monitoramento da ecobiometria do concepto e das mudanças nas características do fluxo sanguíneo das AU e Aum, durante a gestação, são extremamente importantes para avaliar o desenvolvimento e a vitalidade fetal, podendo ser fundamental no diagnóstico de restrição do crescimento intrauterino ou crescimento acelerado do feto. Entre as duas, a restrição do crescimento intrauterino está mais relacionada a altos riscos de morbidade e mortalidade fetal, quando comparado aos fetos com crescimento adequado de acordo com a idade gestacional (BERNSTEIN et al., 2000), uma vez que se observa um maior número de anomalias fetais (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004). Por exemplo, uma CA pequena para a idade gestacional é um marcador preciso para restrição do crescimento intrauterino e pode refletir na redução do tamanho do fígado e de outros órgãos abdominais (ROBERTS et al., 1999). Além disso, o DBP, DFO e CC fornecem o tamanho da cabeça, que

por sua vez, reflete o tamanho do cérebro (NYBERG; ABUHAMAD; VILLE, 2004). A microcefalia, por exemplo, é diagnosticada quando a CC está abaixo da média para a idade gestacional (BRANDON; KIRMAN; WILLIAMS, 1959). Em *Callithrix jacchus*, o DBP foi o melhor parâmetro para relacionar com a idade gestacional, mostrando que o diagnóstico de um DBP pequeno para idade gestacional resultou na morte fetal sete dias após o nascimento (TARDIF et al., 1998).

O desenvolvimento fetal progride rapidamente a partir do dia -113, permitindo o reconhecimento ultrassonográfico da organogênese, estando todos os órgãos visíveis no dia -83, sendo este um importante parâmetro para avaliar a vitalidade fetal, pois pode confirmar uma restrição do crescimento intrauterino (ROBERTS et al., 1999). Contudo, os trabalhos com primatas não-humanos descrevem somente o aparecimento do coração (CONRAD; SACKETT; BURBACHER, 1989; CORRADINI et al., 1998; BOURRY et al., 2006). No dia -83 foi possível também realizar a sexagem fetal, ainda não descrita em primatas não-humanos, e observou-se que o período gestacional foi mais longo (164 dias) para o feto identificado como macho, corroborando com os achados similares para éguas e vacas, onde a gestação é mais longa quando se trata de uma prenhez de feto macho (ALMEIDA, 1999). Entretanto, a média do período gestacional encontrada neste trabalho ( $160 \pm 3$  dias) encontra-se dentro da variação descrita por Corradini et al. (1998) (154-162 dias) e Nagle e Denari (1983) (148-162).

A frequência cardíaca (FC) do feto não apresentou grande variação ao longo da gestação (182 a 200 bpm), quando comparado aos achados descritos por Corradini et al. (1998), onde foi observado uma diminuição da FC com o avanço da gestação, proporcionando até mesmo uma equação linear. No entanto, Corradini et al. (1998) utilizou cloridrato de quetamina (10mg/kg) na contenção química das fêmeas, diferente do protocolo anestésico empregado no presente trabalho, associação de cloridrato de tiletamina e zolazepam (4,4 mg/kg), o que pode ter influenciado nessa variação.

O desenvolvimento de métodos para avaliação da vitalidade fetal tem aumentado na obstetrícia humana, resultando no diagnóstico precoce de gestações anormais ou sofrimento fetal, facilitando a intervenção precoce. A utilização de técnicas, como o Triplex Doppler, pode ser útil para prever alterações na gestação, antes mesmo de outros sinais ultrassonográficos aparecerem. Sendo assim, o Triplex Doppler pode ser utilizado com frequência no monitoramento da gestação na espécie *C. apella*, a fim de avaliar, até mesmo, a eficácia de programas de reprodução assistida.

No entanto, para a eficácia dos programas de reprodução assistida, é necessário um manejo adequado dos animais antes e após qualquer procedimento, para que o estresse seja evitado. O estresse promove a liberação de corticóides pelo córtex adrenal (MOBERG, 2000), levando a um *feedback* negativo na produção de GnRH pelo hipotálamo e consequente diminuição da secreção de LH e FSH. Essas alterações hormonais podem causar problemas reprodutivos como o atraso na puberdade e baixa taxa de fertilidade (RAZDAN et al., 2001). Com o condicionamento das fêmeas foi possível monitorar o ciclo reprodutivo até a detecção da menstruação, poupando o estresse causado durante contenções físicas e/ou químicas, além de evitar o desperdício com anestésico. Nos trabalhos anteriores com *C. apella* (WRIGHT; BUSH, 1977; ORTIZ et al., 1995; CORRADINI et al., 1998; DOMINGUES et al., 2007), não foi relatado o uso do condicionamento para a colpocitologia, e alguns autores realizaram a contenção química para esse procedimento (DOMINGUES et al., 2007). Segundo Nagle e Denari (1983), a fêmea de *Cebus* pode ser treinada para expor sua genitália permitindo a colpocitologia, porém esse procedimento é trabalhoso e nem todas permitem.

O grupo social de *C. apella* é composto por fêmeas e machos dominantes e subordinados. Normalmente, as fêmeas dominantes tentam impedir que as subordinadas copulem com os machos dominantes. Linn et al. (1995) descreveram que as taxas de acasalamentos com os machos dominantes são menores, indicando que existe concorrência reprodutiva feminina. Neste sentido, supõe-se que as baixas taxas de concepção obtidas na monta natural estejam relacionadas com a perda da hierarquia da fêmea dominante, ao ser afastada do grupo para o monitoramento do ciclo reprodutivo. Em *C. apella*, outro trabalho com monta natural de seis fêmeas relatam também baixas taxas de concepção, que resultaram em três gestações e um abortamento (WRIGHT; BUSH, 1977).

A perda e disputa da hierarquia dentro do grupo pode ainda ocasionar o estresse. Segundo Jaquish et al. (1996), a morte embrionária pode ter muitas causas, tais como má nutrição materna, estresse, doença e desenvolvimento fetal inadequado. Sendo assim, um manejo inadequado de fêmeas gestantes pode resultar em taxas de abortamento de aproximadamente 100%. Porém, com um manejo apropriado as taxas de perdas fetais não devem ser superiores a 20% (NAGLE; DENARI, 1983). No entanto, seria necessária uma avaliação endócrina para afirmar que o abortamento e a provável reabsorção, ocorridos no presente trabalho, tenham relação com o estresse que a fêmea foi submetida ao retornar para o grupo.

## 6. CONCLUSÃO

As equações obtidas no presente trabalho, relacionando os dias antes do parto com os parâmetros mensurados durante a gestação (LLL, DVL, LLT, DBP, DFO, CC, CA e CF), permitiram determinar a idade gestacional para avaliar o crescimento anatômico do feto. Além disso, foi possível descrever o momento em que os órgãos são visualizados e realizar a sexagem. As equações mostrando a relação dos dias antes do parto com os IR e IP das AU e Aum demonstram, também, que o fluxo sanguíneo dessas artérias são importantes parâmetros para avaliar a vitalidade fetal em *Cebus apella*, pois as mudanças nos IR e IP, bem como o desaparecimento da IPD na onda de fluxo da AU e o aparecimento do componente diastólico na onda de fluxo da Aum ocorrem simultaneamente ao crescimento fetal. Desse modo, a ultrassonografia permitiu estudar a fisiologia da gestação na espécie *C. apella*, estabelecendo parâmetros de referência que poderão ser utilizados para monitorar gestações normais e de risco.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.M. Período fetal e parturição. In: \_\_\_\_\_ **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

AMBOKA, J.N.O.; MWETHERA, P.G. Characterization of Semen from Olive Baboons. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, n. 6, p. 325-29, 2003.

ARAÚJO, L.L., et al. Uso de solução à base de água de coco a 37°C como diluidor de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira (UFG)**, v. 10, n. 2, p. 588-94, 2009.

BASCHAT, A.A. Integrated fetal testing in growth restriction: combining multivessel Doppler and biophysical parameters. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 21, p. 1-8, 2003.

BERNSTEIN, I.M., et al. Morbidity and mortality among very-low-birth weight neonates with intrauterine growth restriction. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 182, p. 198-202, 2000.

BOURRY, O., et al. Fetal ultrasonography: biometric data from four African primate species. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, p. 38-47, 2006.

BRANDON, M.W.G.; KIRMAN, B.H.; WILLIAMS, C.E. Microcephaly. **Jornal Mental Science**, v. 105, p. 721, 1959.

BRITO, A.B., et al. Assessment of feline fetal viability by conceptus echobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 276-81, 2010.

COLEMAN, M.A.; McCOWAN, L.M.; NORTH, R.A. Mid-trimester uterine artery Doppler screening as a predictor of adverse pregnancy outcome in high-risk women. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 15, p. 7-12, 2000.

CONRAD, S.H.; SACKETT, G.P.; BURBACHER, T.M. Diagnosis of early pregnancy by ultrasound in *Macaca fascicularis*. **Journal of Medical Primatology**, v. 18, p. 143-54, 1989.

CORRADINI, P., et al. Study of prenatal growth in the capuchin monkey (*Cebus apella*) by ultrasound. **Journal of Medical Primatology**, v. 27, n. 6, p. 287-92, 1998.

DIXSON, A.F.; ANDERSON, M.J. Sexual selection, Seminal coagulation and Copulatory plug formation in Primates. **Folia Primatologica**, v. 73, p. 63-9, 2002.

DOMINGUES, S.F.S., et al. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). **Theriogenology**, v. 68, p. 1251-59, 2007.

EMMONS, L. **Neotropical Rainforest Mammals**. Chicago and London: The University of Chicago Press, 1990.

FARRELL, T.; CHIEN, P.F.W.; MIRES, G.J. The reliability of the detection of an early diastolic notch with uterine artery Doppler velocimetry. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 105, p. 1308-11, 1998.

FAY, R.A., et al. Colour Doppler imaging of the uteroplacental circulation in the mid-trimester: Features of the uterine artery flow-velocity waveform that predict abnormal pregnancy outcome. **Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 34, p. 515-19, 1994.

FERRELL, C.L.; FORD, S.P. Blood flow steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 1113-21, 1980.

FLEISCHER, A., et al. Umbilical artery velocity waveforms and intrauterine growth retardation. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 151, p. 502-5, 1985.

FORBES, P.B.; MACKETH, R.P. **All The World's Animals: Primates**. New York, Toronto: Torstar Books, 1984.

FRAGASZY, D.M.; ADAMS-CURTIS, L. Growth and reproduction in captive tufted capucins (*Cebus apella*). **Animal Journal of Primatology**, v. 44, p. 197-203, 1998.

FRAGASZY, D.M.; VISALBERGHI, E.; FEDIGAN, L.M. **The complete capuchin: the biology of the genus *Cebus***. Massachusetts: Cambridge University Press, 2004.

FRESE, C.H.; OPPENHEIMER, J.R. The capuchin monkeys, Genus *Cebus*. In: COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER (Ed.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1981. v. 1, p. 331-90.

FREITAS, R.J., et al. Dopplerfluxometria das artérias uterinas no terceiro trimestre. **Revista Médica do Paraná**, v. 62, p. 8-11, 2004.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. cap. 7, 582p.

GASCHEN, L.; MENNINGR, K.; SCHUURMAN, H.J. Ultrasonography of the normal kidney in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): morphologic and Doppler Findings. **Journal of Medical Primatology**, v. 29, p. 76-84, 2000.

GOSLING, R.G., et al. The quantitative analysis of occlusive peripheral arterial disease by a non-intrusive ultrasonic technique. **Angiology**, v. 22, p. 52-5, 1971.

GUZMAN, E.R., et al. Umbilical artery Doppler velocimetry in pregnancies of less than 21 weeks' duration. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 9, p. 655-9, 1990.

HEARN, J. New World Primates for Research in Human Reproductive Health. **American Journal of Primatology**, v. 34, p. 11-7, 1994.

HERNÁNDEZ-ANDRADE, E., et al. Uterine artery score and perinatal outcome. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 19, p. 438-42. 2002;

HERNANDEZ-LÓPEZ, L., et al. Seasonal emission of seminal coagulum and in vivo sperm dynamics in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Reproduction**, v. 136, p. 411-21, 2008.

HIRSCH, A., et al. (in prep.). **Database of Georeferenced Occurrence Localities of Neotropical Primates**. Belo Horizonte: Department of Zoology/UFMG, 2008.

JANSON, C.H. Female choice and mating system of the brown capuchin monkey, *Cebus apella* (Primates: Cebidae). **Zeitschrift für Tierpsychologie**. v. 65, p. 177-200, 1984.

JAQUISH, C.E., et al. Patterns of prenatal survival in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Medical Primatology**, v. 25, p. 57-63, 1996.

KUEDERLING, I.; HEISTERMANN, M. Ultrasonography and hormonal monitoring of pregnancy in the saddle back tamarin, *Saguinus fuscicollis*. **Journal of Medical Primatology**, v. 26, p. 299-306, 1997.

LINN, G.S., et al. Social and menstrual cycle phase influence on the behavior of group – housed *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v. 35, p. 41-57, 1995.

LINNAEUS, C. **Systema naturae**. Tomus I. Regnum Animalium. 10. ed. Holm: reformed, 1758.

MARTINS, N.D. **Análises preliminares do ciclo reprodutivo de fêmeas de macaco-prego (*Cebus apella* LINNAEUS, 1758) criadas em cativeiro através do estudo colpocitológico diário utilizando dois métodos de coloração: Panóptico Rápido e Papanicolau**. 2004. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal do Pará, 2004.

MEEKINS, J.W., et al. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclampsia pregnancies. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 101, p. 669-74, 1994.

MIRANDA, S.A.; DOMINGUES, S.F.S. Conceptus ecobiometry and Triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dogs. **Theriogenology**, v. 74, p. 608-17, 2010.

MOBERG, G.P. Biological response to stress: Implications for animal welfare. In: MOBERG G.P.; MENCH J.A. **The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. Wallingford: CABI Publishing, 2000, p. 123-146.

MONTEIRO, F.O.B., et al. Uterine evaluation and gestation diagnosis in owl monkey (*Aotus azarai infulatus*) using the B mode ultrasound. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, n. 3, p. 123-30, 2006.

MU, J.; ADAMSON, S.L. Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero- and umbilicoplacental, and vitelline circulations in mouse throughout gestation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. 1421-8, 2006.

NAGLE, C.A., et al. The plasma pattern of ovarian steroids during the menstrual cycle in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 979-83, 1979.

NAGLE, C.A., et al. Temporal Relationship Between Follicular Development, Ovulation and Hormonal Profile in the Capuchin Monkey (*Cebus apella*). **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 629-35, 1980.

NAGLE, C.A.; DENARI, J.H. The Cebus Monkey (*Cebus apella*) In: HEARN, J.P. **Reproduction of new world primates**. Lancaster: MTP Press, p. 39-67, 1983.

NAPIER, J.R.; NAPIER, P.H. Structure and Function. In:\_\_\_\_\_ **The natural history of the primates**. Cambridge: The MIT Press, p. 30-59, 1986.

NORTH, R.A., et al. Uterine artery Doppler flow waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. **Obstetrics & Gynecology**, v. 83, p. 378-86, 1994.

NYBERG, D.A.; ABUHAMAD, A.; VILLE, Y. Ultrasound assessment of abnormal fetal growth. **Seminars in Perinatology**, v. 28, p. 3-22, 2004.

NYLAND, T.G., et al. Ultrasonic assessment of fetal growth in the nonhuman primate (*Macaca mulatta*). **Journal of Clinical Ultrasound**, v. 12, p. 387-95, 1984.

NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. Pregnancy diagnosis and fetal development; fetal measurements and estimation of fetal age. In:\_\_\_\_\_ **Veterinary diagnostic ultrasound**. Philadelphia: Saunders, p. 146-51, 1995.

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

OLIVEIRA, K.G., et al. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 75-80, 2011.

ORTIZ, M.E., et al. Sperm migration through the female genital tract of the New World monkey *Cebus apella*. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 5, p. 1121-28, 1995.

ORTIZ, R.E., et al. Cytologic, hormonal, and ultrasonographic correlates of the menstrual cycle of the new world monkey *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v. 66, 233-44, 2005.

PARADISO, J.L.; NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. Baltimore: John Hopkins Press, 4 ed., 1983.

POURCELOT, L. Applications clinique de l'examen Doppler transcutane. In: PERONNEAU P. (Org.). **Velocimetrie ultrasonore Doppler**. Paris: Semin Inserm, p. 213-40, 1974.

RAZDAN, P., et al. Impact of Postovulatory Food Deprivation on the Ova Transport, Hormonal Profiles and Metabolic Changes in Sows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 45-55, 2001.

RECABARREN, M.P., et al. Impact of lactation upon fertility in the New World primate capuchin monkey (*Cebus apella*). **Journal of Medical Primatology**, v. 29, p. 350-60, 2000.

ROBERTS, A.B., et al. Ultrasonographic measurement of liver length in the small-for-gestational-age fetus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 180, p. 634-38, 1999.

ROWE, N. **The pictorial guide to the living primates**. East Hampton: Pogonias Press, 1996, 263p.

SAKAI, M., et al. Doppler blood flow velocity waveforms of the umbilical artery during variable decelerations in labor. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 59, p. 207-11, 1997.

SEIER, J.V., et al. The detection and monitoring of early pregnancy in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*) with the use of ultrasound and correlation with reproductive steroid hormones. **Journal of Medical Primatology**, v. 29, p. 70-5, 2000.

SEYAM, Y.S.; AL-MAHMEID, M.S.; AL-TAMIMI, H.K. Umbilical artery Doppler flow velocimetry in intrauterine growth restriction and its relation to perinatal outcome. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 77, p. 131-7, 2002.

SHIPP, T.D.; BROMLEY, B.; BENACERRAF, B.R. Sonographically detected abnormalities of the umbilical cord. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 48, p. 179-85, 1995.

SILVA JÚNIOR, J.S. **Especiação nos macacos-prego e caiararas, Gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates Cebidae)**. 2001. 377f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

STRASSMANN, B.I. The evolution of endometrial cycles and menstruation. **Quarterly Review of Biology**, v. 71, p. 181-220, 1996.

SZATMÁRI, V.; SOTONYI, P.; VOROS, K. Normal Duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 42, p. 93-107, 2001.

TARDIF, S.D., et al. Estimation of gestational ages in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) from published prenatal growth curves. **Journal of Medical Primatology**, v. 27, p. 28-32, 1998.

THALER, I.; WEINER, Z.; ITSKOVITZ, J. Systolic or diastolic notch in uterine artery blood flow velocity waveforms in hypertensive pregnant patients: relationship to outcome. **Obstetrics & Gynecology**, v. 80, p. 277-82, 1992.

TAYLOR, K.J.W; QUEDENS-CASE, C.L. Doppler applications in gynecology. In: TAYLOR, K.J.W.; BURNS, P.N.; WELLS, P.N.T. (Org.). **Clinical applications of Doppler ultrasound**. 2. ed. New York: Raven Press, 1995, p. 221-49.

TEIXEIRA, D.G. **Estudo anatômico descritivo dos órgãos genitais masculinos do macaco-prego (*Cebus apella* Linnaeus, 1758)**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2005.

TERBORGH, J. **Five new world primates: a study in comparative ecology**. Princeton: Princeton University Press, 1983, 304p.

VAN CALSTEREN, K., et al. Sonographic biometrical normograms and estimation of fetal weight in the baboon (*Papio anubis*). **Journal of Medical Primatology**, v. 38, p. 321-27, 2009.

WELKER, C., et al. Social relations in groups of the blackcapped capuchin *Cebus apella* in captivity: Interactions of group-born infants during their first 6 months of life. **Folia Primatologica**, v. 49, p. 33-47, 1987.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference**. 3. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.

WRIGHT, E.M.; BUSH, D.E. The reproductive cycle of the capuchin (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 27, p. 651-54, 1977.