

Início da função gonadal no sagui comum (*Callithrix jacchus*): diferenças entre gêneros

Victor Kenji Medeiros Shiramizu¹, Dijenaide Chaves de Castro², Bernadette Serra Rego² e Maria Bernardete Cordeiro de Sousa³.

¹Bolsista Balcão/CNPq, ²Alunas do Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, ³Professora Orientadora do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Resumo

Os primatas não humanos, como *Callithrix jacchus* vêm sendo utilizados com maior frequência em pesquisa biomédica e, recentemente, nosso laboratório propôs uma nova classificação para monitorar com mais detalhes as modificações comportamentais e hormonais relacionadas ao desenvolvimento. O presente trabalho monitorou os níveis de hormônios gonadais de 4 machos e 6 fêmeas de *C. jacchus* durante as fases juvenil I e II e subadulta (dos 5 aos 15 meses). Os resultados apontaram que os níveis de progesterona nas fêmeas e andrógenas nos machos foram estatisticamente mais elevados nos estágios juvenil II e subadulto, respectivamente, em relação ao estágio juvenil I. Estes achados indicam que, de acordo com a nova classificação, foi possível observar que o funcionamento gonadal se instala mais cedo nas fêmeas.

Palavras-chaves: *Callithrix jacchus*, hormônios sexuais, puberdade, ontogênese.

Abstract

Non human primates, as common marmosets (*Callithrix jacchus*) have been used frequently in biomedical research and, recently, our laboratory has proposed a more detailed classification to follow the behavioral and physiological changes associated to their development. In this study we measured fecal sexual hormones in 4 males and 6 females during juvenile I and II and subadult stages (5-15 months). We found that progesterone in females and androgens in males showed significantly differences in relation to the previous stage of the development in the juvenile I and juvenile II respectively, indicating that, according the new classification, the gonadal functioning starts earlier in females.

Key words: *Callithrix jacchus*, sexual hormones, puberty, ontogeny.

Introdução

O conhecimento da biologia de animais que funcionam como modelos experimentais para o entendimento de fenômenos fisiológicos é de grande importância para a sua aplicabilidade na pesquisa científica. No caso dos primatas de pequeno porte se torna ainda mais significativa, porque os resultados podem ser extrapolados para outras espécies, particularmente para aquelas filogeneticamente próximas, como no caso dos seres humanos.

Um desses animais é *Callithrix jacchus*, conhecido popularmente como sagui comum que representa um modelo de primata não-humano para estudos fisiológicos (CHANDOLIA *et al.*, 2006; GALVÃO-COELHO *et al.*, 2008). O sagüi é altamente viável em estudos experimentais uma vez que possuem um baixo custo de manutenção, adaptam-se facilmente às condições de cativeiro, a cada gestação nascem gêmeos em até duas vezes ao ano (YAMAMOTO, 1990) associada à ausência de inibição reprodutiva durante a lactação e a ocorrência do estro pós-parto (HEARN, 1978). Além disso, possuem um rápido desenvolvimento, atingindo a maturidade sexual por volta de 18 meses de idade (ABBOTT *et al.*, 2003).

Diante de tantos benefícios e facilidades de manuseio, esses animais propiciaram novas possibilidades de pesquisas em áreas relacionadas à saúde humana (ABBOTT *et al.*, 2003). Para que uma espécie animal possa constituir um modelo experimental em biologia, os conhecimentos de características relacionadas ao seu desenvolvimento ontogenético são fundamentais.

Vários estudos apontam para direções diferentes no que diz respeito ao início e término dos estágios de desenvolvimento do sagüi comum (CASTRO, 2006). Segundo a autora, essas divergências devem-se ao fato de os primeiros estudos basearem-se em medidas comportamentais. Dentre esses estudos pode ser citado o Ingram (1977), no qual a autora sugere uma classificação de seis estágios, sendo: infantil I (1-8 semanas), infantil II (9-12 semanas), juvenil (4-5 meses), adolescente (5-10 meses), subadulto (10-15 meses) e adulto jovem (acima de 15 meses). Já o estudo de Yamamoto (1993), reagrupa os estágios em 4 classes: infantil (0-5 meses), juvenil (5-10 meses), subadulto (10-15 meses) e adulto (mais de 15 meses).

Recentemente, LEÃO *et al.*, 2009, propuseram uma nova classificação para os estágios de desenvolvimento do sagui comum, sendo encontradas oito classes. O ponto forte dessa nova classificação é que a mesma está baseada em indicadores mensuráveis como peso e idade, enquanto as demais se basearam na idade e perfil comportamental. Neste sentido, o presente estudo monitorou o perfil dos hormônios gonadais a partir da fase juvenil de *Callithrix jacchus*, no intuito de caracterizar a ocorrência do início da função gonadal em ambos os sexos e observar se há diferenças entre machos e fêmeas em relação às fases do desenvolvimento nas quais ocorrem.

Metodologia

Sujeitos

Foram utilizados 10 animais, sendo 6 fêmeas e 4 machos vivendo em grupos familiares de *Callithrix jacchus*, cuja composição variou entre 3 e 10 indivíduos, vivendo em cativeiro no Núcleo de Primatologia da UFRN, no período de março a novembro de 2006. Os animais estavam alojados em gaiolas localizadas na área externa do Núcleo o que proporcionou condições climáticas naturais, com luz ambiente de 05:00-17:00hs aproximadamente. A alimentação consistiu em uma mistura protéica (leite em pó, ovos, pão, proteína de soja, e farinha enriquecida com vitaminas) servida por volta das 8:00h e uma porção de frutas regionais servida por volta das 13:00h. A água foi servida “*ad libitum*”.

Dosagens hormonais

A) Coleta de fezes

As fezes foram coletadas uma vez por semana no turno da manhã, isso porque o padrão de defecação destes animais apresenta um pico neste turno, aumentando as chances de obter as amostras (SOUSA *et al.*, 2004). Foram utilizados tubos plásticos descartáveis com tampa para armazenar as fezes, fazendo a identificação do animal, da gaiola, da hora e dia da coleta. Em seguida as amostras foram colocadas em depósitos térmicos com gelo até serem estocadas no freezer.

O monitoramento do perfil do funcionamento gonadal dos animais durante o período foi feito através da dosagem de hormônios andrógenos em machos e estradiol e progesterona em fêmeas.

B) Extração dos hormônios das fezes

Após a coleta, as fezes foram congeladas e levadas ao Laboratório de Medidas Hormonais do Departamento de Fisiologia da UFRN. Posteriormente, nos dias programados para a extração dos hormônios das fezes, foi realizado o primeiro passo que inclui a pesagem, no qual foi pesado 0,1 g de fezes para se seguir no processo de hidrólise o qual tem como objetivo separar os esteróides na forma livre e sobre conjugação simples. Após este segundo passo, foram utilizados 500 µL de cada amostra para o processo de solvólise que constitui o terceiro passo. Este tem como objetivo separar os esteróides que estão sob dupla conjugação.

C) Ensaio Imuno-enzimático (ELISA)

As técnicas para dosagens fecais seguiram os procedimentos descritos por SOUSA e ZIEGLER, (1998), para a progesterona e estradiol das fêmeas, e CASTRO e SOUSA, (2005), para os andrógenos dos machos. A validação da técnica foi feita utilizando “pools”, após preparação das placas com adição do anticorpo, adição das alíquotas das amostras, adição da enzima conjugada e adição do substrato. Os coeficientes de variação (CV) foram: estradiol: intra-ensaio: 5.77% e inter-ensaio = 3.82%; progesterona: intra-ensaio = 4.23% e inter-ensaio = 11.50%; e andrógenos: intra-ensaio = 2.25% e inter-ensaio = 5.64%.

Análise estatística

A análise descritiva dos dados foi realizada por meio do cálculo das médias e do desvio padrão dos hormônios dos indivíduos em cada fase. Foi aplicada a ANOVA para medidas repetidas e o nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

Resultados

Foram coletadas no total 226 amostras de fezes sendo: 151 amostras das 6 fêmeas e 75 amostras dos 4 machos. A análise dos perfis das concentrações fecais dos hormônios sexuais de fêmeas (progesterona e estradiol) e machos (andrógenos) de *C. jacchus* mostrou que houve variação entre os sexos ao longo do desenvolvimento.

Os níveis de progesterona nas 6 fêmeas tenderam a elevar-se ao longo do monitoramento, sendo estes níveis médios mais baixos no estágio juvenil I ($131,66 \pm 48,46$ ng/g) e, a partir do estágio juvenil II, passaram a ser mais elevados ($229,75 \pm 114,35$ ng/g). O padrão dos níveis médios do estradiol foi bastante irregular, elevando-se no estágio juvenil I ($41,94 \pm 30,33$ ng/g), atingindo o valor mais alto no estágio juvenil II ($59,23 \pm 32,87$ ng/g) e atingindo o menor valor no período do monitoramento no estágio subadulto ($27,06 \pm 30,72$ ng/g).

A Figura 1 mostra os níveis de progesterona e estradiol nas 6 fêmeas agrupados dentro dos estágios juvenil I, juvenil II e subadulto.

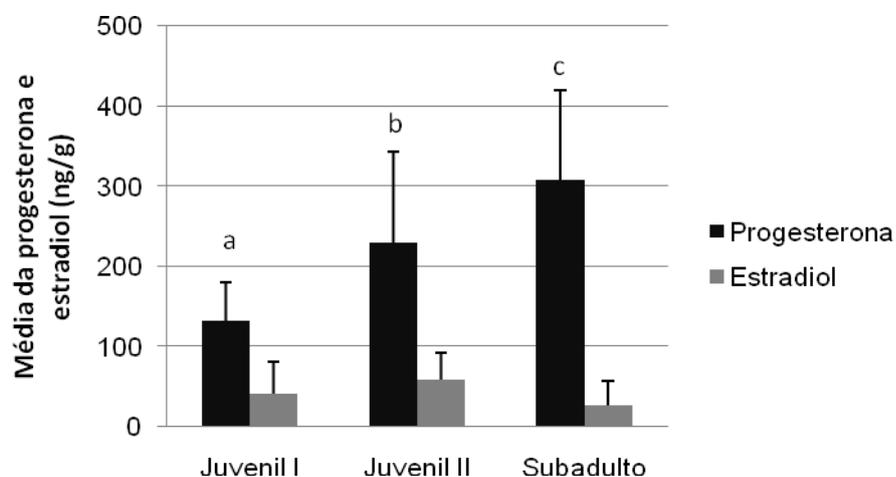


Figura 1: Níveis médios (+ DP) de progesterona e estradiol ao longo dos estágios do desenvolvimento de fêmeas de *C. jacchus*, durante o monitoramento. Para progesterona, letras diferentes, $p < 0,001$.

Os níveis médios de testosterona dos machos de *C. jacchus* elevaram-se ao longo dos três estágios monitorados. No estágio juvenil I e juvenil II os valores médios dos andrógenos foram similares com valores médios de $115,49 \pm 76,01$ ng/g e $127,59 \pm$

28,94 ng/g de fezes, respectivamente. No estágio subadulto os níveis médios atingiram o pico de $161,83 \pm 44,29$ ng/g de fezes. A Figura 2 mostra o padrão dos níveis médios dos hormônios masculinos ao longo dos estágios monitorados.

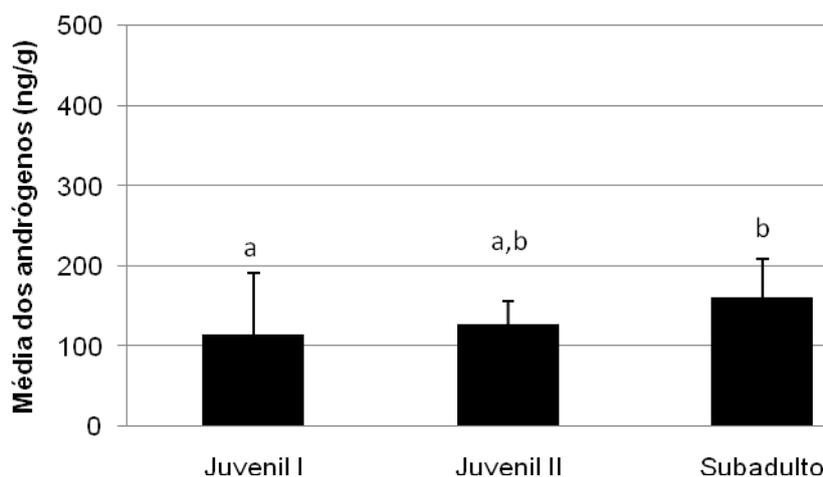


Figura 2: Níveis médios (+ DP) de andrógenos para os três estágios de desenvolvimento de machos de *C. jacchus*, durante o monitoramento. Para andrógenos, letras diferentes, $p < 0,026$.

Discussão

Os níveis de progesterona nas fêmeas começam a se elevar a partir do estágio juvenil II e de acordo com a classificação proposta por INGRAM (1977) este período corresponde à adolescência. É exatamente nesse período que ocorre o início do funcionamento gonadal com a ocorrência da puberdade. Também, no trabalho de ABBOTT *et al.* (2003) a puberdade é descrita na fase juvenil.

Segundo HEARN (1983), a secreção dos hormônios sexuais só atinge valores semelhantes àquela registrada para animais adultos cerca de dois a quatro meses depois, entre os sete e nove meses. Os mesmos resultados puderam ser replicados neste presente trabalho, pois os níveis médios de progesterona nas fêmeas de *Callithrix jacchus* no estágio juvenil II foram maiores do que no estágio juvenil I. Ainda, a elevação dos níveis de progesterona reflete que as fêmeas estão ovulando, pois os mesmos só se elevam quando esta ocorre.

Entretanto, a variação do estradiol foi mais irregular, devido a este hormônio elevar-se tanto na fase folicular (antes da ovulação) como na fase luteal (após a ovulação), apresentando maiores variações nos perfis de secreção entre as idades. Além disso, o desvio padrão foi calculado de acordo com os valores observados para o hormônio em cada fase e, pelo fato do presente trabalho ter monitorado apenas seis fêmeas faz com que a variabilidade da amostra se expresse de modo elevado.

Nos machos, os níveis andrógenos monitorados neste estudo elevaram-se mais a partir do estágio juvenil II para o estágio subadulto. Segundo ABBOTT *et al.* (1978), este estágio corresponde mais ou menos ao oitavo mês de vida do indivíduo. O estudo de DIXSON (1986) contrasta com esses dados. O autor verificou que a puberdade foi mais precoce, isso porque os níveis hormonais de testosterona começaram a se elevar aos 180 dias (6 meses).

Assim, pode-se concluir que o perfil de secreção hormonal da progesterona é mais regular e reflete um aumento gradual deste hormônio nos estágios juvenil II e subadulto em relação ao juvenil I. O perfil do estradiol é mais irregular, em função de sua flutuação ser nas duas fases do ciclo ovariano, o que dificulta a análise dos dados, pois o mesmo apresenta elevações transientes, de mais curta duração que a progesterona. O perfil de secreção dos andrógenos nos machos teve um padrão semelhante ao da progesterona nas fêmeas, elevando-se gradualmente e atingindo maiores valores no estágio subadulto quando comparado com o juvenil I.

Para fornecer maiores detalhes a partir de que estágio os níveis de andrógenos começam a se elevar antes do estágio juvenil I, é necessário o monitoramento a partir do estágio infantil, para verificar se o padrão encontrado por DIXSON (1986) pode ser replicado quando são mensurados os andrógenos fecais. Também, em futuras análises, pretende-se aumentar o número de fêmeas monitoradas no estudo como uma oportunidade de verificar diminuição do efeito da variação individual. Ainda, monitorar o perfil hormonal no estágio adulto é bastante interessante, no intuito de constatar se as diferenças com a fase subadulta são as mais elevadas ou se há uma elevação adicional na idade adulta.

Agradecimentos:

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica. Ao técnico do Laboratório de Medidas Hormonais Luiz Carlos Fernandes pelas análises hormonais. A Wallisen Tadashi Hattori pela ajuda na preparação dos gráficos e sugestões durante a elaboração deste trabalho.

Referências

ABBOTT, D.H. E HEARN, J.P. The physical, hormonal and behavioural development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.53, pp. 155-166, 1978.

ABBOTT, D. H. ; BARNETT, D. K. ; COLMAN, R. J. ; YAMAMOTO, M. E. ; SCHULTZ-DARKEN, N. Aspects of Common Marmoset Basic Biology and Life History Important for Biomedical Research. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, pp. 339-350, 2003.

CASTRO, D.C. E SOUSA, M.B.C. Fecal androgen levels in common marmoset (*Callithrix jacchus*) males living in captive family groups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, pp. 65-72, 2005.

CASTRO, D.C. Caracterização comportamental e endócrina das fases do desenvolvimento ontogenético de sagui, *Callithrix jacchus*. **Dissertação** (mestrado em Psicobiologia) - Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.

CHANDOLIA, R.K., LUETJENS, C.M., WISTSUBA, J., YEUNG, C., NIESCHLAG, E. E SIMONI, M.. Changes in endocrine profile and reproductive organs during puberty in the male common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.132, pp. 355-363, 2003.

DIXSON, A.F. Plasma testosterone concentration during postnatal development in the male common marmosets. **Folia Primatologica**, v.47, pp. 166-170, 1986.

GALVÃO-COELHO, N. L.; SILVA, H. P. A. ; LEÃO, A. C. E SOUSA, M. B. C. Common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a potential animal model for studying psychological disorders associated with high and low responsiveness of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Reviews in the Neurosciences**, v.19, pp. 187-201, 2008.

HEARN, J. P. The endocrinology of reproduction in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. IN. KLEIMAN, D.G. (ed.). **The Biology and conservation of the Callitrichidae**, Washington: Smithsonian Institution Press, pp. 163-171, 1978.

HEARN, J. P. The common marmoset (*Callithrix jacchus*). IN: Hearn, J. P. (ed.). **Reproduction in New World primates**. New models in medical sciences. England: MIT press limited, pp. 183-215, 1983.

INGRAM, J. C. Interactions between parents and infants, and the development of independence in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Animal behavior**, v.25: pp. 811-827, 1977

LEÃO, A. C.; DORIA NETO, A. D. E SOUSA, M. B. C. New developmental stages for common marmosets (*Callithrix jacchus*) using mass and age variables obtained by K-means algorithm and self-organizing maps (SOM). **Computers in Biology and Medicine**, pp. 853-859, 2009

SOUSA, M. B. C.; CASTRO, D. C.; RAMINELLI, J. L. F.; MEDEIROS, A. V.; NOBRE, G. H. L.; SILVA JUNIOR, P. P.; SOUSA, I.C. Estudo do padrão de defecação em sagüi comum, *Callithrix jacchus*, em cativeiro. In: Sérgio Mendes e Adriano Chiarello. (Org.). **A Primatologia no Brasil**. Vitória: UFES, v. 8, pp. 213-224, 2004.

SOUSA, M. B. C. E ZIEGLER, T. E. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. **American Journal of Primatology**, v.46, pp. 105-112, 1998.

YAMAMOTO, M.E. Ontogênese das relações sociais e dinâmica do cuidado com a prole no sagüi comum (*Callithrix jacchus*). **Tese** (doutorado em psicobiologia) –

Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1990.

YAMAMOTO, M. E. From Dependence To Sexual Maturity: The Behavioural Ontogeny Of Callitrichidae. In: A.B. Rylands. (Org.). **Marmosets and tamarins: systematics, ecology and behaviour**. Oxford: Oxford University Press, pp. 235-254, 1993.

Victor Kenji Medeiros Shiramizu

Endereço eletrônico: victorshiramizu@yahoo.com.br

Grupo de pesquisa: Laboratório de Endocrinologia Comportamental

Endereço Postal: Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, 59078-970, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Natal/RN, Brasil.