



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal



**Efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado ao uso de
algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre o ciclo menstrual de
fêmeas cativas de *Sapajus libidinosus* (macaco-prego)**

Rosângela Correa Rodrigues

Brasília- DF

2016

Rosângela Correa Rodrigues

Efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado ao uso de algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre o ciclo menstrual de fêmeas cativas de *Sapajus libidinosus* (macaco-prego)

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Profa. Maria Clotilde Henriques Tavares

Coorientador: Claudia Mattern

*Ao meu esposo Charles, fonte de amor, incentivo e suporte. Ao meu filho Isaac,
minha motivação e razão para seguir em frente, sempre!*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus; pois, sem Ele, nada seria possível. Com Ele, nada é impossível.

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Maria Clotilde Heriques Tavares pela dedicação, apoio incondicional e, principalmente pela compreensão nos momentos mais difíceis. Agradeço muito pelos ensinamentos tão valiosos ao longo dos anos de Mestrado e Doutorado. Meu sincero e eterno muito obrigada pelas orientações tão valiosas, pela confiança e pela amizade!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz pelo incentivo, apoio e por sua exemplar conduta nas atividades acadêmicas.

Ao Prof. Dr. Tales Aversi-Ferreira pela amizade, paciência, por suas orientações e pelo grande incentivo desde a Graduação até o Doutorado. Agradeço imensamente pelos diálogos, orações e conselhos tão sábios. Muito obrigada, meu amigo!

Ao Prof. Dr. Rafael Souto Maior pelo incentivo e apoio, que foram tão valiosos ao longo destes anos.

Aos demais Professores do Programa Pós-Graduação em Biologia Animal pelos ensinamentos durante as disciplinas e os encontros.

Ao Centro de Primatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília pela autorização da execução do projeto, em especial aos Tratadores (Geinaldo Vieira da Silva e Almir Silva) e Médicos Veterinários (Dra. Cecilia Azevedo Dias e Dr. Raimundo Oliveira da Silva), por cuidarem tão bem dos nossos sujeitos experimentais. Sem vocês não seria possível a execução dos nossos objetivos científicos.

Aos macacos-pregos (Bolinha, Chiva, Chiquinha, Tabata, Drica, Ronaldinha, Minha Flor, Minha Rosa, Tati, Talita, Maneca, Roberta, Aurora e Délia) e também

seus respectivos companheiros (Macaxeira, Belo, Reginaldo, Neymar, Romeu, Noé e Salomão) pela contribuição ímpar para desenvolvimento da ciência.

Às minhas estagiárias (Dianne Novais, Fernanda Mara Aragão, Liziane Blom e Adriana Ongreiro) agradeço pela tão valiosa contribuição nestes longos meses de coletas no CP-UnB.

Ao Laboratório *Sabin*[®] pela dosagem das amostras sanguíneas.

Ao Laboratório *Mattern Pharmaceuticals AG* (Stans, Switzerland) pelo fornecimento das drogas, e também pelo financiamento parcial do projeto.

Aos funcionários (zeladores, seguranças e secretários) do Instituto de Biologia- IB agradeço por zelarem tão bem deste espaço.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento (Renata, Patrícia, Ana Garcia, Profa. Corina Satler, Soraya, Roqueline, Tainá, Juliana, Walesca, Isa, Danilo, Aline, Fernanda, Adel, Lia, Edward e Fabian) pelos longos diálogos e muitas ideias compartilhadas, pelo auxílio e compreensão durante a execução deste estudo. Vocês tornaram os meus dias bem mais leves e felizes!

À minha amiga Nárjara Veras Grossmann que contribuiu de forma muito significativa na execução e divulgação dos resultados deste estudo. Muito obrigada mesmo!

Ao meu esposo Charles sempre companheiro, amigo e incentivador.
Essa vitória também é sua!

Ao meu filho Isaac, que veio durante o Doutorado — infelizmente através de uma gestação muito conturbada — mas a sua existência traz-me felicidade, muita paz e um amor incondicional. Sua presença é um incentivo incondicional para que eu seja cada dia melhor. Muito obrigada por existir. Mamãe te ama incondicionalmente!!!

Aos meus pais (Ilton e Marlúcia) pelo exemplo de humildade e honestidade. Sem vocês nada disso teria sido possível. Sou eternamente agradecida a Deus por ter me confiado a uma família tão maravilhosa e valiosa.

Aos meus irmãos (Raquel, Wilton, Willian, Wanderson, Mosar e Ana Vitória) pela união, incentivo e força mesmo a distância. Sempre estamos unidos pelo nosso amor fraternal.

Em especial, aproveito para agradecer ao meu tão amado irmão Mosar, que é meu amigo confidente. Você é muito amado e importante para mim!

Aos meus Cunhados (Francisco, Fernanda, Mirian e Paula) por serem tão gentis e compreensivos conosco.

Às minhas princesas lindas (Isadora e Sofia) meus raios de luz, que sempre me trazem paz, amor e muita felicidade. A dindinha ama vocês demais!

À Dona Neide (babá do Isaac), uma grande mulher simples e virtuosa. Sem o seu apoio não teria sido possível ausentar-me de casa com tanta tranquilidade e confiança. Sei do amor e zelo que a senhora tem pelo nosso maior tesouro. Amamos você, nossa vovó Neide.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para realização deste árduo trabalho!

“Acredito nas coisas possíveis, mas tenho imensa fé nas impossíveis, pois quando elas ocorrem, temos certeza de que a luta valeu a pena”

Regildo Silva

Resumo

Muitas mulheres têm feito uso concomitante de testosterona associado a contraceptivos hormonais e, todavia, não são bem estabelecidos os potenciais efeitos que esses dois tratamentos causam aos parâmetros fisiológicos e comportamentais. Sendo assim, a proposta do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais de 12 fêmeas de macaco-prego do CP-UnB. Para fins experimentais, a cada 21 dias, as fêmeas receberam um volume de 0,10 ml de contraceptivo hormonal combinado. Já a testosterona foi administrada por via intranasal em dose de 0,24 mg/kg, isto durante 3 ciclos menstruais consecutivos. As análises fisiológicas e comportamentais foram feitas ao longo de todo experimento, que teve duração de 210 dias consecutivos delineados em 6 fases sequenciais: 1^a - linha de base (21 dias); 2^a - administração do contraceptivo hormonal (21 dias); 3^a - tratamento de contraceptivo hormonal e testosterona (63 dias); 4^a - primeiro intervalo (washout) (21 dias) da testosterona; 5^a - administração do contraceptivo hormonal e placebo (63 dias); e 6^a - segundo intervalo (washout) (21 dias) da testosterona. Foram feitas 21 coletas de sangue por fêmea ao longo de todo o experimento, as quais permitiram a análise dos parâmetros fisiológicos (estradiol, estrona, testosterona, dihidrotestosterona, cortisol, gonadotrofinas, tempo de tromboplastina, tempo de protrombina, plaquetas, fibrinogênio, hemoglobina, globulina e lipídios). Já os parâmetros comportamentais foram obtidos pelo monitoramento da frequência e duração dos comportamentos não sexuais e sexuais apresentados pelas fêmeas de macacos-prego. Os resultados demonstram que o tratamento contraceptivo hormonal combinado promoveu alterações hormonais nas fêmeas de macacos-prego ($F_{1,61}=5.09$; $p<0.001$), como, por exemplo, redução nas concentrações de estrona, possivelmente decorrente do efeito do contraceptivo na supressão dos hormônios hipofisários. Também foi possível verificar redução dos tempos de protrombina ($F_{1,61}=91.77$; $p<0.001$) e tromboplastina ($F_{1,61}=42.94$; $p<0.001$), bem como aumento no número de plaquetas quando as fêmeas de macaco-prego receberam o tratamento com contraceptivo ($F_{1,61}=450.92$; $p<0.05$). Os esteroides sintéticos podem se ligar aos receptores endoteliais e promover mudanças nos fatores de coagulação. Já os tratamentos associados de testosterona ao

contraceptivo hormonal promoveram elevação na concentração de estrona, testosterona, di-hidrotestosterona e Cortisol, além do aumento na frequência dos comportamentos sexuais das fêmeas de macaco-prego ($p < 0,05$). Embora nosso estudo tenha usado dose de testosterona inferior às mencionadas na literatura, e esta tenha sido administrada por via intranasal nossos resultados também demonstraram que o uso exógeno de testosterona promove mudanças nos parâmetros hormonais. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo podem ser relevantes para futuras pesquisas que tenham como proposta avaliar a ação do tratamento de testosterona em usuárias de CHC. Pelo menos em fêmeas de macacos-prego, independentemente da idade, foram observadas alterações sobre alguns parâmetros fisiológicos e no aspecto comportamental.

Palavras-Chave: Contraceptivo Hormonal. Fisiologia Hormonal. Coagulação Sanguínea. Aspectos comportamentais.

Abstract

Many women have made concomitant use of testosterone associated with hormonal contraceptives, and yet the potential effects that these two treatments cause to the physiological and behavioral parameters are not well established. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effects of prolonged treatment of testosterone associated with algestone acetophenide and estradiol enanthate on the physiological and behavioral parameters of 12 capuchin females CP-UNB. For experimental purposes, every 21 days, females received a volume of 0.10 ml of combined hormonal contraceptive. Testosterone has been administered intranasally in doses of 0.24 mg/kg over 3 consecutive menstrual cycles. The physiological and behavioral analyzes were performed throughout the experiment, which lasted for 210 consecutive days outlined in 6 sequential phases: 1st - baseline (21 days); 2nd - hormonal contraceptive administration (21 days); 3rd - treatment of hormonal contraceptive and testosterone (63 days); 4th - first interval (washout) (21 days) of testosterone; 5th - administration of hormonal contraceptive and placebo (63 days); and 6th - second gap (washout) (21 days) of testosterone. Twenty-one (21) blood samples were taken per female capuchin throughout the experiment, which enabled the analysis of physiological parameters (estradiol, estrone, testosterone, dihydrotestosterone, cortisol, gonadotropins, thromboplastin time, prothrombin time, platelets, fibrinogen, hemoglobin, globulin and lipids). Other behavioral parameters were obtained by monitoring the frequency and duration of non-sexual and sexual behaviors shown by monkeys. The results demonstrate that the combined hormonal contraceptive treatment promoted hormonal changes in female capuchin monkeys ($F_{1,61} = 05.09$, $p < 0.001$), such as, for example, reduction of estrone concentrations, probably due to the contraceptive effect of the suppression of pituitary hormones. It was also observed reduction of prothrombin time ($F_{1,61} = 91.77$, $p < 0.001$) and thromboplastin time ($F_{1,61} = 42.94$, $p < 0.001$) and increase in the number of platelets when the monkeys received treatment with contraceptive ($F_{1,61} = 450.92$, $p < 0.05$). The synthetic steroids can bind to endothelial receptors and promote changes in coagulation factors. The testosterone-associated hormonal contraceptive treatment promoted an elevation in the concentration of oestrone, testosterone, dihydrotestosterone, and Cortisol, and increased frequency of sexual behavior of female capuchin monkeys ($p < 0.05$). Although our study has used a lower dose of

testosterone to those mentioned in the literature, and it has been administered intranasally, our results also demonstrate that the use of exogenous testosterone promotes changes in the hormonal parameters. Thus, the results obtained in this study may be relevant to future research within proposal to evaluate the effect of testosterone treatment in CHC users. At least in female capuchin monkeys, regardless of age, changes were observed on some physiological parameters and behavioral aspects.

Keywords: Hormonal Contraceptive. Hormonal Physiology. Blood Coagulation. Behavioral Aspects.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Representação morfológica da comunicação entre as regiões do hipotálamo e da hipófise no controle da síntese dos hormônios sexuais (Imagem retirada do site: (http://www.netxplica.com/figuras_netxplica/exanac/porto.editora/complexo.hipotalamo.hipofise.1.png). Acesso em: 11 de Março de 2016.21
- Figura 2-** Esquema da esteroidogênese no folículo ovariano (Imagem retirada Lima-Verde *et al.*, 2011).....23
- Figura 3-** Caracterização do ciclo menstrual com as mudanças ovarianas, dos hormônios ovarianos e o ciclo uterino em um ciclo menstrual de 28 dias (Figura retirada do *website*: <http://universodoshormonios.com/tag/ciclo-menstrual/Imagem>). Acesso em: 22 de fevereiro de 2016.....24
- Figura 4-** Esquema do mecanismo de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal nos ovários (Imagem retirada Reichin, 1992).....25
- Figura 5-** Esquema geral da coagulação sanguínea, a partir das vias intrínseca (plasmática) e extrínseca (tecidual) (Imagem retirada Filho, 2008).31
- Figura 6-** Esquema geral dos três mecanismos naturais antitrombóticos do sistema hemolítico.....32
- Figura 7-** Vista parcial de um dos pavilhões do CP-UnB, onde foram mantidos os animais do estudo (Foto: Maria Clotilde H.Tavares)52
- Figura 8-** Maneca - fêmea adulta de *Sapajus libidinosus* do CP-UnB que participou do estudo.52
- Figura 9-** Procedimento experimental.....58
- Figura 10-** Delineamento experimental do tratamento prolongado de CHC no grupo 02 de macacos-prego (n=6).61
- Figura 11-** Média (+EPM) A) estrona (pg/ml); B) testosterona (ng/dl) e C) cortisol (ug/dl) nas fases de Linha de Base (BL) e fase 1, 2, 3, 4 e 5 (administrações CHC) em fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6). As letras a, b: indicam que $p < 0,05$ entre a fase BL vs as administrações de CHC $p < 0,05$63
- Figura 12-** Média (+EPM) A) número de plaquetas (5 mil/nm³) e B) tempos (segundos) de protrombina e tromboplastina nas fases de Linha de Base (BL) e administrações de CHC (1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a) em fêmeas de macacos-prego

(<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=6). As letras a, b: indicam que p<0,05 entre a fase vs as administrações de CHC.	64
Figura 13- Média (\pm EPM) da frequência dos comportamentos sexuais nas fases Linha de Base (BL) e administrações de CHC (1 ^a , 2 ^a , 3 ^a ,4 ^a e 5 ^a) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=6).....	65
Figura 14- Média (\pm EPM) A) estradiol (E2) (mg/dl) e B) estrona (E1) (pg/ml) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).	74
Figura 15- Média (\pm EPM) A) testosterona (pg/ml) e B) DHT (pg/ml) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).....	75
Figura 16- Média (\pm EPM) cortisol (ug/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).	76
Figura 17- Média (\pm EPM) gonadotrofinas (mUI/ml) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).	77
Figura 18- Média (\pm EPM) A) tempos de tromboplastina (s) e B) tempo de protrombina (s) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).....	78
Figura 19- Média (\pm EPM) A) plaquetas (5 mil/nm ³) e B) fibrinogênio (mg/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).....	79
Figura 20- Média (\pm EPM) A) SHBG (Nmol/l) e B) hemoglobina (mg/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4	

(Intervalo do grupo1); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).....	79
Figura 21- Média (\pm EPM) lipídios (mg/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo1 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).....	80
Figura 22- Média (\pm EPM) em horas dos comportamentos não-sexuais A) Catação; B) Estereotípias e C) Agonístico nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do Grupo1); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).	81
Figura 23- Média (\pm EPM) da frequência dos comportamentos nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo1 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>) (n=12).	82
Figura 24- Médias (\pm EPM) A) estradiol (E2) mg/dl e B) estrona (E1) (pg/ml) analisadas nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>).	101
Figura 25- Média (\pm EPM) A) testosterona ng/dl e B) DHT(pg/ml) analisadas nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>).	102
Figura 26- Média (\pm EPM) cortisol (ug/dl) analisada nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (<i>Sapajus libidinosus</i>).	103
Figura 27- Média (\pm EPM) A) Tempo de tromboplastina (s) e B) Tempo de protrombina (s) analisada nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do	

tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*). 104

Figura 28- Média (\pm EPM) A) plaquetas (5 mil/nm³) e B) fibrinogênio (mg/dl) nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*). 105

Figura 29- Média (\pm EPM) A) lipídios (mg/dl) e B) hemoglobina (mg/dl) nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*). 106

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Idade real e estimada (anos) e condições experimentais 1=sujeito experimental e 0=sujeito controle das fêmeas do Centro e Primatologia- UnB. * indica que a idade é estimada.....53
- Tabela 2-** Descrições das categorias dos comportamentos não sexuais observados nas fêmeas de macacos-prego do Centro de Primatologia-UnB.57
- Tabela 3-** Descrições das categorias dos comportamentos sexuais observados nas fêmeas de macacos-prego do Centro de Primatologia-UnB.57
- Tabela 4-** Média (\pm EPM) e nível de significância das variáveis fisiológicas E2 (E2); DHT (di-hidrotosterona); Fibrin. (fibrinogênio); HG (hemoglobina), Glo. (globulina) e Gona. (gonadotrofina) analisadas na fase de Linha de Base (BL) e administrações de CHC (1^a, 2^a, 3^a,4^a e 5^a) em fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).....64
- Tabela 5-** Média (\pm EPM) da duração em horas dos comportamentos não sexuais (catação, estereotipia e agnóstico) nas fases Linha de Base (LB) e nas administrações CHC (1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a) (n=6) registrados nas fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).65
- Tabela 6-** Correlações de Pearson (r) e nível de significância (p) dos dados N-Sexual (comportamento não-sexual), Sexual (comportamento sexual), E2 (estradiol), E1 (estrona), T (testosterona), DHT (di-hidrotosterona) e cortisol entre os valores representantes das fêmeas do grupo 01 (G1) e grupo 02 (G2) de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).....83
- Tabela 7-** Correlações de Pearson (r) e nível de significância (p) dos dados N-Sexual (comportamento não-sexual), Sexual (comportamento sexual), E2 (estradiol), E1 (estrona), T (testosterona), DHT (di-hidrotosterona) e cortisol nas fêmeas do grupo 01 de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).84
- Tabela 8-** Correlações de Pearson (r) e nível de significância (p) dos dados N-Sexual (comportamento não-sexual), Sexual (comportamento sexual), E2 (estradiol), E1 (estrona), T (testosterona), DHT (di-hidrotosterona) e cortisol nas fêmeas do grupo 02 de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).85
- Tabela 9-** Média (\pm EPM) comportamento sexual (frequência) e dos comportamentos estereotipias, agnóstico e catação (duração em horas) nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com

T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*)..... 107

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CHs	Contraceptivos Hormonais
CHC	Contraceptivo Hormonal Combinado
COCs	Contraceptivo Hormonal Combinado
CP-UnB	Centro de Primatologia da Universidade de Brasília
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DHEA	Deidroepiandrosterona
DHT	Di-hidrotestosterona
DF	Distrito Federal
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
E2	Estradiol
E3	Estriol
E1	Estrona
±EPM	Erro Padrão da Média
FAL	Fazenda Água Limpa
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador das Gonadotrofinas
HG	Hemoglobina
HDL	Lipoproteína de Longa Densidade
LB	Linha de Base
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LH	Hormônio Luteinizante
MANOVA	Análise de Variância Multivariada
Placebo+CHC	Placebo Associado ao Contraceptivo Hormonal
SHBG	Proteína Ligadora de Esteroide Sexual
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
TT	Tratamento com Testosterona
TP	Tempo de Protrombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina ativada

T+CHC	Testosterona Associada ao Contraceptivo Hormonal
USP	Universidade de São Paulo
Vs	Versos
WO	Wash out (intervalo do tratamento com testosterona)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. O Ciclo menstrual	21
1.2. Contraceptivos hormonais (CHs)	26
1.2.1 Riscos fisiológicos associados ao uso de contraceptivo hormonal	30
1.2.1.1. Coagulação sanguínea.....	30
1.2.1.2. Alterações no peso corporal.....	35
1.2.1.3. Alterações no comportamento sexual	37
1.3. Testosterona	39
1.4. Espécie estudada: <i>Sapajus libidinosus</i>	45
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	47
3. HIPÓTESES.....	48
4. OBJETIVOS	50
4.1. Objetivo geral	50
4.2. Objetivos específicos	50
5 MATERIAS E MÉTODOS.....	51
5.1. Aspectos éticos	51
5.2. Local de estudo	51
5.3. Sujeitos.....	52
5.4. Procedimento	53
5.4.1. Coletas sanguíneas.....	53
5.4.2. Administração das drogas testosterona e placebo	55
5.4.3. Administração algestona acetofenida e enantato estradiol	55
5.4.4. Observações comportamentais.....	56
5.4.5. Delineamento experimental.....	58
5.5. Análises de dados	59
5.5.1. Análises de dados do efeito do CHC nas fêmeas de macaco-prego	59

5.5.2. Análises de dados do tratamento de testosterona associado ao CHC.....	61
5.5.3. Análises de dados do tratamento testosterona associado ao CHC nas fêmeas jovens e adultas	62
6. Efeitos do tratamento de chc sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego	63
6.1. Resultados dos efeitos do CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego.....	63
6.1.1. Parâmetros fisiológicos	63
6.1.2. Efeitos do CHC sobre os comportamentos não-sexuais nas fêmeas de macaco-prego	65
7. Efeitos do tratamento prolongado de testosterona associada ao chc sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego.....	74
7.1. Resultados dos efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos das fêmeas de macaco-prego.....	74
7.1.1. Estradiol e Estrona	74
7.1.2. Testosterona e DHT	75
7.1.3. Cortisol	76
7.1.4. Gonadotrofinas	77
7.1.5. Protrombina e Tromboplastina	77
7.1.6. Plaquetas e Fibrinogênio.....	78
7.1.7. SHBG e Hemoglobina (HG)	79
7.1.8. Lipídios.....	80
7.2. Resultados efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os aspectos comportamentais das fêmeas de macaco-prego.....	81
7.2.1. Comportamento não-sexual	81
7.2.2. Comportamento sexual	82
7.3. Resultados das correlações entre parâmetros hormonais e aspectos comportamentais de fêmeas de macacos-prego.....	83
7.4. Discussão.....	85

Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos em fêmeas de macaco-prego	85
8. Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao chc sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego	101
8.1. Resultados dos efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego	101
8.1.1. Estradiol e Estrona	101
8.1.2. Testosterona e DHT	102
8.1.3. Cortisol	102
8.1.4. Protrombina e Tromboplastina	103
8.1.5. Plaquetas e Fibrinogênio	104
8.1.6. Lipídios e Hemoglobina	105
8.2. Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao contraceptivo hormonal sobre os aspectos comportamentais das jovens e adultas de macaco-prego	106
8.3. Discussão	107
Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das jovens e adultas de macacomacaco-prego-prego	107
9. CONCLUSÕES	113
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Ciclo menstrual

Em fêmeas de mamíferos, os anos reprodutivos normais caracterizam-se por alterações rítmicas mensais da secreção dos hormônios femininos (Matzuk, 2002). Primeiramente, para que se estabeleça o desenvolvimento puberal e os ciclos menstruais normais é necessário o amadurecimento do Sistema Nervoso Central (SNC), mais precisamente na região do hipotálamo, situada no assoalho do terceiro ventrículo, que integra as mensagens do SNC, transmitindo-as ao sistema endócrino através da hipófise, situada imediatamente abaixo dele (Figura 1). O núcleo arqueado do hipotálamo, localizado na sua região ventromedial, contém neurônios neurosecretores, cujos axônios terminam na eminência mediana, uma região centro-hipotalâmica. As terminações desses axônios secretam o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) de forma pulsátil, exclusivamente para dentro da circulação porta-hipofisária (Reichin 1992).

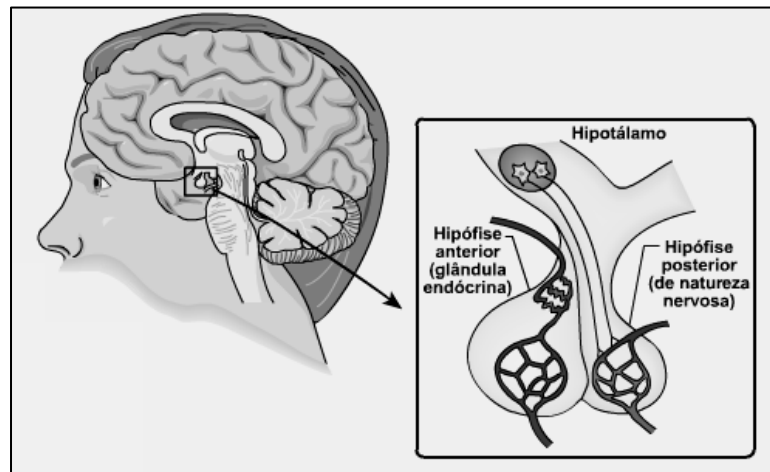


Figura 1- Representação morfológica da comunicação entre as regiões do hipotálamo e da hipófise no controle da síntese dos hormônios sexuais (Imagem retirada do site: http://www.netxplica.com/figuras_netxplica/exanac/porto.editora/complexo.hipotalamo.hipofise.1.png) . Acesso em: 11 de Março de 2016.

O GnRH age sobre o lobo anterior da hipófise (adenohipófise), onde estimula as células produtoras de gonadotrofinas (gonadotrofos), promovendo a síntese e a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH). A função biológica das gonadotrofinas é agir sobre as gônadas masculina (testículos) e feminina (ovários) promovendo a secreção dos esteroides sexuais masculinos: testosterona-T; Dehidroepiandrosterona-DHEA; Di-hidrotestosterona-DHT e

Androstenediona e femininos: os progestágenos (progesterona, pregnenolona e 17-hidroxiprogesterona) e os estrógenos (Estrona-E1; Estradiol-E2 e Estriol- E3) (Reichin, 1992).

Nas gônadas femininas, as gonadotrofinas agem de forma intermitente sobre os folículos primários, localizados na região cortical dos ovários. As gônadas femininas exercem duas funções muito significativas: secretam hormônios e produzem gametas. Estes são órgãos relevantes pela autoregulação e pela regulação retroativa sobre o eixo hipotálamo-hipófise (Baerwald *et al.*, 2012). Morfologicamente, os ovários apresentam vários compartimentos e duas células distintas, denominadas de células ovarianas, ou seja, células de teca e da granulosa. Estas células ovarianas possuem receptores para os hormônios hipofisários FSH e LH. Estes são responsáveis por desencadear o estímulo da produção dos esteroides sexuais ou esteroidogênese pelos folículos ovarianos (Orisaka *et al.*, 2009).

A esteroidogênese inicia-se sob a ação do LH nas células de teca, o colesterol circulante é captado e convertido em pregnenolona, e esta em progesterona, por meio da enzima 3 β -hidroxidesidrogenase (Mizrachi e Auchus, 2009). De acordo com Giometti *et al.* (2009) a proteína reguladora aguda da esteroidogênese faz o transporte do colesterol para dentro da mitocôndria, onde se encontra a enzima desmolase, pertencente ao complexo enzimático P450, que participa da conversão do colesterol em pregnenolona. Após ser produzida, a progesterona poderá exercer suas funções biológicas no organismo ou servir como substrato para a produção de androstenediona, mediante a atuação da enzima 17, 20-liase. Assim como a progesterona, quando produzida, a androstenediona poderá atuar nas suas funções orgânicas ou ser convertida em outro andrógeno, a testosterona, sob a ação da 17 β - redutase. Este hormônio, por sua vez, tem três caminhos a seguir: atuar no organismo, converter-se em DHT pela enzima 5 α -redutase ou penetrar nas células da granulosa e ser convertido em estradiol pela enzima aromatase, que tem sua atividade estimulada pela atuação do FSH nas células da granulosa (Drummond, 2006; Stocco, 2008). O estradiol também pode ser produzido por uma segunda via, ou seja, pela a androstenediona que é convertida em estrona pela aromatase nas células da granulosa e, e esta em estradiol, pela enzima 17 β -redutase (Yarak *et al.*, 2005; Lima-Verde *et al.*, 2011), conforme descrito na Figura 02.

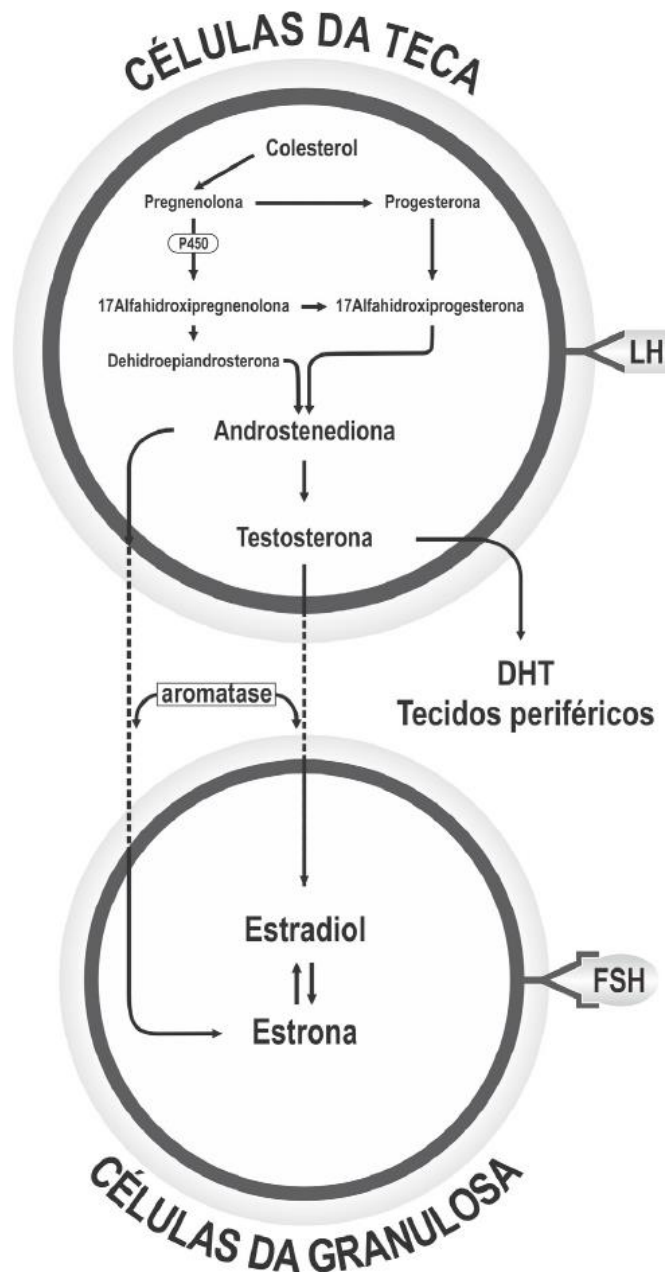


Figura 2- Esquema da esteroidogênese no folículo ovariano (Imagem retirada Lima-Verde *et al.*, 2011).

Os hormônios sexuais femininos (E2 e progesterona) sofrem flutuações ao longo do ciclo menstrual e, didaticamente, estas flutuações são usadas para determinação da divisão do ciclo menstrual com duração média de 28 dias. Desta forma, a primeira fase, que é denominada de fase proliferativa ou folicular, inicia-se no primeiro dia da menstruação e tem duração de aproximadamente 14 dias (Lima-Verde *et al.*, 2011). A segunda fase, denominada fase lútea, inicia-se logo após a ovulação, e se prolonga até o dia anterior ao primeiro dia da menstruação, quando inicia-se novamente a fase proliferativa. A fase proliferativa é caracterizada pelo

desenvolvimento gradual dos folículos ovarianos e secreção de estrógenos, sob o comando de FSH (Wu *et al.*, 1991). Durante os primeiros seis dias do ciclo menstrual, os níveis dos esteroides femininos são baixos e relativamente constantes (Wang *et al.*, 2001). Porém, do 7º ao 14º dia, os níveis dos estrógenos, em especial do estradiol elevam-se rapidamente atingindo o pico máximo cerca de 24 horas antes do pico de LH, nesse momento denomina-se a pré-ovulação. Em suma, no final da fase proliferativa ocorre a ovulação, que consiste no rompimento do folículo ovariano, com a liberação do ovócito II (Lima-Verde *et al.*, 2011). Após a ovulação ocorre formação do corpo lúteo e aumenta a secreção de progesterona, conforme a Figura 03.

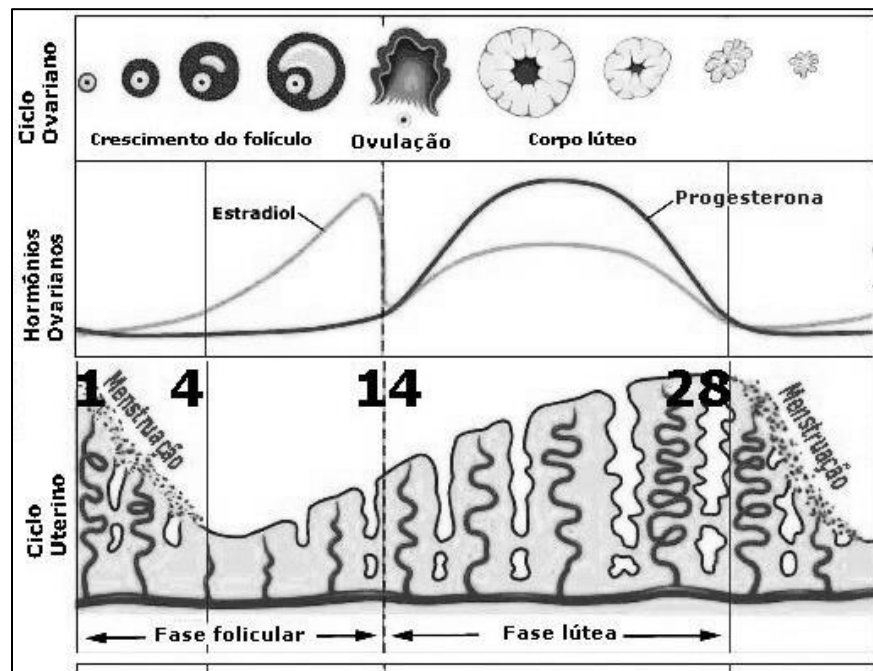


Figura 3- Caracterização do ciclo menstrual com as mudanças ovarianas, dos hormônios ovarianos e o ciclo uterino em um ciclo menstrual de 28 dias (Figura retirada do [website: http://universodoshormonios.com/tag/ciclo-menstrual/Imagem](http://universodoshormonios.com/tag/ciclo-menstrual/Imagem)). Acesso em: 22 de fevereiro de 2016.

A regulação das fases do ciclo menstrual, que é determinada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, depende dos níveis séricos dos próprios hormônios que o compõem. Os esteroides sexuais e a inibina atuam sobre o hipotálamo e a hipófise, promovendo a redução da secreção de GnRH e LH/FSH (Wu *et al.*, 1991). Da mesma forma, as gonadotrofinas atuam sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção de GnRH. Tal atividade inibitória é inversamente proporcional aos níveis circulantes desses hormônios, que é denominada *feedback* negativo (Filicori *et al.*, 1999) (Figura 4).

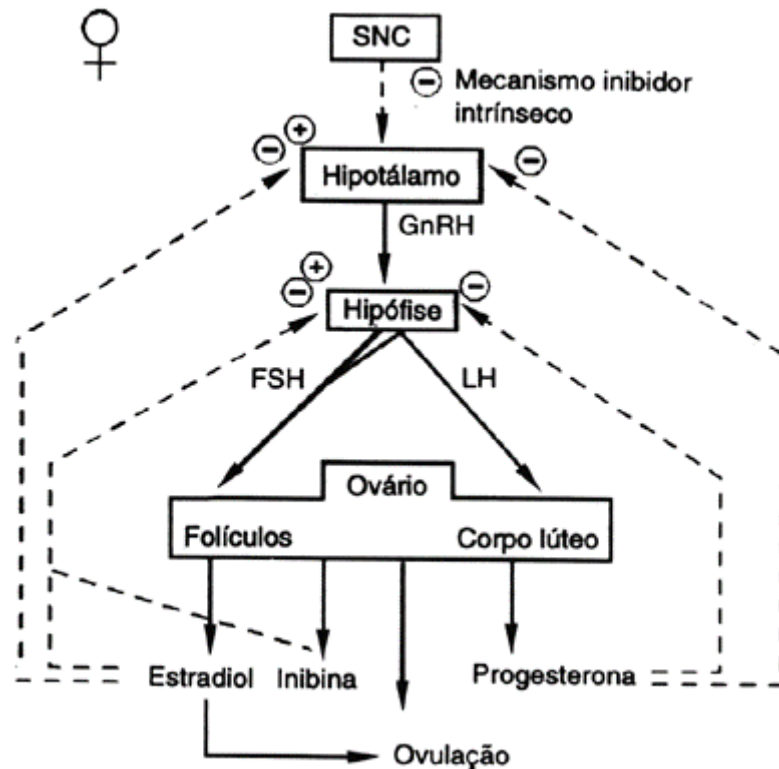


Figura 4- Esquema do mecanismo de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal nos ovários (Imagem retirada Reichin, 1992).

Outro mecanismo de controle do advém do SNC, onde neurônios catecolinérgicos e serotoninérgicos, exercem controle intrínseco sobre os neurônios produtores de GnRH, alterando a amplitude e a frequência dos pulsos de GnRH através dos seus efeitos sobre as norepinefrinas, serotonininas e dopaminas hipotalâmicas e do hormônio liberador das corticotrofinas e peptídeos opiáceos (Drummond, 2006; Valdez *et al.*, 2005).

Na metade do ciclo menstrual, no momento em que os ovários atingem uma concentração elevada na produção de estrógeno e conseguem mantê-lo por um tempo maior, a ação inibitória do estrógeno sobre o hipotálamo torna-se estimulatória (*feedback* positivo), provocando uma maior liberação de GnRH que, por sua vez, aumentará a liberação de LH e FSH, elevando ainda mais os níveis séricos de estradiol (Wu *et al.*, 1991). Essa elevação aguda do estradiol plasmático provocará a ruptura do folículo ovariano, momento em que ocorre a ovulação. Após a ovulação, os níveis de estrógenos caem abruptamente, e sua ação sob o hipotálamo volta a ser inibitória (*feedback* negativo). Essa inversão do *feedback* ocorre ciclicamente, permitindo a ovulação periódica na mulher adulta (Wu *et al.*, 1991; Lima-Verde *et al.*, 2011). Entretanto, é importante mencionar que há outros

esteroides, e não apenas os estrógenos, na participação da regulação do desenvolvimento e amadurecimento dos folículos, isso porque, antes do pico de LH, existe um aumento dos níveis plasmáticos de DHT, androstenediona e da testosterona (Kim *et al.*, 2011). Assim, existe uma relação entre progestágenos e estrógenos no desencadeamento do pico pré-ovulatório das gonadotrofinas (Wang *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2007).

As flutuações hormonais, acima citadas, têm como função primordial a preparação fisiológica do corpo feminino para a fertilização, implantação e desenvolvimento inicial do embrião (Wu *et al.*, 1991; Lima-Verde *et al.*, 2011). Neste sentido, o ciclo menstrual é caracterizado como a preparação do organismo feminino para a reprodução, e conseqüentemente, para perpetuação das espécies. No entanto, existem alterações fisiológicas que podem comprometer a normalidade do ciclo menstrual como, por exemplo, idade (menopausa), a ocorrência de ovários policísticos (produção anormal dos esteroides sexuais) (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009) e o uso de contraceptivos hormonais (CHs) (Tsutsui *et al.*, 2012). A menopausa é o período fisiológico, que se inicia após a última menstruação. Isso significa dizer que a partir desse momento há um período anovulatório, pois o organismo deixa de produzir, pelos ovários, os hormônios sexuais femininos, estrógenos e progestágenos (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009). A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), por sua vez, é caracterizada por irregularidades hormonais, conseqüentemente, anormalidades nos processos ovulatórios. E, por último, o uso de CHs, que merece destaque pelo fato de seus efeitos serem objetivo de investigação do presente estudo.

1.2. Contraceptivos hormonais (CHs)

A contracepção hormonal engloba um conjunto de métodos que permitem planejar, espaçar e evitar a gravidez, modulando-se a fecundidade às expectativas reprodutoras das famílias (Blumenthal e Edelman, 2008). Tais métodos consistem de hormônios femininos sintéticos, que podem ser combinados, ou seja, na composição há presença de estrógeno e progestágeno; ou não combinados, apenas progestágeno. Os CHs não combinados atuam de forma semelhante aos produzidos pelos ovários, cujo efeito farmacológico permite o bloqueio da ovulação, inibindo, assim, a liberação dos hormônios FSH e LH (Tsutsui *et al.*, 2012). A função principal da contracepção hormonal consiste basicamente no controle negativo sobre o eixo

hipotálamo-hipófise, inibindo a produção hipofisária das gonadotrofinas e, conseqüentemente, a maturação folicular e a ovulação (Serfaty, 2005).

Os benefícios do uso de CHs são inquestionáveis, principalmente na medida em que propiciou a emancipação da mulher e sua participação no mercado de trabalho, além de possibilitar o controle da taxa de natalidade e o planejamento familiar de acordo com as condições sociais e financeiras das famílias (Bitzer e Simon, 2011; Sonfield *et al.*, 2013). Em uso desde 1960, a contracepção hormonal constitui o método mais popular e eficaz na prevenção da gravidez e para tratamento de outras condições clínicas, dentre elas a endometriose, ovários policísticos, tensão pré-menstrual, miomas e cólica menstrual (Chiaffarino *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2003; Vercellini *et al.*, 2011; Schindler, 2013). Estima-se que, desde a sua descoberta, os supressores hormonais da ovulação têm sido utilizados por mais de 100 milhões de mulheres em todo mundo (Chandra *et al.*, 2005; Margolis *et al.*, 2007).

Desde o seu lançamento no mercado, as formulações dos CHs mudaram significativamente. O intuito desta modernização baseia-se, principalmente, na redução da dose do estrógeno presente na formulação destes fármacos (Bitzer e Simon, 2011). Neste contexto, os contraceptivos orais combinados (COCs) são classificados de acordo com a quantidade de estrógeno presente em cada comprimido em: a) COCs de 1ª geração: com 50 µg ou mais de etinilestradiol; b) COCs de 2ª geração: com 30 ou 35 µg de etinilestradiol e c) 3ª geração: com 30 µg ou menos de etinilestradiol (Kemmeren *et al.*, 2001; Bitzer e Simon, 2011).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento dos CHs evoluiu para a diminuição das doses de estrógeno e de progestágeno, baseando-se no fato de que doses mais baixas estão associadas à menor incidência de alterações metabólicas e aos efeitos adversos (Hugon-Rodin *et al.*, 2014). No entanto, evidencia-se ainda que a modernização dos CHs também esteja baseada na inclusão de novas fórmulas de progestágenos (Bitzer e Simon, 2011) e na ampliação de novas vias de administrações (Kemmeren *et al.*, 2001; Bitzer e Simon, 2011; Hugon-Rodin *et al.*, 2014).

A utilização de novas vias de administração dos CHs tem sido amplamente estudada, e atualmente há várias possibilidades distintas como, por exemplo, a transdérmica, a intravaginal, o implante subcutâneo, o dispositivo intrauterino, os injetáveis, dentre outros (Sulak *et al.*, 2000, Hugon-Rodin, *et al.*, 2014). A intenção

principal da administração de CHs por vias não orais baseia-se na redução dos efeitos colaterais e adversos devido à não metabolização hepática (Haider e Darney, 2007). Além disso, o surgimento destes novos métodos proporcionou às usuárias de CHs a opção por métodos com efeitos prolongados destes fármacos, isto é, sem sua administração diária (Sulak *et al.*, 2000).

Muito embora existam vários métodos distintos de CHs, os contraceptivos orais ainda são os mais usados em todo o mundo (Hugon-Rodin *et al.*, 2014). No Brasil estima-se que aproximadamente 10,4 milhões de mulheres usam a pílula de anticoncepcional, sendo este o método hormonal mais utilizado pela população feminina brasileira ($\pm 25\%$) (Borges *et al.*, 2015). Uma das principais justificativas do sucesso do COCs no Brasil deve-se à acessibilidade, ao baixo custo financeiro e à eficácia anovulatória destes métodos. O segundo método de CHs mais utilizado no Brasil são os CHs injetáveis, isso porque proporciona às mulheres uma boa alternativa à terapêutica contraceptiva, porém com administração mensal ou até mais espaçada no tempo, por exemplo, os trimestrais (Hugon-Rodin *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2015).

A descoberta dos contraceptivos injetáveis aconteceu após a avaliação do uso de injeções de 50mg de medroxiprogesterona com 10mg de ciclopentilpropionato de estradiol, em um grupo de 90 mulheres multíparas, as quais tinham abandonado a contracepção oral devido a efeitos secundários. Nestas mulheres foram administradas a cada cinco semanas uma injeção desta formulação, independentemente do padrão de hemorragias. Sendo assim, foram monitorados os resultados sanguíneos, que revelaram supressão das gonadotrofinas, mesmo efeito obtido pelos COCs, comprovando assim a eficácia do método injetável como contraceptivo hormonal (Scommegna *et al.*, 1970; Haider e Darney, 2007).

No Brasil, estima-se que cerca de 2 milhões de mulheres usam contraceptivos injetáveis mensais combinados. O injetável mensal mais usado é a associação do algestona acetofenida (150 mg) – que é o mais simples dos derivados da progesterona com eficiência progestacional superior à progesterona – e um éster de E2, denominado de enantato de estradiol (10 mg). Esta composição tem sido comercializada como *Perlutan*[®] (Borges *et al.*, 2015), que possui formulação semelhante à encontrada na pílula anticoncepcional oral combinada, contendo estrógeno associado ao progestágeno. O estrógeno utilizado não é o sintético (etinilestradiol), mas sim um estrógeno natural (enantato de estradiol). As vantagens

seriam uma possível redução dos efeitos sobre a pressão arterial, hemostasia e coagulação, metabolismo lipídico e função hepática em comparação com a contracepção oral combinada. Além disso, a administração, por ser parenteral, elimina o efeito da primeira passagem dos hormônios sobre o fígado, de forma que o efeito da via intramuscular no perfil fisiológico é atrasado e, de certa forma, atenuado. Outra vantagem é a diminuição da frequência e a intensidade das cólicas menstruais (Haider e Darney, 2007).

De acordo com fabricantes, a ação contraceptiva da *Perlutan*[®] reside, fundamentalmente, no efeito do progestágeno sobre o eixo neuroendócrino; inibindo, assim, a ovulação pelo bloqueio do pico do LH, que permanece em seus níveis basais. Secundariamente, são observadas também atividades sobre o muco cervical, o endométrio e a peristalse tubária, ampliando seu potencial contraceptivo. Com esse elenco de ações, o injetável mensal combinado oferece quase 100% de eficácia na inibição da ovulação e do risco de gravidez. Para Melo e Filho (1997), este método tem como vantagens a liberação lenta e homogênea dos hormônios; preservação de sangramento semelhante ao do fluxo menstrual; uma única injeção mensal; e o emprego de estrógenos naturais com a diminuição nas repercussões metabólicas.

Uma das principais desvantagens deste método injetável é em relação às alterações na periodicidade do sangramento, observadas em parte de suas usuárias. Acentua-se que, frequentemente, tais alterações são responsáveis pela descontinuação do método (Lopez *et al.*, 2013). Além do mais, os métodos injetáveis, assim como os demais métodos hormonais, não protegem contra Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs), e são associados a efeitos indesejáveis como ganhos de peso, cefaleia e sensibilidade mamária. Embora os métodos hormonais combinados sejam altamente eficazes e apresentem excelente perfil de segurança, quanto ao risco da concepção, mesmo em vias intramusculares, as composições contendo estrógeno têm sido conhecidas por aumentar também os riscos de trombose devido às alterações nos fatores de coagulação sanguínea (Vlieg *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2012), levam as alterações do peso e, conseqüentemente ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Xu *et al.*, 2012, Lanza *et al.*, 2013). Adicionalmente, promovem aumento da ansiedade e afetam o comportamento sexual (Wanyonyi *et al.*, 2011). Esses efeitos colaterais serão discutidos em detalhes a seguir.

1.2.1 Riscos fisiológicos associados ao uso de contraceptivo hormonal

1.2.1.1. Coagulação sanguínea

Para a melhor compreensão da relação entre o uso de contraceptivo hormonal e o risco de trombose será necessária, primeiramente, a compreensão dos fatores que envolvem a coagulação sanguínea. Sendo assim, serão resumidos os principais componentes e mecanismos atuantes no sistema hemolítico responsável pela coagulação sanguínea.

O sistema hemolítico é constituído por plaquetas, vasos, proteínas da coagulação do sangue, anticoagulantes naturais e sistema de fibrinólise. Sabe-se que, na maioria das circunstâncias, as células endoteliais mantêm um ambiente que promove o fluxo de sangue líquido bloqueando a adesão e a agregação das plaquetas; inibindo, assim, os fatores de coagulação sanguínea e a formação dos coágulos sanguíneos (Kumar *et al.*, 2008).

Resumidamente, a coagulação sanguínea é o resultado de uma série de reações entre várias proteínas plasmáticas, que recebem o nome de fatores de coagulação. Estes fatores podem ser agrupados da seguinte maneira: a) fatores que se modificam durante a coagulação (fatores I, V, VIII e XIII); b) fatores do grupo da protrombina (fatores II, VII, IX e X); e c) fatores do grupo de contato (fatores XI e XII). Ressalta-se que estes fatores desempenham papéis de suma importância na coagulação sanguínea ou formação dos coágulos, e que a maioria consiste em formas inativas de enzimas proteolíticas (Bozzini, 2004). A ativação dessas enzimas proteolíticas provocam reações sucessivas, em cascata, do processo de coagulação. A reação fundamental no processo de coagulação do sangue é a transformação do fibrinogênio em fibrina polimerizada (insolúvel). Esse processo depende de inúmeras reações moleculares, que ocorrem em sequência e que podem ser iniciadas por dois caminhos: pela via extrínseca (tecidual) ou pela intrínseca (plasmática), conforme descrito na Figura 5 (Filho, 2008).

A via extrínseca é o meio pelo qual a substância ativadora da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com os tecidos extravasculares (Banks, 1991). Ocorre quando há ativação do fator VII, que gera a ativação do fator X, que, por sua vez, estimula a protrombina (Banks, 1991; Bozzini, 2004). Já a via intrínseca, inicia-se pelo contato do sangue com uma superfície diferente do

endotélio normal e das células sanguíneas. Nesta via, a sequência de reações enzimáticas produz o coágulo sanguíneo nas diferentes etapas: (a) fase de contato com superfície alterada; (b) a ativação do fator X; (c) a formação de trombina; (d) a formação de fibrinogênio, conseqüentemente, a fibrina insolúvel ou estável (Swenson, 1996; Metze, 2008), como descrito na Figura 5.

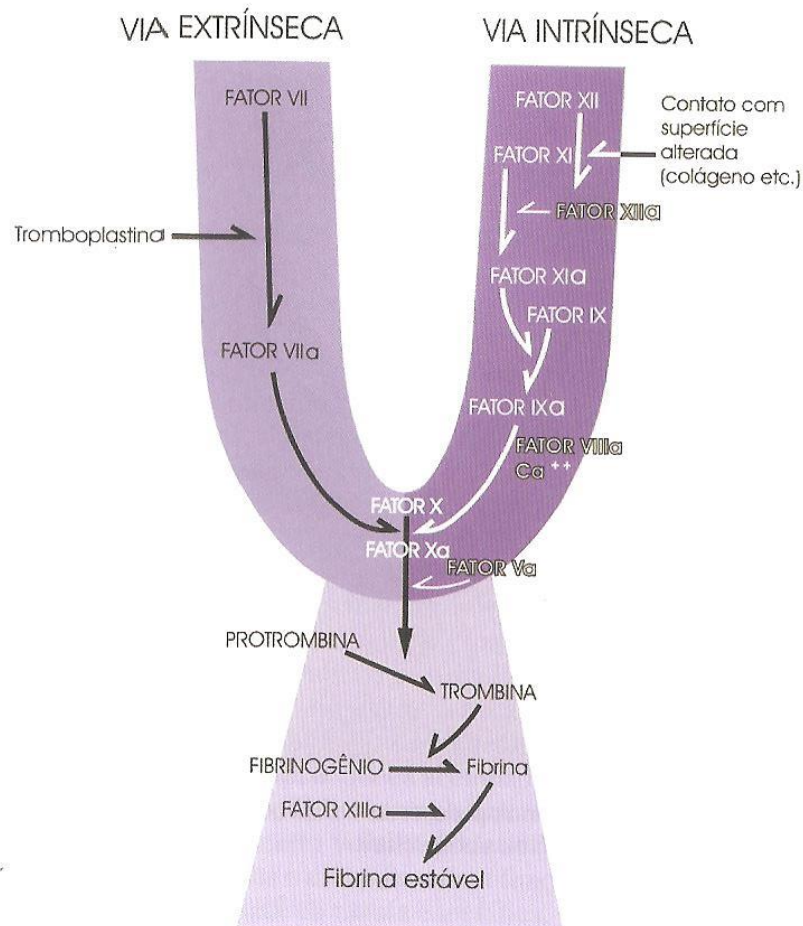


Figura 5- Esquema geral da coagulação sanguínea, a partir das vias intrínseca (plasmática) e extrínseca (tecidual) (Imagem retirada Filho, 2008).

Uma vez iniciada a coagulação, os sistemas anticoagulantes são também ativados e, assim, impedem o crescimento incontrolado do trombo, ao mesmo tempo em que iniciam a sua dissolução. Os principais elementos anticoagulantes naturais são: 1) a antitrombina III, que é um poderoso inibidor da trombina; 2) as proteínas plasmáticas C, que são sintetizadas no fígado, e que inativam os fatores de coagulação Xa e Va; 3) o sistema fibrinolítico, também controlado por ativadores e inibidores, que tem como produto final a formação de plasmina (fibrinolizina). A plasmina degrada a fibrina e, conseqüentemente, impede a formação de coágulos ou trombos, conforme descrito na Figura 6 (Filho, 2008). Visto desta maneira, o

sistema hemolítico engloba um conjunto de fenômenos fisiológicos, cuja finalidade é manter o fluido sanguíneo normal.

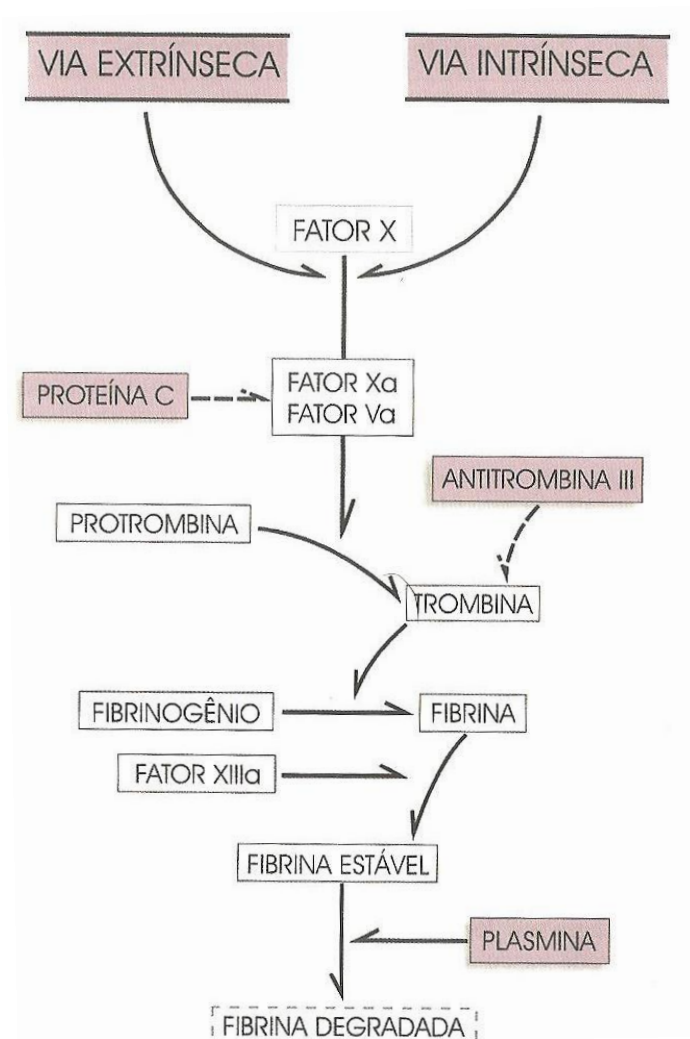


Figura 6- Esquema geral dos três mecanismos naturais antitrombóticos do sistema hemolítico (Imagem retirada de Filho, 2008).

Quando os mecanismos de antitrombóticos não funcionam adequadamente, desencadeia-se a formação patológica, que é denominada trombose. A trombose é um processo patológico caracterizado pela solidificação do sangue dentro dos vasos ou do coração em um indivíduo vivo, sendo o trombo uma massa sólida formada pela coagulação sanguínea (Freedman *et al.*, 2011). A embolia consiste na existência de um corpo sólido, líquido ou gasoso (êmbolo), transportado pela corrente sanguínea que é capaz de obstruir um vaso; sendo que a obstrução tende a ocorrer após uma ramificação, quando o diâmetro vascular fica menor do que o do corpo estranho. Em mais de 90% dos casos, os êmbolos originam-se de trombos, fenômeno, este, chamado de tromboembolia; sendo menos comum a formação por

fragmentos de placas ateromatosas, vesículas lipídicas ou bolhas gasosas. Êmbolos originados de trombos venosos (exceto no sistema porta) são levados aos pulmões enquanto trombos arteriais (coração ou grandes artérias) são êmbolos que se dirigem à grande circulação e que se alojam principalmente no cérebro, nos intestinos, nos rins, no baço e nos membros inferiores (Metze, 2011).

Na trombose venosa, os estados de hipercoagulabilidade primários que refletem defeitos nas proteínas que governam a coagulação e/ou a fibrinólise ou os estados hipercoaguláveis secundários, envolvendo anormalidades dos vasos e do fluxo sanguíneo, levam ao desenvolvimento da patologia (Godoy, 2009). Destacam-se, nas causas congênitas, o fator V de Leiden, a hiper-homocisteinemia, a mutação no gene da protrombina, a antitrombina III e as deficiências das proteínas C (Glynn e Rosner, 2005). Nas causas adquiridas, relacionadas à trombose venosa, os anticorpos antifosfolípidos, neoplasias, gestação, puerpério, cirurgias, traumas e uso dos anticoncepcionais são mais frequentes (Glynn e Rosner, 2005; Godoy, 2009).

Já na trombose arterial, ela depende altamente do estado da parede vascular, das plaquetas e dos fatores relacionados com o fluxo sanguíneo (Glynn e Rosner, 2005). Tradicionalmente, os fatores de risco para arteriosclerose incluem a hipertensão arterial, a elevação do colesterol, a diabetes, o fumo e associam-se com a doença coronariana arterial periférica e com o acidente vascular cerebral (Godoy, 2009). Sabe-se que a trombose arterial é menos frequente na idade reprodutiva que o tromboembolismo venoso (1 caso para cada 5-10 casos, respectivamente) (Brito *et al.*, 2011). O tromboembolismo venoso compreende a trombose venosa profunda; e sua consequência imediata mais grave é a embolia pulmonar. Na sua fase aguda, o tromboembolismo está associado a uma alta probabilidade de complicações graves, muitas vezes fatais (Caiafa e Bastos, 2002).

A patogênese da trombose venosa é complexa e multifatorial, e resulta da interação entre fatores hereditários e adquiridos (Rosendaal, 2005; Konkle, 2008;). Em mulheres, usuárias de CHC, há ainda aumento do risco ao desenvolvimento de tromboembolismo venoso (Vlieg *et al.*, 2009; Hugon-Rodin *et al.*, 2014). Evidencia-se que o risco de trombose é proporcional à dose de estrogênio, pois alta dosagem deste esteroide (≥ 50 mcg) está associada a um aumento de duas vezes no risco de tromboembolismo venoso quando comparada às baixas dosagens desse hormônio

(<50mcg) (Rosendaal, 2005; Vlieg *et al.*, 2009; Lidegaard *et al.*, 2012; Hugon-Rodin *et al.*, 2014).

O estrógeno induz a alterações significativas no sistema de coagulação, culminando com aumento na produção de trombina e dos fatores de coagulação (fibrinogênio, VII, VIII, IX, X, XII e XIII), além de promover redução dos inibidores naturais da coagulação (proteína C e antitrombina), produzindo um efeito pró-coagulante leve (Lidegaard *et al.*, 2012). Desta forma, usuárias de fórmulas combinadas são mais suscetíveis a distúrbios fisiológicos relacionados aos fatores de coagulação, visto que há influência direta do estrógeno na fisiologia hemolítica, o que compromete bastante a sua hemostasia (Rosendaal *et al.*, 2003; Vlieg *et al.*, 2009). No entanto, é importante destacar que há outros fatores de risco, por exemplo, fatores genéticos (predisposição à trombose venosa, doenças cardiovasculares e câncer) e ambientais (uso de tabaco, alimentação inadequada e a não prática de exercício físico), que podem ser agravados com o uso de CHs (Rosendaal *et al.*, 2002). Neste sentido, há necessidade do fornecimento de mais informações às usuárias de contraceptivo hormonal combinado, além de uma orientação detalhada pelos profissionais de saúde sobre os testes clínicos prévios, isto é, aqueles que permitem a verificação da condição individual clínica antes do uso dos métodos hormonais combinados.

A avaliação da hemostasia hemolítica consiste no exame clínico denominado de coagulograma, que consiste na análise da plaquetometria (contagem do número de plaquetas), na dosagem do valor plasmático de fibrinogênio e nas avaliações dos tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Normalmente, o sangue coagula em 4-8 min quando colocado em tubo de ensaio. O TP fornece indicação sobre a quantidade total de protrombina presente no sangue (Swenson, 1996). Este teste é usado para identificar as anormalidades dos fatores envolvidos no sistema na via extrínseca, a saber, protrombina e fatores V, VII e X. Os testes de rotina laboratoriais, que determinam as concentrações de fibrinogênio no plasma, envolvem a adição de trombina ao plasma para medição da velocidade com que a fibrina é formada (Majerus, 2003). Já o tempo o TTPa é mais comumente empregado para verificação do mecanismo intrínseco da coagulação (Swenson, 1996; Majerus, 2003). Esse teste é utilizado para o diagnóstico de anomalias dos fatores da coagulação VIII, IX, X, XI, XII protrombina e fibrinogênio, e consequentemente, a formação do coágulo (Swenson, 1996).

Diante das graves consequências, do uso de CHs na fisiologia hemolítica, é importante mencionar que a ocorrência de trombose venosa também pode estar relacionada à baixa frequência de consumo de alimentos ricos em fibras, e ao aumento da proporção de gorduras saturadas e açúcares da dieta, associada a um estilo de vida sedentário, os quais também favorecem a elevação dos riscos para o aparecimento trombose venosa durante a vida reprodutiva (Rosendaal *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2011). Dessa forma, para mulheres com fatores de risco para doenças cardiovasculares, por exemplo, fumantes, hipertensas, obesas, portadoras de hipercolesterolemia ou diabetes, os CHs devem ser prescritos com muita cautela (Brito *et al.*, 2011); pois, estes ainda podem favorecer mudanças no perfil lipídico (Jones *et al.*, 2002), provocar aumento da pressão diastólica (Asare *et al.*, 2014) e do peso corporal (Xu *et al.*, 2012, Lanza *et al.*, 2013), o que aumenta os riscos as doenças cardiovasculares.

1.2.1.2. Alterações no peso corporal

O ganho de peso é um dos pretextos mais comuns, evocados por mulheres em idade reprodutiva, para justificar o abandono dos métodos CHs (Gallo *et al.*, 2004). Entretanto, há controvérsias na literatura em termos do efeito do uso dos CHs sobre o peso corpóreo; por um lado, há estudos que demonstram a ocorrência de ganho de peso (Hatcher e Guillebaud, 1998; Fisberg *et al.*, 2001; Picardo *et al.*, 2003; Gallo *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2012, Lanza *et al.*, 2013). Por outro, há os que contestam essa hipótese, justificando que as variações do peso podem ser um resultado de mudanças dietéticas e de idade, e não necessariamente induzido pelo uso de CHs (Speroff *et al.*, 1999; Shinoda *et al.*, 2002; Edelman *et al.*, 2010; Sullivan e Cameron, 2010). Segundo Speroff *et al.* (1999) a razão mais provável para o aumento de peso das mulheres seria uma combinação de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida, o que não estariam, exclusivamente, relacionados ao uso de CHs (Edelman *et al.*, 2010).

Muito embora, existam fatores que podem causar alterações no peso, o uso de CHs tem sido indicado como um dos motivos plausíveis do ganho de peso corporal (Hatcher e Guillebaud, 1998; Gallo *et al.*, 2004). Teoricamente, o mecanismo biológico para o ganho de peso induzido pelos CHs pode ser decorrente da retenção de fluidos secundários ou extracelulares devido à ativação dos mineralocorticóides e/ou à ativação da renina-angiotensina-aldosterona, e

consequentemente, a reabsorção de sódio. Neste sentido, ocorre nas usuárias a retenção de líquido, que favorece o aumento de peso corpóreo (Flegal *et al.*, 2001; Gallo *et al.*, 2004).

Há indícios de que usuárias de CHs apresentem perfil lipídico alterado, ou seja, médias de colesterol total – lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos significativamente aumentados e lipoproteína de alta densidade (HDL) diminuída. Isso quando comparado àquelas mulheres que não fazem uso de CHs (Fisberg *et al.*, 2001). A justificativa para isso é devido à presença de estrógeno, que altera o perfil de lípidos por meio da via genômica, na qual ocorrem alterações de receptores de estrógeno que afetam a regulação positiva apolipoproteína hepática na composição do CHs (Jones *et al.*, 2002) e consequentemente, as usuárias estariam mais sujeitas a alterações do peso corporal e também mais suscetíveis a doenças cardiovasculares (Asare *et al.*, 2014). Lubianca *et al.*, (2003) enfatizam que as usuárias de CHs apresentam pressão diastólica maiores que não usuárias, o que aumenta o risco de infarto agudo do miocárdio e de acidente vascular cerebral (Tepper *et al.*, 2013).

É importante mencionar que alterações no perfil lipídico e aumento da pressão diastólica são efeitos comumente registrados em usuárias de CHs por via oral (pílulas) (Asare *et al.*, 2014). As substâncias presentes nos COCs tentam reproduzir as propriedades dos estrógenos endógenos, entretanto, este esteroide sintético possui elevada potência biológica, que exacerba a produção de angiotensinogênio hepático, responsável pela elevação da pressão arterial pelo sistema renina angiotensina-aldosterona (Oelkers, 1996). Como já mencionado, este efeito também provoca a retenção hídrica, que propicia elevação do peso corporal (Gallo *et al.*, 2004).

Salienta-se ainda que a via de administração da contracepção hormonal não interfere no aumento da pressão arterial, nas alterações do perfil lipídicos e no aumento do peso corporal (Oelkers, 1996; Gallo *et al.*, 2004). Ao contrário, também foram observadas alterações destes parâmetros pelas vias transdérmica (implantes) e intramuscular (injetáveis) comparadas ao grupo placebo (Asare *et al.*, 2014). Apesar dos CHs injetáveis possuírem na composição estrógeno naturais, há ainda comprometimento na produção das proteínas hepáticas, que podem elevar os riscos das doenças cardiovasculares (Tepper *et al.*, 2013). Ainda que os estrógenos naturais sejam mais bem tolerados pelo organismo feminino, uma vez que as suas

propriedades moleculares e estruturais são semelhantes aos esteróides endógenos, o efeito no metabolismo das proteínas hepáticas é menor (Sitruk-Ware, 2006).

Apesar dos benefícios do uso dos CHs ultrapassarem os riscos associados a esses medicamentos, um bom aconselhamento contraceptivo às mulheres deve incluir todos os aspectos benéficos além de possíveis eventos adversos para, nesse contexto, proporcionar uma escolha mais apropriada para cada caso (Brito *et al.*, 2011). Como já citado, podem existir comprometimentos graves, por exemplo, tromboembolismo venoso (Rosendaal *et al.*, 2002), alterações no perfil lipídico (Fisberg *et al.*, 2001), aumento da pressão arterial (Asare *et al.*, 2014) e de doenças cardiovasculares (Tepper *et al.*, 2013). Embora, haja também comprometimentos do uso de CHs na fisiologia hormonal, cujos comprometimentos estão mais intimamente ligados às alterações nos padrões comportamentais das usuárias (Davis *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2014).

1.2.1.3. Alterações no comportamento sexual

Os efeitos da contracepção hormonal no comportamento sexual das usuárias são bastante controversos, visto que a sexualidade feminina pode ser influenciada por múltiplos fatores: biológicos, psicológicos, sociais e culturais (Strufaldi *et al.*, 2010). No entanto, há uma parcela significativa de usuárias que relatam menor satisfação e desejo sexual após o uso dos CHs (Davis *et al.*, 2004). Sabe-se que CHs tem ação anovulatória, e um dos principais efeitos fisiológicos é justamente no perfil hormonal. Neste sentido, é muito provável que haja um comprometimento na sexualidade feminina.

Muito embora, o mecanismo pelo qual os esteroides sexuais influenciam na sexualidade não esteja totalmente estabelecido, sabe-se que os androgênios e os estrógenos atuam, especialmente, nas estruturas hipotalâmicas e límbicas, que, quando estimuladas, liberam neurotransmissores que modulam importantes funções relacionadas à sensibilidade, à percepção e ao prazer (Ciocca *et al.*, 1995; Bancroft e Vukadinovic, 2004). Além do mais, os estrógenos estimulam os neurônios da amígdala potencializando assim a excitação e o orgasmo (Battaglia *et al.*, 2008). Vê-se, portanto, que os estrógenos e os andrógenos participam do arcabouço das estruturas centrais envolvidas no comportamento e no bem-estar das mulheres.

Ainda é conhecido que os estrógenos, principalmente o E2, exercem função determinante sobre aspectos periféricos da sexualidade feminina, uma vez que

causam efeitos na manutenção do trofismo da mucosa vaginal e na lubrificação (Bancroft e Vukadinovic, 2004), sendo este mecanismo mediado pela estimulação da produção de óxido nítrico pelos estrógenos, que provavelmente levam à vasodilatação da região do clitóris e ao relaxamento dos tecidos vulvovagínias, com consequente ingurgitamento do clitóris e dos pequenos lábios (Battaglia *et al.*, 2008).

Considerando as informações supracitadas, é possível observar que os níveis de estrógenos podem comprometer significativamente o comportamento sexual das mulheres, visto que baixas doses de estrógeno são associadas à diminuição da lubrificação vaginal e, portanto, menor desejo ou declínio da satisfação sexual. As alterações no desejo sexual podem decorrer do impacto negativo do hipoestrogenismo sobre o fluxo sanguíneo arterial nas regiões do SNC, que são envolvidas no comportamento sexual. Isso comprometeria a excitação sexual feminina (Cayan *et al.*, 2008). Por outro lado, usuárias de CHs com formulação de altas doses de estrógeno, isto é, que apresentam hiperestrogenismo, também apresentam distúrbios sexuais. Todavia, estas mulheres poderiam apresentar aumento do desejo sexual, mas isso não acontece (Strufaldi *et al.*, 2010), provavelmente, em consequência da redução das concentrações de testosterona observada nas usuárias de CHs (Zimmerman *et al.*, 2014).

Normalmente, usuárias de CHs apresentam concentrações supra-fisiológicas de estrógeno a nível hepático. Isso causa o aumento da síntese hepática da Proteína Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais (SHBG) (Zimmerman *et al.*, 2014). A SHBG tem uma grande afinidade pela testosterona e pouca pelos estrógenos, o que leva a uma diminuição da fração livre deste andrógeno (fracção biologicamente ativa); portanto, variações nas concentrações de SHBG em mulheres influenciam, de forma bastante significativa, a ação androgênica no organismo (Zimmerman *et al.*, 2014; Wallwiener *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2013).

Existem evidências de que baixas concentrações circulantes de testosterona determinam alterações significativas na função sexual feminina e, atualmente, a deficiência androgênica, principalmente da testosterona, é um dos componentes etiopatogênicos mais significativos relacionados à sexualidade feminina (Roberts *et al.*, 2013). A libido nas mulheres associa-se aos andrógenos, principalmente à testosterona, neste sentido, há um impacto na sexualidade devido à diminuição da concentração de testosterona, pois este andrógeno tem forte associação com o

desejo sexual, com o orgasmo e até mesmo com a quantidade de relações sexuais, que o indivíduo mantém (Alexander *et al.*, 1993).

É possível concluir que os benefícios trazidos pela testosterona na melhora da libido ou da satisfação sexual são bem descritos na literatura. Todavia, ela também está associada à melhora do humor, da energia, do bem estar (Krapf e Simon, 2009) e da estética corporal (Miller *et al.*, 2011), que também podem ser associadas à melhora da disposição sexual feminina (Baumeister, 2004; Van Anders *et al.*, 2011, Gray *et al.*, 2010; Fooladi *et al.*, 2014). Diante das importantes funções da testosterona no organismo feminino, há uma crescente procura pelos tratamentos exógenos deste andrógeno.

1.3. Testosterona

É fundamental destacar que a testosterona e a DHT são os andrógenos de maiores potências e importâncias no organismo feminino (Yarak *et al.*, 2005). A testosterona tem um papel fundamental na fertilidade feminina (Ryan *et al.*, 2003; van Anders *et al.*, 2015; Bouchard *et al.*, 2016), visto que é a precursora dos estrógenos (Yarak *et al.*, 2005; Lima-Verde *et al.*, 2011). Estima-se que a produção de testosterona, em mulheres jovens, seja 25% de origem adrenal, 25% sintetizada nas células da teca e do estroma ovariano (sob controle LH), e pelo menos 50% seja produzida por conversão periférica a partir de outros andrógenos (Lima-Verde *et al.*, 2011) com posterior metabolização pela 5 α -redutase à DHT ou por aromatases a estrógenos (Yarak *et al.*, 2005; Lima-Verde *et al.*, 2011).

Os efeitos biológicos da testosterona são expressos pelas suas frações livres, já que, no organismo, a testosterona encontra-se de duas formas distintas, denominadas de testosterona total e testosterona livre. A testosterona total são todas as moléculas deste andrógeno presente no organismo, ou seja, as ligadas às proteínas (albumina e SHBG) e a testosterona livre. As formas livres da testosterona são as moléculas não ligadas as proteínas, que estão circulantes no organismo, as quais podem ser absorvidas pelo organismo, por isso são denominadas biologicamente de ativas (Rosner *et al.*, 2007). Quantitativamente, a testosterona livre corresponde a 2% da testosterona total, em mulheres, acima dos 19 anos de idade, a testosterona total apresenta-se nos valores entre 8-60 ng/dL, e a testosterona livre os valores são entre 0.3 a 1,9 ng/dL (Elmlinger *et al.*, 2002; Rosner *et al.*, 2007).

Evidencia-se ainda que, ao longo do ciclo menstrual, há flutuações distintas dos valores de referência de ambas as formas de testosterona. Neste contexto, os valores de testosterona total na fase folicular são entre 4,4 a 39,0 ng/dL; na fase ovulatória, os valores são mais elevados, entre 7,1 a 55,0 ng/dL; e, na fase lútea, apresentam-se entre 4,1 a 44,0 ng/dL (Rosner *et al.*, 2007). Por outro lado, os valores de testosterona livre são: na fase folicular, entre 0,18 a 1,68 ng/dL; na fase ovulatória, entre 0,3 a 2,34 ng/dL; e, na fase lútea, registram-se valores entre 0,17 a 1,87 ng/dL (Elmlinger *et al.*, 2002). É importante mencionar que estes valores de testosterona são referenciados em mulheres saudáveis e reprodutivamente ativas ou férteis, visto que mulheres acima dos 45 anos de idade apresentam deficiências androgênicas, e os valores de testosterona total e livre não apresentam variações típicas do ciclo menstrual (Elmlinger *et al.*, 2002; Rosner *et al.*, 2007).

Sabe-se que o envelhecimento reprodutivo ou ovariano pode causar declínio na produção dos androgênios, tanto dos ovários quanto das adrenais, especialmente da DHEA (Labrie *et al.*, 1997). No estágio da pós-menopausa, a DHEA, principal fonte dos andrógenos, exibe queda de 60%, propiciando quadro de hipoandrogenismo (Labrie *et al.*, 2005). As concentrações séricas de testosterona diminuem gradualmente em função da idade. Ocorre queda de 40% a 50% da testosterona total e livre nas idades 25 e 45 a 50 anos; entretanto, após a menopausa, o declínio nas concentrações é mais lento (Braunstein, 2002).

Muito embora a deficiência androgênica caracterize-se como uma síndrome decorrente da redução da produção ou da ação androgênica, que ocorre mais precisamente com o avançar da idade (Labrie *et al.*, 2005). Há também registros de deficiência androgênica em mulheres jovens, ou seja, ainda em idade reprodutiva, visto que a insuficiência androgênica ou hipoandrogenismo pode ser registrada em qualquer idade (Bachmann *et al.*, 2002; Basson *et al.*, 2004). Nas mulheres jovens, as anormalidades androgênicas são geralmente evidenciadas em decorrência de falência ovariana prematura, tratamento com antiandrogênios, uso de CHs ou terapia hormonal (que reduzem o LH e aumentam a SHBG, diminuindo os androgênios livres). Em mulheres com ooforectomia bilateral, também são verificados declínio significativo dos níveis de testosterona total e livre (Basson *et al.*, 2004).

A deficiência androgênica na mulher passou a ser considerada como de suma importância clínica a partir de 2002, após uma reunião na Universidade de Princeton (EUA), que culminou no consenso que a definiu como uma síndrome constituída por

redução do desejo sexual, diminuição da sensação de bem-estar, mudança de humor, fadiga persistente e inexplicável, perda de massa óssea, redução da força muscular, síndrome climatérica e alterações de memória e da função cognitiva (Davis *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2005; Krapf e Simon, 2009). Nestes casos, as mulheres apresentam níveis frequentemente reduzidos de testosterona livre ou bioativa, que estão abaixo da sensibilidade do ensaio (Simon *et al.*, 2005).

O tratamento exógeno com testosterona tem sido indicado para mulheres, clinicamente diagnosticadas com declínio dos níveis de testosterona total e livre, decorrentes da idade (Laughlin *et al.*, 2000, Elmlinger *et al.*, 2002; Rosner *et al.*, 2007) e da falência ovariana ou ooforectomia bilateral (Basson *et al.*, 2004). Nestas mulheres, o uso exógeno deste hormônio tem trazido resultados satisfatórios nos sintomas relacionados à deficiência androgênica, especialmente sobre a disfunção sexual, sintomas vasomotores e aumento da densidade mineral óssea e da força muscular (Bulun *et al.*, 2005; Braunstein *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008; Udoff, 2009). Além disso, há estudos que observaram associação do uso de testosterona a redução do risco cardiovascular e a ocorrência de lesão hepática (De Paula *et al.*, 2007; Labrie *et al.*, 2009)

Normalmente, as indicações terapêuticas clássicas do tratamento com testosterona são previamente estabelecidas na esfera sexual, isto é, indicadas para mulheres que apresentam declínio dos níveis de testosterona e clinicamente relatam a diminuição da libido, do prazer e da satisfação sexual (Wierman *et al.*, 2006; Braunstein, 2012). No entanto, para alcançar efeitos desejados sobre a libido, a dose de testosterona é supra-fisiológica (acima dos valores endógenos), ou seja, em geral superior a 100 ng/dl, cuja segurança em longo prazo, é ainda incerta (Davis *et al.*, 2016). Neste sentido, é fundamental salientar que o excesso de androgênios pode levar a repercussões estéticas como acne, hirsutismo e até virilização (Guerrieri *et al.*, 2014), além de outras consequências como aumento da agressividade, retenção hídrica e aumento da pressão arterial (Wierman *et al.*, 2006). Também são documentadas tendência à policitemia, à diminuição de HDL e ao aumento do fibrinogênio (Guerrieri *et al.*, 2014). Sabe-se ainda que os androgênios aumentam a gordura visceral, os ácidos graxos livres e prejudicam a ação da insulina (Davis *et al.*, 2016).

Neste contexto, existe ainda uma preocupação do impacto da testosterona e de seus metabólitos sobre a mama e o endométrio em mulheres que expressam

aromatases de maneira anormal. Assim, neste grupo, poderia ocorrer maior conversão da testosterona exógena em E2, o que justificaria um maior risco oncogênico (Dimitrakakis *et al.*, 2002). Embora haja controvérsias na literatura, existem estudos epidemiológicos que demonstram o aumento do risco (Dimitrakakis *et al.*, 2002), enquanto outros não evidenciaram tal associação (Bulun *et al.*, 2005). Desta forma, é recomendável que as mulheres em tratamento com testosterona sejam monitoradas para o câncer de endométrio e de mama, seguindo as mesmas recomendações empregadas na terapia hormonal convencional.

Suspeita-se que, além da dose e das particularidades individuais de cada mulher, o risco de toxicidade por andrógenos ocorra em função à via de administração. No entanto, acredita-se que efeitos colaterais sejam incomuns quando a manutenção da testosterona sérica é feita em níveis fisiológicos (Wickman *et al.*, 2014). Para a realização dessa manutenção usualmente utilizam-se as seguintes vias para administração da testosterona: a) oral (sublingual); b) intramuscular (injetáveis) e c) transdérmica (adesivos e tópicos).

A administração de testosterona por via oral apresenta rápida metabolização pelo fígado, e pode acarretar hepatotoxicidade, bem como distúrbios gastrointestinais; além de poder reduzir o HDL-colesterol e elevar o LDL-colesterol. Entre as formulações de testosterona disponíveis, no mercado atualmente, destaca-se a metiltestosterona, pois apresenta menos efeitos gastrointestinais e é mais bem tolerada (Davis *et al.*, 2004; Shifren, 2009). Esse produto deve ser devidamente manipulado, e sua dose varia de 1,25 mg a 2,5 mg ao dia, que tem se mostrado eficiente no alívio dos sintomas menopausais, por exemplo, redução da massa óssea, comprometimento na função sexual e na qualidade de vida. Já o uso de deidroepiandrosterona, nas doses que variam de 25 a 75 mg/dia, por um período de três a doze meses, ocasionou melhora significativa do humor, do bem-estar e diminuição da fadiga em mulheres (Lobo *et al.*, 2003). No entanto, o undecanoato de testosterona, sob a forma de cápsulas orais (40 mg) administradas diariamente de forma fracionada ou em dias alternados, é raramente recomendado para mulheres devido à grande variabilidade na absorção, que ocorre por meio das vias intestinais, com possibilidade de picos séricos supra-fisiológicos mesmo com doses de 20mg (Buckler *et al.*, 1998).

A fórmula injetável de testosterona pode ter base oleosa, cuja liberação é lenta; ou base de éster, que propicia rápida disponibilização de testosterona livre na

circulação. Ela é comercializada como diferentes ésteres de testosterona, associada ou não aos estrógenos (Lobo *et al.*, 2003), e aumenta o risco de exposição a doses suprafisiológicas, bem como acresce o risco de efeitos adversos (anteriormente citados) (Davis e Davison, 2012). O decanoato de testosterona é um esteroide anabolizante injetável, e sua ação androgênica é indireta por reduzir o SHBG e aumentar a fração livre de testosterona. Seu uso (na dose de 50 mg), a cada 40 dias e, no máximo, seis aplicações ao ano, constitui opção mais segura, sendo bem aceito pelas pacientes (Finotti, 2013). Há ainda o decanoato de nandrolona que pode ser utilizado também por via intra-muscular na dose de 25-50mg a cada 6-12 semanas para tratamento da osteoporose pós-menopausa, com pouco efeito sobre a libido (Davis e Davison., 2012); enquanto ésteres mistos injetáveis de testosterona (50-100mg) são ocasionalmente administrados a cada 4-6 semanas com rápidos resultados sobre a libido, mas frequentes efeitos colaterais de virilização ou masculinização da figura feminina (Braunstein, 2007; Finotti, 2013).

De modo geral, os adesivos transdérmicos são comercializados no tamanho de 28 cm. Na sua composição química estão presentes 8,4 mg de testosterona, a qual é liberada diariamente na dose de 300 µg/dia. Os adesivos de testosterona são a opção de tratamento mais próximo as concentrações fisiológicas devido à liberação menor de testosterona. De acordo com o fabricante os adesivos devem ser trocados a cada três dias (Lobo *et al.*, 2003). Segundo Shifren *et al.*, (2009) os tópicos são creme à base de propionato de testosterona 1% a 2% em petrolado branco, que constitui boa opção, devendo ser aplicado diariamente no clitóris e nos pequenos lábios. Há também como alternativa o gel com testosterona base, em doses que variam de 2,5 mg a 5,0 mg/1 g do gel-base hormonal, na posologia de 1 g/dia, aplicado por via transdérmica ou percutânea na face interna das coxas. Embora os géis e tópicos sejam vias preferíveis às formulações orais, devido aos efeitos de primeira passagem hepática, documentados com a via oral, os efeitos da administração percutânea não têm sido bem documentados como efeitos positivos no aumento do comportamento sexual (Finotti, 2013)

Em suma, tratamentos com andrógenos têm sido indicados a mulheres com distúrbios na produção dos androgênios, no entanto, há muitas controvérsias quanto ao diagnóstico e à terapêutica ideal para tais anormalidades, especialmente no tocante à escolha do androgênio, à via de administração e ao tempo de duração de uso. Em relação à via de administração, alguns estudos têm apresentado resultados

favoráveis o uso de testosterona pela via intranasal, porém estes resultados ainda são iniciais e estão sendo administrados em modelos animais, tais como ratas (Banks *et al.*, 2009) e fêmeas de macacos-prego (Tavares *et al.*, 2007, Topic *et al.*, 2007).

O principal interesse da administração de testosterona pela via intranasal é basicamente devido à dificuldade de entrega das moléculas de testosterona no SNC pelas vias: orais, transdérmicas e intravenosas. Isso porque pelas vias convencionais, a testosterona liga-se às proteínas (SHBG) limitando bastante a passagem deste andrógeno pela barreira hematoencefálica (Banks, 2012). Evidencia-se que, para alcançar os efeitos desejados na melhora da libido, do bem-estar e do humor, há a necessidade de doses bem elevadas de testosterona (Davis *et al.*, 2012). Neste sentido, a via intranasal é uma boa alternativa para obtenção dos efeitos desejados sobre o comportamento; porém com doses menores, o que teoricamente reduz os efeitos indesejáveis (Morley e Perry, 2003).

Uma das principais justificativas para administração de fármacos por via intranasal é devido à rica vascularização da região nasal, e também por sua anatomia, que possui contato direto com SNC por meio da projeção dos receptores olfativos direto na região neural do bulbo olfatório (Lochhead e Thorne, 2012). Além disso, outras vantagens da administração de fármacos por essa via são: 1ª) eliminação da primeira passagem hepática, renal e gastrointestinal, que possibilita o tratamento prolongado dos fármacos; 2ª) evitação da circulação sistêmica, que pode reduzir os efeitos colaterais sistêmicos; 3ª) garante rápida absorção farmacológica mensurada pelo plasma concentração-tempo; e 4ª) é de fácil administração, pois o método é considerado não-invasivo (Wermeling *et al.*, 2006, Woensel *et al.*, 2013). Assim, a via intranasal tem sido estudada como uma alternativa importante para uso de várias terapias; inclusive no tratamento de doenças cerebrais, por exemplo, o câncer (Debinski e Tatter, 2009), e também para reposição hormonal (Banks *et al.*, 2009). Para fins do presente estudo esta será a via utilizada para o tratamento à base de testosterona.

Desta forma, são necessárias pesquisas que busquem esclarecer doses adequadas de testosterona ou fisiologicamente seguras, que poderão ser administradas pela via intranasal, vale mencionar que estudos têm apresentado efeitos positivos do tratamento por esta via sobre o comportamento sexual em fêmeas de macacos-prego (Tavares *et al.*, 2007), e também efeitos menores sobre os aspectos

hormonais de ratas (Banks *et al.*, 2009). Sendo assim, esta via pode ser uma boa alternativa para tratamentos hormonais em mulheres. Entretanto, atualmente não há na literatura estudos que apresentem resultados sobre outros parâmetros fisiológicos como, por exemplo, sobre no sistema hemolítico (TP, TTPa, contagem de plaquetas e fibrinogênio), hemoglobina (HG), SHBG e os lipídios, que podem ser afetados pelo tratamento de testosterona pela via intranasal. Sendo assim, há a necessidade do uso de modelos animais com parâmetros fisiológicos similares as mulheres, na medida em que os resultados encontrados poderão, dentro do possível, ser extrapolados para as humanas. O estabelecimento de vias de administração, doses e modelo animais poderá permitir as mulheres o acesso à terapia hormonal com mais segurança. Devido à proximidade filogenética com humanos, as fêmeas de macaco-prego são um modelo experimental interessante para tal proposta.

1.4. Espécie estudada: *Sapajus libidinosus*

Os animais da espécie *Sapajus libidinosus* são popularmente conhecidos como macaco-prego, assim como as espécies *S. apella*; *S. flavius*; *S. macrocephalus*; *S. cay*; *S. nigritus*; *S. robustus* e *S. xanthosternos* (Lynch Alfaro *et al.*, 2012). Estes macacos são denominados de primatas do Novo Mundo, encontram-se amplamente distribuídos pela América do Sul, sendo encontrados desde o norte da Argentina até a Floresta Amazônica da América Central (Fragazsy *et al.*, 2004).

Em habitat natural, os macacos-prego formam grupos contendo indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, que podem atingir até 40 indivíduos. Estes primatas possuem complexas formas de comunicação social que ocorrem por meio de vocalizações, expressões faciais e alterações na postura. Os grupos são constituídos por uma proporção maior de fêmeas do que de machos, sendo facilmente identificado o macho-alfa, que possui corpo mais robusto e comportamento mais agressivo do que os demais (Fragazsy *et al.*, 2004). Possuem um cérebro bastante desenvolvido, com eficiente sistema de comunicação visual, olfativa, auditiva, além de habilidades manuais altamente elaboradas, tais habilidades permitem que esses macacos manipulem ferramentas (Fragazsy *et al.*, 2004; Resende *et al.*, 2008; Fragazsy *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2015). Atribui-se ao cérebro complexo que os macacos-prego possuem a sua capacidade para mapear em termos espaciais e temporais suas fontes de alimentos. Entre os Primatas do

Novo Mundo, o cérebro do macaco-prego é considerado grande em relação ao tamanho do seu corpo e possui um dos maiores índices de coeficiente encefálico entre os primatas (Janson e Boinski, 1992; Fragazsy *et al.*, 2004; Phillips e Sherwood, 2012).

Os macacos-prego são caracterizados por apresentarem um longo ciclo de vida, e em cativeiro, há registros de um animal que viveu 47 anos (Fragazsy *et al.*, 2004). A maturidade sexual ocorre aproximadamente aos quatro anos de idade, embora dificilmente reproduzam-se até que tenham atingido inteiramente o seu peso de adultos, o que ocorre em torno dos cinco anos de idade (Di Bitetti e Janson, 2001). O ciclo ovariano é do tipo menstrual, com duração média de 21 dias acompanhada de um sangramento muito discreto. O ciclo é similar ao de outras fêmeas de primatas, inclusive ao das mulheres, caracterizado por duas fases distintas: a folicular e a lútea, que sofrem influência dos estrógenos e da progesterona, respectivamente (Nagle *et al.*, 1979).

Outra característica interessante é que fêmeas de macaco-prego exibem notáveis evidências do comportamento sexual no período da ovulação. Anteriormente, a essa fase, isto é, na fase pré-ovulatória, elas solicitam cópula com machos-alfa (dominantes) através de comportamentos específicos tais como: levantar das sobancelhas, tocar e correr, inclinar a cabeça, vocalizar, encarar, massagear mamas e genitálias, entre outros (Carosi e Visalberghi 2002). Estes comportamentos persistentes são tidos como indicativos da aproximação do período ovulatório, o que coincide com o aumento dos níveis de estradiol (Carosi *et al.*, 2005). Após este período, as macacos-prego também copulam com os machos subordinados (Carosi e Visalberghi, 2002; Fragazsy *et al.*, 2004; Carosi *et al.*, 2005).

Entre os primatas do Novo Mundo, os macacos-prego destacam-se como modelo animal em diversas áreas, inclusive em estudos sobre fisiologia reprodutiva (Sousa *et al.*, 2000; Shideler *et al.*, 2001), estratégias reprodutivas (Strier *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2014), comportamento sexual (Carosi *et al.*, 2005) e morfologia do ciclo ovariano (Aujard *et al.*, 1988; Lima *et al.*, 2012). Assim, as principais características para o sucesso da utilização do macaco-prego como sujeito experimental consistem no fato de serem animais que apresentam um repertório de comportamento sexual muito amplo, presença do ciclo menstrual similar ao das mulheres, entre outras semelhanças fisiológicas, morfológicas e anatômicas com a espécie humana

(Fragazsy *et al.*, 2004). Juntas, essas características justificam a escolha desse modelo animal para a realização desse estudo.

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Embora as ações do tratamento à base de testosterona no organismo feminino sejam bem estabelecidas, não são conhecidos os efeitos de sua administração prolongada associada ao uso CHs. Assim, o presente estudo propôs uma abordagem original na medida em que investigou a administração prolongada desse androgênio por via intranasal associada ao uso de CHs em fêmeas de macaco-prego, que podem representar uma boa alternativa de aproximação experimental.

Outro ponto importante do presente estudo diz respeito à concentração de 0,24 mg/kg de testosterona utilizada nas fêmeas de macacos-prego estudadas. A dose aqui utilizada foi inferior à utilizada em estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com a mesma espécie (0,48 mg/kg) (Tavares *et al.*, 2007 e Topic *et al.*, 2007), menor do que a utilizada em fêmeas de ratos (10 mg/kg) (via intranasal) (Banks *et al.*, 2009), e proporcionalmente menor do que a dose geralmente utilizada por via-intravenosa em ratas (10 mg/kg e 50 mg/kg) (Banks *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015), e menor que a utilizada em humanas (50-100mg) (Finotti, 2013). Com isso, busca-se verificar se os efeitos positivos da administração intranasal prolongada da testosterona no modelo investigado se mantêm sob uma dose menor, que poderá ser mais segura e por sua vez diminuir possíveis efeitos colaterais associados a sua administração.

Finalmente, o último aspecto em destaque é o fato de que são escassos, na literatura, estudos que investigam os efeitos do uso prolongado de testosterona concomitantemente à utilização do CHs em mulheres reprodutivamente ativas. Muito embora haja estudos que forneçam efeitos adversos e colaterais do uso de CHs em vários aspectos fisiológicos e comportamentais (Xu *et al.*, 2012, Lanza *et al.*, 2013; Asare *et al.*, 2014), ainda assim os efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHs sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais não têm sido investigados. Neste sentido, fazem-se necessários estudos que objetivem descrever a importância de se conhecer tais efeitos, sobretudo no número crescente de mulheres, que atualmente fazem uso simultâneo de testosterona associado ao CHs

sem ter conhecimento dos efeitos que estes tratamentos concomitantes possam trazer à saúde delas.

Ainda é relevante evidenciar que muitos dos efeitos colaterais e adversos que são descritos na literatura referem-se a mulheres com distúrbios hormonais (menopausa, ooforectomia etc) (Davis *et al.*, 2012). Neste sentido, os efeitos em mulheres reprodutivamente ativas ou sem distúrbios hormonais são pouco divulgados. Assim, face à ampla utilização desse androgênio por mulheres e ao fato de fêmeas de macacos-prego compartilharem similiaridades fisiológicas com mulheres, a utilização da espécie como modelo experimental para esta finalidade é importante na medida em que permite: a) a mensuração de parâmetros fisiológicos hormonais; b) a observação de possíveis efeitos de interação da testosterona com o CHs sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais de modo geral; e c) a observação de possíveis interrelações entre a ação da testosterona e com os parâmetros fisiológicos e comportamentais.

3. HIPÓTESES

Com base no referencial teórico supracitado, o presente estudo baseou-se nas seguintes hipóteses:

H1: O tratamento de algestona acetofenida e enantato de estradiol promove mudanças fisiológicas e comportamentais significativas nas fêmeas de macacos-prego;

H0: O tratamento de algestona acetofenida e enantato de estradiol não promove mudanças fisiológicas e comportamentais significativas nas fêmeas de macacos-prego;

H1: O tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol promove alterações fisiológicas e comportamentais nas fêmeas de macacos-prego;

H0: O tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol não promove alterações fisiológicas e comportamentais das fêmeas de macacos-prego;

H1: O tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol promove efeitos sobre os parâmetros

fisiológicos e comportamentais mesmo após a suspensão da administração de testosterona nas fêmeas de macacos-prego;

H0: O tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol não promove efeitos sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais após a suspensão da administração de testosterona nas fêmeas de macacos-prego;

H1: O tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol promove efeitos sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas jovens e adultas de macacos-prego.

H0: O tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol não promove efeitos sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas jovens e adultas de macacos-prego.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre o ciclo menstrual das fêmeas de *Sapajus libidinosus* (macacos-prego).

4.2. Objetivos específicos

1. Analisar os efeitos do tratamento de algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre os parâmetros fisiológicos (estradiol, estrona, testosterona, di-hidrotestosterona, cortisol, gonadotrofina, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, número de plaquetas, fibrinogênio, hemoglobina, globulina e lipídios) e comportamentais das fêmeas de macaco-prego;
2. Analisar os efeitos do tratamento de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre os parâmetros fisiológicos (estradiol, estrona, testosterona, di-hidrotestosterona, cortisol, gonadotrofina, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, número de plaquetas, fibrinogênio, hemoglobina, globulina e lipídios) e comportamentais das fêmeas de macaco-prego;
3. Analisar o tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre os parâmetros fisiológicos (estradiol, estrona, testosterona, di-hidrotestosterona, cortisol, gonadotrofina, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, número de plaquetas, fibrinogênio, hemoglobina, globulina e lipídios) e comportamentais após a suspensão da administração de testosterona nas fêmeas de macaco-prego;
4. Analisar os efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado à algestona acetofenida e enantato de estradiol sobre os parâmetros fisiológicos (estradiol, estrona, testosterona, di-hidrotestosterona, cortisol, gonadotrofina, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, número de plaquetas, fibrinogênio, hemoglobina, globulina e lipídios) e comportamentais das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1. Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), tendo sido aprovado conforme documento UnBdoc 101375/2011 (Anexo 1). Todos os preceitos éticos estipulados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) foram observados. O uso dos animais experimentais está de acordo com a lei Auroca (nº11.794), que regulamenta a experimentação animal no Brasil.

5.2. Local de estudo

Os animais utilizados nesse estudo foram mantidos no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CP-UnB), segundo as normas de manutenção de animais em cativeiros do IBAMA. O CP-UnB é um criadouro científico (Nº de Registro IBAMA 1/53/1999/000006-2) vinculado ao Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Fisicamente está localizado na Fazenda Água Limpa (FAL) (16°30”S, 46°30”O) na região administrativa da Vargem Bonita-Distrito Federal (DF) a cerca de 30 km do centro de Brasília. A FAL possui uma área de 4.340 ha, dos quais a metade corresponde à área de proteção ambiental e integra uma área de importante corredor ecológico no Distrito Federal.

No CP-UnB, os animais são mantidos em viveiros situados em meio à mata de galeria em condições naturais de luminosidade, temperatura e umidade (Tabela 7). Cada recinto tem dimensões de 4m x 2m x 3m (profundidade, largura e altura, respectivamente) e possui um sistema de divisão interna com porta guilhotina que permite a separação de sujeito experimental de seus(s) companheiros(s) durante as sessões experimentais. Dentro dos recintos havia caixa-ninho, que funciona como abrigo e proteção para os animais, além de cordas e poleiros para fins de enriquecimento ambiental.



Figura 7- Vista parcial de um dos pavilhões do CP-UnB, onde foram mantidos os animais do estudo (Foto: Maria Clotilde H.Tavares)

5.3. Sujeitos

Foram utilizados neste estudo 12 fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (Figura 8). Destas, 5 tinham idade conhecida (nascidas no CP-UnB) e 7 idades estimadas (não nascidas no CP-UnB), sendo a média de idade 13 anos, conforme apresentado na Tabela 1. Fêmeas que apresentaram idade inferior a 15 anos de idade foram consideradas jovens; já aquelas que possuem idade maior que 15 anos foram consideradas fêmeas adultas.



Figura 8- Maneca - fêmea adulta de *Sapajus libidinosus* do CP-UnB que participou do estudo.

Também participaram do estudo 7 machos adultos vasectomizados com idade média de ± 16 anos, no entanto estes machos participaram apenas como respectivos companheiros para as fêmeas estudadas. Para fins experimentais, os animais foram mantidos em grupos compostos por tríade (2 ♀ e 1 ♂ adulto). As

fêmeas foram separadas em dois grupos distintos; um denominado de grupo 01 (n=6); e outro de grupo 02 (n=6), pseudoaleatoriamente designados, estes grupos foram assim denominados apenas no intuito de indicar que as fêmeas do grupo 01 receberam o 1º tratamento de testosterona, e as do grupo 02 receberam o 2º tratamento de testosterona (Tabela 1). É importante mencionar que nosso estudo teve como característica o sujeito como seu próprio controle, sendo assim enquanto no 1º tratamento as fêmeas do grupo 01 recebia o tratamento experimental, ou seja, a testosterona as fêmeas do grupo 02 receberam o placebo. No 2º tratamento houve a inversão dos tratamentos, isto é, as fêmeas do grupo 01 receberam placebo e do grupo 02 testosterona (Tabela 01).

Tabela 1- Idade real e estimada (anos) e condições experimentais 1=experimental (testosterona) e 0=controle (placebo) das fêmeas do Centro e Primatologia- UnB. * indica que a idade é estimada.

Fêmeas	Idade (anos)	1º Tratamento	2º Tratamento
Bolinha	07	1	0
Ronaldinha	17*	0	1
Talita	19*	1	1
Tabata	08	0	1
Tati	06	1	0
Maneca	18*	0	1
Chiquinha	18*	1	0
Chiva	07	0	1
Drica	18*	1	0
Roberta	07	0	1
Aurora	21*	1	0
Délia	17*	0	1

Os sujeitos foram alimentados diariamente entre 7h e 7h30, com uma dieta à base de frutas, legumes, ovos, ração e suplementos vitamínicos. Às 17 horas, a sobra de alimentos era retirada dos viveiros dos animais. Os animais tinham acesso à água *ad libitum*.

5.4. Procedimento

5.4.1. Coletas sanguíneas

As coletas de sangue foram feitas entre os meses de fevereiro a outubro de 2012 durante 10 ciclos menstruais consecutivos. Para cada fêmea de macaco-prego

foram realizadas 2 coletas sanguíneas com intervalos fixos de aproximadamente 10 dias entre as coletas. A partir das amostras sanguíneas foram realizadas as dosagens dos esteroides sexuais (E2, E1, DHT e testosterona total) e do hormônio não-sexual (cortisol); além dos parâmetros fisiológicos tais como: HG, SHBG, lipídios totais, gonadotrofina coriônica, fibrinogênio, número de plaquetas, TP e TTPa.

Para fins da realização das coletas sanguíneas, as fêmeas de macacos-pregos foram individualmente separadas e capturadas no período da manhã entre os horários de 8h às 12h. Todos os procedimentos realizados para captura e coleta de sangue foram realizados pelos tratadores e veterinários do CP-UnB, respectivamente, que possuíam treinamento e experiência para essa finalidade. Neste sentido, primeiramente as fêmeas foram retiradas de seus respectivos viveiros e com o auxílio de um puçá (rede), elas foram capturadas e, em seguida, levadas ao compartimento de manipulações veterinárias do CP-UnB. Nesse local, as fêmeas foram anestesiadas por via intranasal de isoflurano utilizando-se o equipamento portátil inalatório (Vetcase® Fabricante Iontec modelo Colibri/2012). Uma vez anestesiadas, foi coletado um volume de 10 ml de sangue por meio da venopunção pela veia femoral de cada fêmea de macaco-prego.

Após a coleta de sangue, as amostras foram armazenadas em tubos (Vacutte Sabim/ 2012) sem a presença de anticoagulante para dosagem das amostras sorológicas dos hormônios sexuais (E2, E1, DHT e testosterona total) e não sexuais (cortisol e gonadotrofina) para as concentrações de lipídios totais, HG e SHBG. Também foram usados tubos com anticoagulante EDTA para os testes de contagem do número de plaquetas, e tubos com anticoagulante (citrato) para as amostras usadas da análise dos fatores associados à coagulação sanguínea ou coagulograma tais como: fibrinogênio, TP e TTPa.

Todos os tubos com as amostras sanguíneas receberam identificação (data, nome e código do animal) e foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo seco. Do CP-UnB as amostras foram transportadas para ao Laboratório SABIN, onde foram realizadas as dosagens hormonais respectivas de acordo com as normas internas do mesmo.

De acordo com laboratório Sabin para a dosagem das concentrações de testosterona total, cortisol, E2 e SHBG foi usado o método de quimioluminescência, já as concentrações de DHT e E1 foram avaliadas pelo método radioimunoensaio. As concentrações de gonadotrofina coriônica foram avaliadas pelo método

eletroquimioluminescência. Os fatores associados à coagulação sanguínea (número de plaquetas, TP, TTPa e fibrinogênio) foram avaliados pelo método coagulométrico automatizado. Para avaliar as concentrações de lipídios totais e hemoglobolina foi usado método colorimétrico.

5.4.2. Administração das drogas testosterona e placebo

As drogas, testosterona (Noseafix[®]) e placebo (Noseafix[®]) foram fornecidas por *Mattern Pharmaceuticals AG* (Stans, Switzerland). As administrações da droga e do placebo foram realizadas em janela de tempo fixo, três vezes por semana (segunda, quarta e sexta), durante 63 dias consecutivos cada fêmea do grupo experimental recebeu uma dose do gel testosterona, que fora administrado sempre pela manhã (entre 8 h e 9 h). Primeiramente, as fêmeas foram individualmente separadas e liberadas dos seus viveiros ao corredor de acesso (Figura 07). Logo após esse procedimento, elas foram imobilizadas, sem anestesia, por contenção dos membros superiores e inferiores e da cabeça, recebiam, via intranasal, a dose de testosterona (grupo experimental) e placebo (grupo controle) (Tabela 1). O gel com testosterona e placebo foram administradas por meio de uma seringa (1ml) desprovida de agulha, e cada animal recebia um dose única de 0,24 ml/kg da droga que se encontrava distribuída em volume de 0,20 ml do gel viscoso – administrado nas duas narinas, sendo 0,10 ml por narina. Uma das características deste estudo é o sujeito como seu próprio controle, uma vez que, após a fase de administração da droga (testosterona), os grupos foram invertidos, isto é, as fêmeas que compuseram o grupo controle passaram a formar o grupo experimental e vice e versa. Sendo assim, todas as fêmeas passaram pelas mesmas condições experimentais, em uma fase como participantes do grupo controle (gel sem testosterona) e, em outra, do grupo tratado (gel com testosterona).

5.4.3. Administração algestona acetofenida e enantato estradiol

O contraceptivo hormonal administrado nas fêmeas de macaco-prego foi o *Perlutan[®]* (Fabricante *Boehringer Ingelheim*), que é um contraceptivo hormonal combinado (algestona acetofenida e enantato de estradiol). Cada ampola (1ml) contém 150 mg de algestona acetofenida (diidroxiprogesterona) e 10 mg de enantato de estradiol na sua composição. Todavia, para administração desse contraceptivo hormonal foram feitos cálculos alométricos baseados no peso e massa corporal de

cada fêmea. Estes cálculos foram baseados no estudo de Pachaly e Brito (2000), que possibilita a adaptação dessa composição em dose única de 0,10 ml.

O tratamento com algestona acetofenida e enantato estradiol será ao longo do estudo tratado ou denominado como CHC, ou seja, contraceptivo hormonal combinado, o qual foi administrado a cada 21 dias, por via intramuscular, por meio de injeções com auxílio de uma seringa (1ml) com agulha de 30x7. No total, cada fêmea recebeu 9 administrações de CHC, todas as administrações foram feitas na última coleta de sangue de cada ciclo menstrual, quando as fêmeas encontravam-se anestesiadas. Isso com intuito de reduzir o desconforto e minimizar os efeitos da sua administração. Vale mencionar que as aplicações do CHC foram realizadas sempre pelo veterinário do CP-UnB.

5.4.4. Observações comportamentais

Observações comportamentais foram realizadas ao longo de todas as seis fases do estudo (Figura 3). Cada fêmea foi monitorada diariamente, de segunda a sexta-feira, durante 20 minutos ao dia, sendo uma observação no período matutino (9h às 12 h) e outra no período vespertino (14h às 17 h). Desta forma, as sessões de amostragem comportamental tiveram a duração de 10 minutos pela manhã e 10 minutos pela tarde. Isso para cada uma das 12 fêmeas de macaco-prego estudadas.

Para análise do comportamento foi empregado o método ou técnica de amostragem animal-focal (Altman, 1979), com dois tipos de registros contínuo (duração) e instantâneo (frequência) (Martin e Bateson, 1993). Sendo assim, os registros contínuos permitiram a observação da duração dos comportamentos não sexuais (catação, estereotipia e agonismo) (Tabela 2). Já o registro instantâneo permitiu o monitoramento das frequências dos comportamentos sexuais (levantar as sobrancelhas, olhar mútuo, inclinar a cabeça, sorrir, massagear as mamas, genitália e axila, e tentativa de cópula, cópula, braço tenso e tocar e correr) (Tabela 3), que foram anotadas em intervalo fixo de 15 segundos durante cada sessão de 10 minutos de observação. Cabe ainda ressaltar que cada fêmea foi monitorada durante 37 horas ao longo de todo o estudo. Desta forma, o estudo teve uma duração total de 444 horas de observações.

As expressões comportamentais observadas e apresentadas pelas fêmeas (Tabela 2 e Tabela 3) foram descritas conforme os estudos de Carosi *et al.* (1999); Carosi e Visalberghi (2002); Carosi *et al.* (2005); Fragaszy *et al.* (2004) e Carnegie *et*

al. (2005). Ressalta-se que a análise do comportamento foi feita por dois experimentadores por período, que foram responsáveis pela condução das observações. Primeiramente, foi feito um teste de confiabilidade entre observadores para a obtenção de, no mínimo, 90% de confiabilidade. Inicialmente, foi obtida uma linha de base do comportamento dos animais, com o intuito de se verificar a confiabilidade dos dados, que foi calculada segundo metodologia específica documentada na literatura (Martin e Bateson 1993). O registro do comportamento dos animais foi realizado utilizando-se o programa computacional *Etholog* (2.25) disponibilizado gratuitamente pela Universidade de São Paulo- USP.

Tabela 2- Descrições das categorias dos comportamentos não sexuais observados nas fêmeas de macacos-prego do Centro de Primatologia-UnB.

Comportamentos	Descrição
Catação	Manipular ou catar os pêlos dos outros retirando parasitas
Estereotipia	Comportamentos repetidos sem sentido óbvio de ocorrer
Agonístico	Ameaça entre os indivíduos com mostra de dentes, corpo direcionado para frente, podendo envolver luta franca.

Tabela 3- Descrições das categorias dos comportamentos sexuais observados nas fêmeas de macacos-prego do Centro de Primatologia-UnB.

Comportamentos	Descrição
Levantar das Sobrancelhas	Movimentar as Sobrancelhas para cima e para baixo.
Olhar mútuo	Fêmea encara os olhos do macho, ou ambos se olham mutuamente.
Inclinar a cabeça	Cabeça é lateralmente inclinada em relação ao plano vertical.
Sorrir	Movimentar os lábios em forma de sorriso para o companheiro.
Massagear Mamas	Um dos braços é erguido até que mama fique aparente, e com a outra mão, a mama contrária é massageada.
Massagear Genitália	A região da genitália é masturbada com o auxílio de uma ou das duas mãos
Massagear Axilas	Uma ou as duas mãos são cruzadas sobre o tórax do animal e são colocadas nas axilas, que são massageadas ou friccionadas.
Tentativa de cópula	Comportamento de acasalamento ou monta dirigido do macho para fêmea.
Cópula	Comportamento de acasalamento ou monta dirigido do macho para fêmea.
Tocar e correr	Comportamento da fêmea de tocar qualquer parte do macho e correr em seguida.

5.4.5. Delineamento experimental

Na Figura 9, está descrito o procedimento experimental que teve duração de 210 dias consecutivos e que foi delineado em 6 fases sequenciais, descritas a seguir:

1ª FASE- LINHA DE BASE: (1º dia ao 21º) – essa fase teve a duração de um ciclo menstrual com ausência de qualquer tipo de tratamento. Foram realizadas 3 coletas de sangue para todas as fêmeas nos dias 0, 10º e 20º dias com intervalo de ± 10 dias entre cada coleta.

2ª FASE- ADMINISTRAÇÃO DO CONTRACEPTIVO: (21º dia 41º) – teve a duração de um ciclo menstrual, isto é, 21 dias, com administração de uma única dose de CHC, que aconteceu no 21º. Nessa fase, as fêmeas também foram submetidas a duas coletas 02 coletas de sangue.

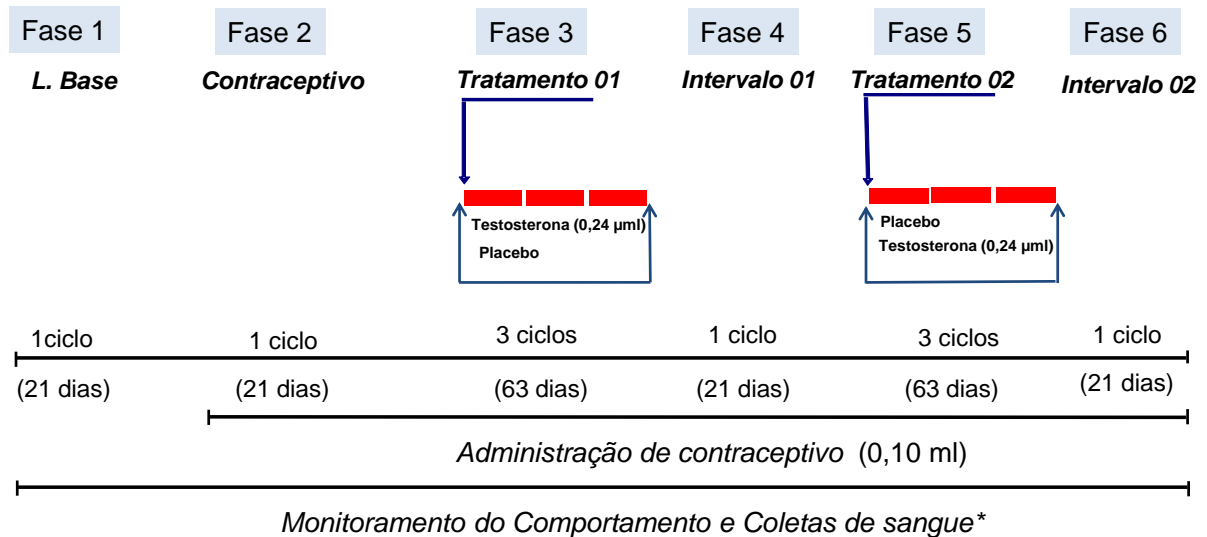
3ª FASE- TRATAMENTO 01: (42º dia ao 105º dia) – teve a duração de 3 ciclos menstruais consecutivos, quando foram feitas as administrações do CHC associadas ao gel de testosterona (grupo experimental) e placebo (grupo controle). Nessa fase, foram realizadas 6 coletas sanguíneas, sendo duas para cada ciclo menstrual com intervalo fixo de 10 dias.

4ª FASE- Intervalo 01: (106º dia ao 127º dia) – teve a duração de um ciclo menstrual, 21 dias, quando ocorreu a suspensão das administrações do gel de testosterona e do placebo; entretanto, foi mantida a administração do contraceptivo hormonal e realizadas as duas coletas de sangue com intervalo fixo de 10 dias.

5ª FASE- Tratamento 02: (128º dia ao 191º dia) – A fase é caracterizada pela inversão dos grupos, ou seja, o grupo experimental do primeiro tratamento passou a ser o controle e vice-versa. Teve a duração de 3 ciclos menstruais consecutivos, com administrações associadas de contraceptivo hormonal e do gel de testosterona no grupo experimental e do CHC associado a placebo no grupo controle. Nessa fase, também foram realizadas 6 coletas sanguíneas, sendo 2 por ciclo menstrual com intervalo fixo de 10 dias.

6ª FASE- Intervalo 02: (192º dia ao 213º dia) – essa fase também teve a duração de um ciclo menstrual, quando ocorreu a suspensão da administração do gel de testosterona e do placebo; porém foram mantidas as duas coletas sanguíneas.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



*Coletas de sangue foram realizadas no intervalo de 10 em 10 dias

Tratamento 01 no grupo 01 e placebo no grupo 02
Tratamento 02 no grupo 02 e placebo no grupo 01

Na Figura 9- Delineamento experimental com as fases, os tratamentos e a quantidade de dias do experimento em 12 fêmeas de macaco-prego.

5.5. Análises de dados

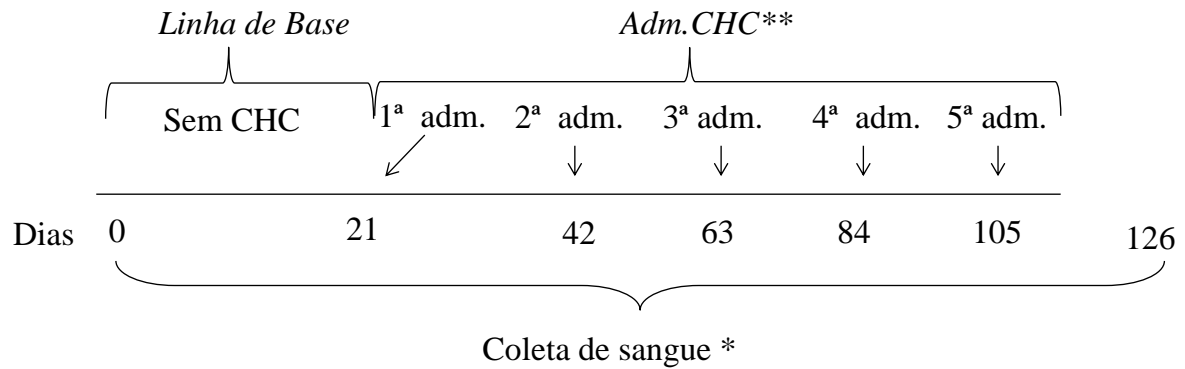
5.5.1. Análises de dados do efeito do CHC nas fêmeas do grupo 02 de macaco-prego

Para averiguação dos efeitos do tratamento de CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego, foram calculadas as médias e os desvios padrões (\pm EPM) dos dados fisiológicos e comportamentais monitorados nas fêmeas do grupo 02 (n=6). Vale lembrar que as fêmeas que compuseram o grupo 02 receberam 05 administrações consecutivas de CHC, sendo 01 administração na fase 2 ou CHC (21 dias); 03 administrações na fase 3 ou tratamento 01 (63 dias) e 01 administração na fase 4 ou intervalo 01 (21 dias) (Figura 10).

Tanto os dados fisiológicos quanto os comportamentais foram analisados estatisticamente via de Análise de Variância Multivariada (MANOVA). Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste *Post Hoc Tukey*. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software IBM® *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 20 pela aplicação dos procedimentos. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando obtivemos valores de $p \leq 0,05$.

Para um melhor entendimento dos efeitos do contraceptivo hormonal nas fêmeas de macaco-prego, os dados fisiológicos e comportamentais foram plotados em duas fases distintas, ou seja, fase 1 – denominada de Linha de Base (21 dias) – e fase 2 – do Contraceptivo Hormonal Combinado (105 dias). A fase de CHC está representada pelos resultados das 05 administrações consecutivas do CHC. Desta forma, é possível visualizar a apresentação temporal do tratamento de CHC ao longo dos 05 ciclos menstruais consecutivos menstruais – Figura 10. A análise dos dados foi realizada pelas comparações entre as médias das fases LB com as 05 administrações de CHC. No entanto, não foram feitas comparações das médias entre as administrações do CHC, pois o objetivo foi avaliar os parâmetros fisiológicos e comportamentais em duas fases distintas, ou seja, na fase LB (sem efeito de CHC) e CHC (com efeito do CHC).

Os dados dos comportamentos não-sexuais foram analisados em média (\pm EPM) do tempo em horas apresentados para cada fêmea monitorada, e as médias estão apresentadas de acordo com porcentagem do tempo gasto para cada categoria comportamental. Já o comportamento sexual foi analisado de acordo com a frequência de todas as expressões apresentadas por cada fêmea destes comportamentos.



CHC=Contraceptivo Hormonal Combinado

Adm.=Administração

*A cada ± 10 dias

**0,10 ml de CHC adm. a cada 21 dias

Figura 10- Delineamento experimental do tratamento prolongado de CHC no grupo 02 das fêmeas de macacos-prego (n=6).

5.5.2. Análises de dados do tratamento de testosterona associado ao CHC

Para averiguação dos efeitos do tratamento de testosterona associado ao CHC foram calculadas as médias (\pm EPM) para os grupos 01 (n=6) e 02 (n=6) na fase 1 (linha de base); fase 2 (CHC); fase 3 (Tratamento 01): T+CHC no grupo 01; e placebo grupo 02; fase 4 (Intervalo 01): apenas CHC em ambos os grupos; fase 5 (Tratamento 02): T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01; e por último, fase 6 (Intervalo 02) (apenas CHC em ambos os grupos). Ressalta-se que, na análise dos efeitos prolongados, foram tratados os dados referentes à fase 4 para o grupo 01 e os dados da fase 6 para o grupo 02.

Na análise do comportamento não-sexual foram calculadas as médias em horas de cada categoria comportamental observada ao longo de todas as fases experimentais estudadas, porém a apresentação dos dados foi feita pela porcentagem do tempo gastos em horas para cada um dos comportamentos observados nas fêmeas. As expressões do comportamento sexual foram plotadas e analisadas em uma única categoria denominada de comportamento sexual.

Ademais, via cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, foram analisadas as possíveis correlações dos dados hormonais (E2, E1, testosterona, DHT e cortisol) aos aspectos comportamentais ao longo das fases experimentais. Para análise destas correlações, os dados comportamentais foram plotados em duas categorias comportamentos não sexuais e sexuais.

Tanto os dados fisiológicos como os comportamentais foram analisados estatisticamente via MANOVA. Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste *Post Hoc de Tukey*. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software IBM® SPSS versão 20 pela aplicação dos procedimentos. E as médias foram consideradas significativamente diferentes quando obtivemos valor de $p \leq 0,05$.

5.5.3. Análises de dados do tratamento testosterona associado ao CHC nas fêmeas jovens e adultas

Nesta seção, para a análise estatística os dados foram analisados e descritos em dois grupos distintos, que foram segregados levando-se em consideração o fator idade das fêmeas estudadas. Sendo assim, as fêmeas foram divididas em um grupo de fêmeas jovens e outro de fêmeas adultas (Tabela 01). Para fins da análise estatística foram calculadas as médias (\pm EPM) dos dados fisiológicos e comportamentais em 4 fases distintas denominadas de LB (Linha de Base); CHC (tratamento com CHC); TT (tratamento de T+CHC) e WO (*Wash-out* – intervalo após o tratamento de testosterona).

Os dados fisiológicos e comportamentais foram analisados estatisticamente via Análise de Variância Multivariada (MANOVA). Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste Post Hoc de Tukey. O mesmo pacote estatístico anteriormente mencionado para a análise dos demais dados foi utilizado (SPSS, versão 20) e da mesma forma, as médias foram consideradas significativamente diferentes quando foram obtidos valores de $p \leq 0,05$.

Para melhor visualização dos dados, serão mencionados separadamente a os resultados e a discussão para cada objetivo específico mencionado anteriormente. Em respeito à ordem cronológica do delineamento experimental, primeiramente, serão apresentados o tratamento isolado do CHC nos parâmetros fisiológicos e comportamentais; em seguida, os resultados do tratamento associado entre T+CHC; e, por último, os resultados analisados baseados na idade das fêmeas de macacos-prego.

6. EFEITOS DO TRATAMENTO DE CHC SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DAS FÊMEAS DE MACACO-PREGO

Nesta sessão serão apresentados os resultados e a discussão referentes ao objetivo específico de analisar os efeitos do tratamento de CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego.

6.1. Resultados dos efeitos do CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego

6.1.1. Parâmetros fisiológicos

O tratamento com CHC promoveu alterações nos parâmetros fisiológicos das fêmeas de macacos-prego ($F_{1,61}=5.09$; $p<0.001$). É possível observar reduções de E1 nas fases de administrações de CHC ($F_{1,61}=6.95$; $p=0.002$) (Figura 11-A); aumento de testosterona a partir da 2ª administração de CHC ($F_{1,61}=3.95$; $p=0.03$) (Figura 11-B); e redução do cortisol na 1ª administração de CHC, com seguidos aumentos nas demais administrações ($F_{1,61}=9.77$; $p<0.001$) (Figura 11-C). Todavia, as concentrações de E2 e DHT não sofreram alterações entre as fases experimentais ($p>0.05$) (Tabela 4).

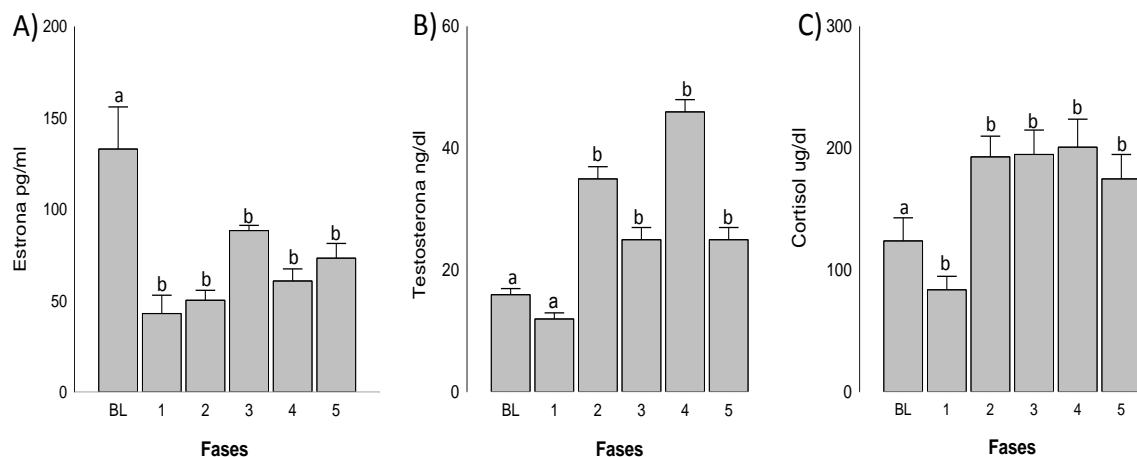


Figura 11- Média (+EPM) A) estrona (pg/ml); B) testosterona (ng/dl) e C) cortisol (ug/dl) nas fases de Linha de Base (BL) e fase 1, 2, 3, 4 e 5 (administrações CHC) em fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6). As letras a, b: indicam que $p<0,05$ entre a fase BL vs as administrações de CHC $p<0,05$.

Podem ser verificadas alterações nos fatores de coagulação sanguínea, pois houve uma redução dos tempos de TP durante o tratamento com CHC ($F_{1,61}=91.77$; $p<0.001$); já os tempos de TTPa apresentam reduções nas administrações 1 e 2, seguido de aumentos nas administrações seguintes ($F_{1,61}=42.94$; $p<0.001$). Também foi verificado aumento no número de plaquetas nas 1^a, 2^a, 3^a, e 4^a administrações ($F_{1,61}=450.92$; $p<0.05$) (Figura 12). No entanto, os demais parâmetros fisiológicos não apresentaram diferenças com as administrações de CHC (Tabela 4).

Tabela 4- Média (\pm EPM) e nível de significância das variáveis fisiológicas E2 (estradiol); DHT (dihidrotestosterona); Fibri. (fibrinogênio); HG (hemoglobina), Lip. (lipídios totais), Glo. (globulina) e Gona. (gonadotrofina coriônica) analisadas na fase de Linha de Base (BL) e administrações de CHC (1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a) em fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).

Variáveis	LB	Administração de CHC				
		1 ^a adm.	2 ^a adm.	3 ^a adm.	4 ^a adm.	5 ^a adm.
E2 (mg/dl)	144 \pm 50	184 \pm 34	236 \pm 34	201 \pm 37	270 \pm 34	216 \pm 32
DHT (pg/ml)	168 \pm 7	169 \pm 5	193 \pm 16	209 \pm 10	169 \pm 10	159 \pm 7
Fibri. (mg/dl)	219 \pm 17	228 \pm 14	193 \pm 16	225 \pm 61	200 \pm 14	203 \pm 13
HG (mg/dl)	13 \pm 1	13 \pm 0,5	12 \pm 0,2	12 \pm 0,4	13 \pm 0,2	14 \pm 0,1
Lip. (mg/dl)	473 \pm 27	441 \pm 20	459 \pm 18	532 \pm 39	487 \pm 46	430 \pm 16
SHBG (Nmol/l)	2	2	2	2	2	2
Gona (UI/ml)	1	1	1	1	1	1

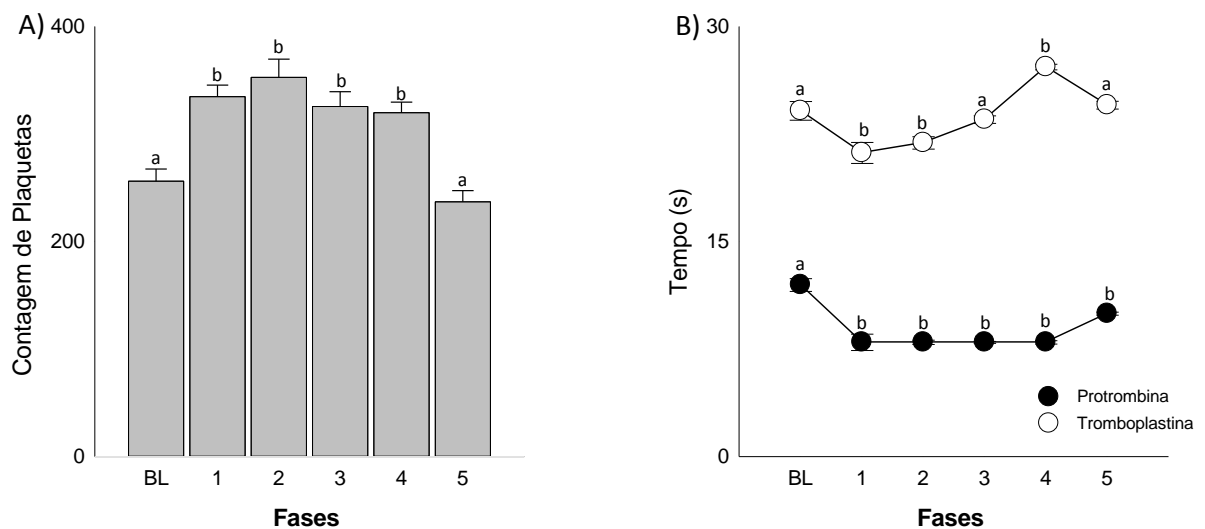


Figura 12- Média (\pm EPM) A) número de plaquetas (5 mil/nm³) e B) tempos (segundos) de protrombina e tromboplastina nas fases de Linha de Base (BL) e administrações de CHC (1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a) em fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6). As letras a, b: indicam que $p<0,05$ entre a fase vs as administrações de CHC.

6.1.2. Efeitos do CHC sobre os comportamentos não-sexuais nas fêmeas de macaco-prego

Na Tabela 5, estão ilustrados os resultados das expressões do comportamento não-sexual das fêmeas de macaco-prego nas duas fases experimental (LB e CH). Pode ser observado que não houve mudanças no comportamento não-sexual de catação ($F_{1,67}=1,08$ $p=0,30$); estereotipias ($F_{1,67}=2,85$ $p=0,09$); agonístico ($F_{1,67}=0,27$ $p=0,60$) durante as administrações de CHC.

Tabela 5- Média (\pm EPM) da duração em horas dos comportamentos não sexuais (catação, estereotipia e agonístico) nas fases Linha de Base (LB) e nas administrações CHC (1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a) (n=6) registrados nas fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).

Não-Sexual	LB	Administrações (CHC)				
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Catação	26 \pm 15	20 \pm 07	23 \pm 09	90 \pm 39	19 \pm 12	4 \pm 09
Estereotipia	18 \pm 09	11 \pm 06	15 \pm 08	4 \pm 15	13 \pm 06	43 \pm 18
Agonístico	14 \pm 10	18 \pm 14	27 \pm 13	30 \pm 18	68 \pm 28	42 \pm 18

6.1.3. Efeitos do CHC sobre os comportamentos sexuais nas fêmeas de macaco-prego

Conforme apresentado na Figura 13, não foi observada mudança na frequência do comportamento sexual das fêmeas de macaco-prego durante as fases de linha de base e as administrações de CHC ($F_{5,64}=0,67$; $p=0,64$).

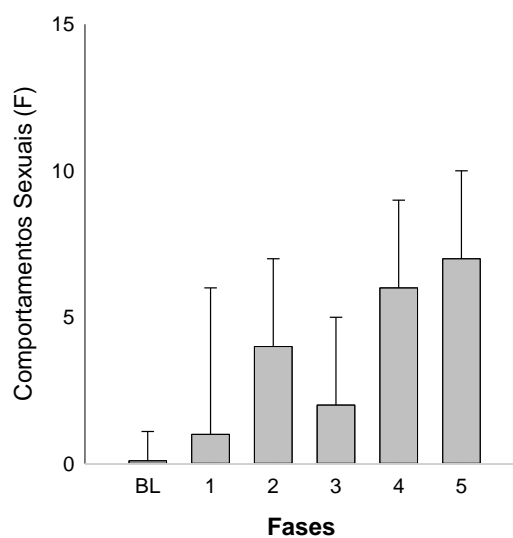


Figura 13- Média (\pm EPM) da frequência dos comportamentos sexuais nas fases Linha de Base (BL) e administrações de CHC (1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a) em fêmeas de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).

6.2. Discussão

Efeitos do CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas de macaco-prego

Os parâmetros fisiológicos das fêmeas de macacos-prego sofreram mudanças durante a fase de administração de CHC, pois os resultados apontaram reduções nas concentrações de E1 e aumento nas de testosterona e cortisol. Na literatura, é relatado que as usuárias de CHC apresentam mudanças na flutuação dos esteroides sexuais femininos (Chandra *et al.*, 2002; Margolis *et al.*, 2007), redução na concentração de testosterona (Zimmerman *et al.*, 2014; Wallwiener *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2013) e aumento da concentração de cortisol (Denson *et al.*, 2012). Sobre as concentrações de E1 e testosterona, possivelmente, tais efeitos acontecem em decorrência do *feedback* negativo na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Chandra *et al.*, 2002; Margolis *et al.*, 2007).

De acordo com o que o fabricante do contraceptivo o Perlutan[®] usado neste estudo indica na bula, especificamente, na seção sobre farmacodinâmica a dose do gestágeno (DHPA 150 mg) tem como mecanismo o efeito anovulatório por supressão da secreção de gonadotrofinas hipofisárias, a qual compromete a secreção endógena dos esteroides sexuais femininos, tornando as concentrações destes hormônios constantes, o que conseqüentemente, afeta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Dessa forma, as administrações de Perlutan[®], nas fêmeas testadas, também promoveram efeitos anovulatórios. Nossos resultados demonstraram que os níveis de E1 sofreram redução entre a fase de linha de base (133 pg/ml) e nas administrações do CHC (de 43 a 88 pg/ml). Já as concentrações de E2 mantiveram-se altas e praticamente constantes ao longo das administrações do CHC (184 a 270 mg/dl). Em mulheres, a função primordial dos contraceptivos hormonais é manter as taxas endógenas dos estrógenos e progestágenos constantes, o que impede a ovulação (Mishell *et al.*, 1977; Vandever *et al.*, 2008; Kallio *et al.*, 2013)

Sabe-se que, assim como nas mulheres, as fases do ciclo menstrual das fêmeas de macacos-prego também sofrem alterações das concentrações de E2 (Nagle *et al.*, 1979; Fragaszy *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2005), já que no início da fase folicular, ou seja, nos primeiros dias do ciclo menstrual (0 ao 4^o dia) há uma pequena elevação da concentração de E2 (70-100 pg/ml), e, à medida que se

aproxima do meio do ciclo menstrual (7^o ao 9^o dia), estes valores apresentam uma significativa elevação (503- 530 pg/ml). Já nos últimos dias (14^a ao 21^a), são registrados as menores concentrações de E2 (58 pg/ml) (Nagle *et al.*, 1979). Diante dessas informações, podemos concluir que as concentrações de E2 estiveram elevadas e constantes ao longo de todas as fases estudadas, não representando assim as flutuações do padrão característico do ciclo menstrual do gênero *Sapajus*. Neste sentido, a nossa hipótese que o tratamento de CHC promove mudanças fisiológicas foi alcançada, visto que as administrações do CHC, pelo menos, promoveram mudanças na fisiologia hormonal destas fêmeas de macacos-prego.

Cabe mencionar que as mudanças na fisiologia hormonal feminina são necessárias para o impedimento do crescimento e do amadurecimento folicular, o que compromete a ovulação, que é o intuito das usuárias submetidas à ação destes fármacos (Vandever *et al.*, 2008). Ressalta-se ainda que o uso dos contraceptivos hormonais provoca também um desarranjo na fisiologia dos esteroides sexuais masculinos, por exemplo, redução acentuada de testosterona (Wallwiener *et al.*, 2010; Edwards *et al.*, 2009; Sanders *et al.*, 2001; Zimmerman *et al.*, 2014).

É conhecido que a testosterona tem papel importante na manutenção da fertilidade feminina, pois estimula o recrutamento dos folículos durante os seus estágios iniciais (Miller e Maner, 2010; Kim *et al.*, 2011). Estudos experimentais que utilizaram macacos rhesus sugeriram que os androgênios ampliam o efeito do FSH na foliculogênese, e tem demonstrado que a administração de testosterona nesses animais aumenta o número de receptores do FSH nas membranas das células da granulosa, o que por sua vez, estimula o crescimento folicular inicial (Casare *et al.*, 2013). Além do mais, durante o ciclo menstrual, houve elevação de testosterona, que acontece na fase pré-ovulatória, ou seja, no período que antecede a ovulação (Wallwiener *et al.*, 2010). Sendo assim, pode-se considerar que a redução de testosterona é um efeito anovulatório do CHC (Zimmerman *et al.*, 2014).

Diferentemente das mulheres, nas fêmeas de macacos-prego, não foram verificadas reduções das concentrações de testosterona total nas fases de administrações do CHC. Porém, na primeira administração do contraceptivo, houve declínio numérico da concentração de testosterona; todavia, nas demais administrações de CHC, foram verificados aumentos significativos (Figura 11 e Tabela 4). Acreditamos que este resultado seja em decorrência da administração intranasal de testosterona no grupo experimental, ou seja, naquelas fêmeas que,

nesta fase do experimento, receberam T+CHC. Desta forma, é possível que o delineamento experimental realizado neste estudo tenha influenciado no resultado das concentrações de testosterona; pois, mesmo quando as fêmeas de macacos-prego foram tratadas apenas com CHC, sem tratamento de testosterona, houve elevação deste androgênio. Nesse sentido, a proximidade de manutenção das fêmeas testadas que ocupavam os mesmos recintos ou fisicamente próximos entre si, pode ter favorecido a utilização de pistas químicas entre os animais. Sendo assim, possivelmente, o declínio de testosterona teria permanecido também nas demais administrações do CHC.

O declínio na concentração de testosterona influencia as taxas de outros esteroides sexuais, por exemplo, DHT e E2, e conseqüentemente, as funções sexuais femininas são diretamente afetadas (Wallwiener *et al.*, 2010). A redução da testosterona, em usuárias de contraceptivo hormonal, ocorre devido à presença dos esteroides sexuais femininos (estrógeno e progesterona) na composição dos contraceptivos hormonais combinados. A presença desses esteroides desencadeia o *feedback* negativo hipotalâmico, em conseqüência afeta a hipófise, impedindo assim a secreção dos hormônios FSH e LH (Edwards *et al.*, 2009). Além disso, um outro efeito destes esteroides sintéticos é o aumento na síntese hepática da SHBG (Zimmerman *et al.*, 2014; Wallwiener *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2013). Sabe-se que quanto maior a produção de SHBG, menor a concentração circulante de testosterona (Ekholm *et al.*, 2014), pois esta possui forte ligação pela testosterona, o que diminui a biodisponibilidade e atividade deste androgênio (Wiegratz *et al.*, 2013; Ronde *et al.*, 2005).

Normalmente, 95% testosterona produzida pelo organismo feminino está sob forma a inativa ou ligada às proteínas SHBG e à albumina. Em torno de 70% da testosterona total encontra-se ligada à SHBG e 25% dela está ligada à albumina. Apenas 0,5% da testosterona encontram-se em forma totalmente livre ou ativa, o que significa que apenas 0.5% possui suas funções bioativas normais (Speroff *et al.*, 2005). Desta forma, as ligações de testosterona às proteínas tornam as concentrações plasmáticas de testosterona baixas no organismo (Zimmerman *et al.*, 2014; Ekholm *et al.*, 2014, Ronde *et al.*, 2005; White *et al.*, 2006; Westhoff e Kelsey, 2013). No entanto, em termos dos resultados obtidos nas fêmeas de macacos desse estudo, os valores de HG não sofreram alterações significativas, e os de SHBG permaneceram os mesmos em todas as fases experimentais.

Baixas concentrações de testosterona, no organismo feminino, trazem consequências significativas. Entre elas, ocorrem o aumento do risco de anemias (Ferrucci *et al.*, 2006), a sensação diminuída de bem-estar, o humor disfórico (tristeza, depressão, ansiedade e irritabilidade), fadiga, diminuição da libido, ondas de calor, perda óssea, diminuição da força muscular, alterações na cognição e memória, e insônia (Zimmerman *et al.*, 2014; Lobo, 2001; Dennerstein *et al.*, 2013; Glaser *et al.*, 2001). Diante de tais efeitos, faz-se necessário levantar a hipótese de que muitos dos efeitos adversos que são relatados pelas usuárias de contraceptivo hormonal podem estar associados diretamente ao declínio de testosterona, inclusive, o tão importante declínio da libido (Baumeister, 2004; Van Anders e Gray *et al.*, 2010; Fooladi *et al.*, 2014).

Em macacos, não é possível monitorar comportamentos relacionados a humor, tristeza, ansiedade e aumento da satisfação ou do desejo sexual, no entanto, foram analisadas as expressões dos comportamentos sexuais e não sexuais das fêmeas de macacos-prego no intuito de avaliarmos possíveis mudanças no padrão comportamental. Nossa hipótese foi que as administrações de CHC provocariam mudanças sobre os parâmetros comportamentais destas fêmeas. No entanto, isso não foi observado nos resultados, muito embora a duração do comportamento agonístico e a frequência do comportamento sexual tenham apresentado, numericamente, aumentos nas fases de administrações do CHC, estatisticamente não foram diferentes. Diferentemente dos nossos resultados, fêmeas de macaco rhesus (*Macaca sylvanus*), quando tratadas com CHC, apresentaram maior expressão dos comportamentos de auto-limpeza e agonísticos, que são comportamentos relacionados ao aumento da ansiedade e do estresse, os quais foram correlacionados às mudanças fisiológicas causadas pelo tratamento de CHC (Maijer e Semple; 2015). Mulheres usuárias de contraceptivo hormonal também apresentam alterações comportamentais, que são, muitas vezes, decorrentes das mudanças hormonais (Roberts *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado que até mesmo a escolha de parceiros sexuais, ou seja, a seleção sexual, pode ser alterada pelo uso dos métodos hormonais (Little *et al.*, 2013). Normalmente, mulheres submetidas a testes de escolha por fenótipos masculinos apresentam preferências por características mais masculinas como, por exemplo, faces assimétricas (DeBruine *et al.*, 2010; Little *et al.*, 2012), voz mais grave (Pisanski *et al.*, 2014) e sobrancelhas mais grossas e com protrusão (Little *et*

al., 2013). Tais características são, comumente, correlacionadas às maiores concentrações de testosterona, ou seja, homens com tais características apresentam concentrações maiores deste andrógeno. De acordo com Pisanski *et al.* (2014); DeBruine *et al.* (2010); Little *et al.* (2012), há ainda correlação destes resultados com a fase do ciclo menstrual, pois, na fase folicular, quando as concentrações de E2 estão elevadas, as participantes apresentaram maior preferência pelas faces e vozes com características mais masculinas. Entretanto, tais resultados não são observados em usuárias de métodos contraceptivos hormonais, na medida em que elas não apresentaram preferências ou escolha por tais características (Little *et al.*, 2013). Desta forma, é possível que as escolhas das usuárias de contraceptivo hormonal por parceiros sejam influenciadas por alterações nas concentrações hormonais como, por exemplo, o declínio da testosterona (Zimmerman *et al.*, 2014).

Em usuárias de CHC, são observadas mudanças nos padrões comportamentais relacionados ao comportamento sexual, por exemplo, há relatos do baixo interesse, desejo e satisfação sexual das mulheres (Roberts *et al.*, 2013). Há também mudanças comportamentais relacionadas ao bem-estar, como aumento da ansiedade, estresse e alterações no humor (Wallwiener *et al.*, 2010). Alterações de humor, ansiedade e estresse são também decorrentes do aumento de cortisol nas usuárias de CHC (Denson *et al.*, 2012; Boisseau *et al.*, 2013). Apesar disso, em mulheres, as alterações na concentração de cortisol também podem ser justificadas por aspectos relativos a sua vida social (Berger *et al.*, 2016) e pelo ciclo circadiano (Juster *et al.*, 2016). É importante destacar que métodos contraceptivos hormonais podem promover também mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que estimula a produção de cortisol, sendo este o motivo para as altas concentrações de cortisol verificadas em usuárias de contraceptivo (Boisseau *et al.*, 2013). Nas fêmeas de macaco-prego também foram encontrados aumentos das concentrações de cortisol nas fases de administração do CHC (Figura 11-C).

Em suma, é possível observar que o uso de CHC está diretamente correlacionado a vários efeitos colaterais, que promovem mudanças no perfil hormonal e comportamental das usuárias. Estudos têm mostrado que os CHC são também relacionados a outras graves mudanças fisiológicas, tais como: aumento na concentração de lipídios e HG (Mawet *et al.*, 2015), e alterações nos fatores ligados à coagulação sanguínea (Ashraf *et al.*, 2012; Dragoman, 2014). Neste contexto, é

importante destacar que, nas fêmeas de macaco-prego, foram verificadas alterações nos fatores de coagulação sanguínea, todavia, não foram observadas mudanças nos parâmetros de HG e lipídios.

Nas mulheres, é comum que o estrógeno sintético, presente na composição dos contraceptivos hormonais, promova o aumento de HG e mudanças moleculares que comprometem o metabolismo dos lipídios (Mawet *et al.*, 2015). Especula-se que administração exógena de estrógeno pode suprimir a oxidação lipídica, devido à ligação na via hepática aos receptores do tipo alfa “ α ” (Herrington, 2003). A ligação do estrógeno sintético aos receptores α desencadeia reações, que contribuem na modificação do metabolismo das lipoproteínas e, conseqüentemente, causa um aumento de colesterol total e triglicerídeos (Mawet *et al.*, 2015). Segundo Asare *et al.* (2014), o uso de CH, independentemente da via de utilização, está associado ao aumento de graves alterações fisiológicas, como, por exemplo, o aumento da pressão arterial, do peso, do colesterol total, das lipoproteínas (HDL e LDL) e do risco para as doenças cardiovasculares.

Cabe ainda mencionar que, mesmo em pequenas doses, o estrógeno, presente nos CHC, também pode provocar mudanças nos fatores de coagulação com a predisposição da formação de trombo venoso (Ashraf *et al.*, 2012; Dragoman, 2014). Neste sentido, foram avaliados os fatores de coagulação sanguínea das fêmeas de macaco-prego, e os resultados revelaram um aumento no número de plaquetas, mas ao mesmo tempo redução nos tempos de TP e TTPa. Isso configura que houve mudanças nos parâmetros hemolíticos, possivelmente, decorrente do tratamento de CHC nas fêmeas de macacos-prego.

Distúrbios vasculares estão normalmente associados às alterações nos fatores de coagulação sanguínea, e são diagnosticados pelo aumento do número de plaquetas e as mudanças nos TP e TTPa (Ashraf *et al.*, 2012). A excessiva ativação de fatores de coagulação favorece a formação do coágulo de fibrina ou o aumento de fibrinogênio no sítio endotelial (Monroe e Hoffman 2014) o que pode ocasionar no desenvolvimento da trombose venosa (Ashraf *et al.*, 2012; Dragoman, 2014). Já é sabido que o uso de CH em mulheres está associado a distúrbios nos fatores de coagulação sanguínea (Sandset *et al.*, 2009; Lidegaard *et al.*, 2012; Manzoli *et al.*, 2012), entretanto, em termos do presente estudo não foram registradas alterações nos valores de fibrinogênio nas fêmeas de macaco-prego submetida ao tratamento com CHC.

Ressalta-se que, nas macacas do presente estudo, o número de plaquetas permaneceu acima do padrão até a quarta administração do CHC, porém na quinta administração os valores sofreram uma redução. Este resultado é semelhante ao obtido em mulheres, nas quais há risco maior de trombose venosa nos três primeiros meses do uso de contraceptivo hormonal (Vlieg *et al.*, 2009, Vlieg and Rosendaal, 2014). Este risco é reduzido após o 5º mês de uso contínuo deste medicamento (Vlieg and Rosendaal, 2014).

É sabido ainda que os estrógenos exógenos, presentes na composição dos CHC, interagem com receptores específicos das células endoteliais responsáveis por diversas ações reguladoras nos componentes da parede vascular (Cid *et al.*, 2002; Khader *et al.*, 2003; Plu-Bureau *et al.*, 2013; Ziller *et al.*, 2014). Desta forma, há ações sobre fatores da coagulação como, por exemplos, aumento da trombina e da fibrina, redução de inibidores da coagulação (como antitrombina, proteína C e inibidor do fator tecidual) e redução do inibidor dos ativadores do plasminogênio, que pode promover um mecanismo complexo levando à ocorrência de trombozes (Rosling *et al.*, 1999; Rosendaal *et al.* 2002; Vlieg e Rosendaal, 2014).

Diante dos sérios riscos que os métodos contraceptivos hormonais trazem ao organismo feminino, especialmente quando em uso crônico (Lidegaard e Kreiner 2002; Lidegaard *et al.*, 2012), pesquisas científicas têm buscado, cada vez mais, o aprimoramento tecnológico dos métodos hormonais convencionais (Junge *et al.*, 2011; Bahamondes e Bahamondes, 2014). Nesta perspectiva, há vários métodos sendo desenvolvidos no intuito de reduzir efeitos adversos e colaterais, garantindo eficácia e eficiência na contracepção (Bahamondes e Bahamondes, 2014).

Atualmente, a indústria farmacêutica tem introduzido novas formulações destinadas a aumentar a tolerabilidade e a reduzir os efeitos adversos (Bahamondes e Bahamondes, 2014) como, por exemplo, compostos naturais de estrógenos (E2 valerate) com intuito de reduzir o risco das doenças trombóticas (Visser e Coelingh-Bennink, 2008; Fruzzetti *et al.*, 2012); novas fórmulas hormonais com diferentes mecanismos de ação dos existentes (Africander *et al.*, 2011); e métodos com um novo sistema de entrega ou ligação a receptores específicos, que poderão reduzir efeitos gerais causados pelos métodos convencionais (Africander *et al.*, 2011; Sitruk-Ware *et al.*, 2013; Royer *et al.*, 2014). Há ainda métodos anticoncepcionais sendo desenvolvidos, que incluem a combinação de um agente antirretroviral. Esse procedimento tem dois objetivos: o da contracepção e o da

proteção contra doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) (Sitruk-Ware *et al.*, 2013). Estes novos métodos anticoncepcionais, sejam hormonais ou não, irão permitir às usuárias o acesso a uma gama ampliada de métodos de contraceptivos (Bahamondes e Bahamondes, 2014), porém ainda precisam ser mais estudados.

Neste sentido, as fêmeas de macaco-prego podem ser um modelo animal importante, para estudos sobre o tema na medida em que os resultados aqui obtidos demonstram que, fisiologicamente, elas apresentam alterações semelhantes às daquelas, que também são encontradas nas mulheres (Ashraf *et al.*, 2012). Na realidade, estudos anteriores já tem advogado a favor do uso de fêmeas de macaco-prego como um modelo de excelência para estudos que envolvam parâmetros fisiológicos e neuroendócrinos relacionados à reprodução (Ortiz *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2007; Carnegie *et al.*, 2011). Um dos principais motivos é a presença do ciclo ovariano do tipo menstrual que tem a duração média de ± 20 dias (Nagle *et al.*, 1979; Fragaszy *et al.*, 2004) e, assim como nas mulheres, há também a ação dos estrógenos na fase folicular e dos progestágenos na fase lútea (Fragaszy *et al.*, 2004; Carnegie *et al.*, 2005).

Em conclusão, o estudo em questão, o uso de CHC afetou os parâmetros de coagulação (número de plaquetas e tempos de TP e TTPa) em fêmeas de macaco-prego. Estes resultados corroboram o que já foi observado em mulheres, reforçando assim a necessidade de novos estudos que busquem minimizar efeitos adversos dos métodos contraceptivos hormonais convencionais. Por esta razão, a indústria farmacêutica vem buscando implementar métodos inovadores para a contracepção. Assim, enfatiza-se a importância das fêmeas da espécie *Sapajus libidinosus* como modelo adequado para tais estudos, uma vez que elas são amplamente encontradas na América do Sul; não estão ameaçadas de extinção, são de fácil manutenção em cativeiro e são as únicas primatas neotropicais para as quais está descrito um ciclo ovariano do tipo menstrual bem similar às mulheres.

7. EFEITOS DO TRATAMENTO PROLONGADO DE TESTOSTERONA ASSOCIADA AO CHC SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DAS FÊMEAS DE MACACO-PREGO

Nesta sessão, serão apresentados os resultados e a discussão do objetivo específico de analisar os efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas adultas de macaco-prego.

7.1. Resultados dos efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos das fêmeas de macaco-prego

7.1.1. Estradiol e Estrona

Há diferenças entre os grupos 01 e 02 para o E2 nas fases 1 ($p=0,05$) e 2 ($p=0,008$), uma vez que os valores deste esteroide estiveram maiores no grupo 01 ($p=0,04$); 5 ($p=0,03$) e 6 ($p=0,01$) (Figura 14).

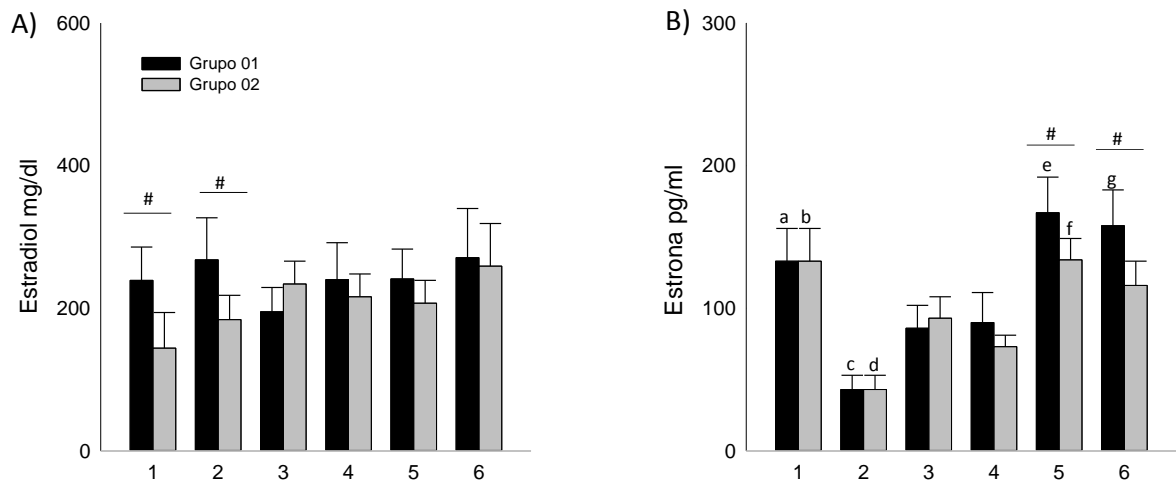


Figura 14- Média (\pm EPM) A) estradiol (E2) (mg/dl) e B) estrona (E1) (pg/ml) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) ($n=12$).

$p<0,05$ grupo 01 vs grupo 02 nas fases indicadas

^a $p<0,05$ fase 1 vs 2, 3 e 4 no grupo 01

^b $p<0,05$ fase 1 vs 2, 3 e 4 no grupo 02

^c $p<0,05$ fase 2 vs todas as demais no grupo 01

^d $p<0,05$ fase 2 vs todas as demais no grupo 02

^e $p<0,05$ fase 5 vs 2, 3 e 4 no grupo 01

^f $p<0,05$ fase 5 vs 2, 3 e 4 no grupo 02

^g $p<0,05$ fase 6 vs 2, 3 e 4 no grupo 01.

A concentração de E2 dos grupos 01 e 02 não apresentaram diferenças nas distintas fases experimentais ($p > 0,05$) (Figura 14-A). Já as concentrações de E1 do grupo 01 apresentaram diferenças entre as fases experimentais ($F_{5,95}=3,10$; $p=0,01$), observando-se uma redução deste esteroide nas fases 2, 3 e 4, e aumento nas fases 5 e 6 ($p < 0,05$) (Figura 14-B). No grupo 02, também foram registradas diferenças na concentração de E1 durante as fases experimentais ($F_{5,112}=2,7$; $p=0,03$), já que houve reduções deste esteroide nas fases 2, 3 e 4 ($p < 0,05$) (Figura 14-B).

7.1.2. Testosterona e DHT

Na Figura 15 estão demonstrados os dados referentes as concentrações dos androgênios (testosterona e DHT) para as fêmeas dos grupos 01 e 02. É possível observar que as concentrações de testosterona foram maiores no grupo 01 nas fases 3 ($p=0,001$) e 4 ($p=0,02$) e, no grupo 02, nas fases 5 ($p=0,001$) e 6 ($p=0,05$) (Figura-A). Para as concentrações de DHT, foram encontrados valores maiores no grupo 01 na fase 3 ($p=0,02$) e no grupo 02 nas fases experimentais 5 ($p=0,03$) e 6 ($p=0,05$) (Figura 15-B).

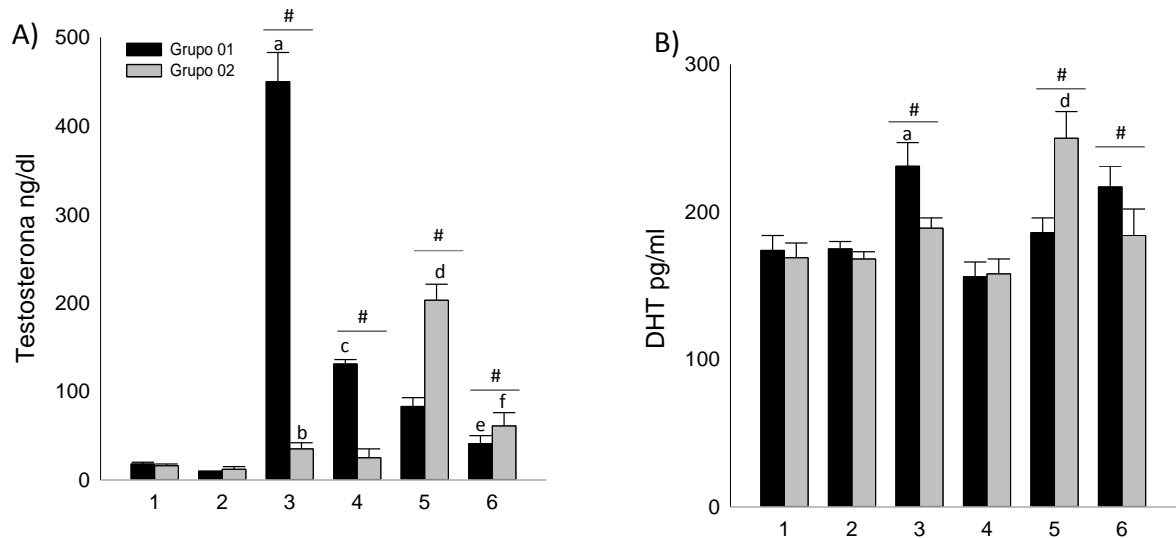


Figura 15- Média (\pm EPM) A) testosterona (pg/ml) e B) DHT (pg/ml) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) ($n=12$).

^a $p < 0,05$ fase 3 vs todas as demais no grupo 01

^b $p < 0,05$ fase 3 vs 1, 2, 5 e 6 no grupo 02

^c $p < 0,05$ fase 4 vs todas demais no grupo 01

^d $p < 0,05$ fase 5 vs todas demais no grupo 02

^e $p < 0,05$ fase 6 vs todas demais no grupo 01

^f $p < 0,05$ fase 6 vs todas demais no grupo 01

$p < 0,05$ grupo 01 vs grupo 02 nas fases indicadas.

No grupo 01, foram registradas diferenças entre as concentrações de testosterona ($F_{5,95}=12,47$; $p=0,001$) e DHT ($F_{5,95}=3,64$; $p=0,01$) ao longo das fases experimentais, pois houve um aumento de testosterona nas fases 3, 4 e 5 ($p<0,05$) (Figura 15-A). Já as concentrações de DHT do grupo 01 apresentaram um aumento nas fases 3 e 6 (Figura-B). Para o grupo 02, também foram verificadas diferenças nas concentrações de testosterona ($F_{5,112}=13,58$; $p=0,001$) e DHT ($F_{5,112}=2,54$; $p=0,02$), visto que houve um aumento nas concentrações de testosterona nas fases 3, 5 e 6 ($p<0,05$) (Figura 15-A) e de DHT na fase 05 em relação às demais ($p<0,05$) (Figura 15-B).

7.1.3. Cortisol

Conforme descrito na Figura 16, há diferenças nas concentrações de cortisol dos grupos 01 e 02 nas fases 1, 3 e 6 ($p<0,05$), pois foi possível verificar maiores concentrações no grupo 02 nas fases 1 e 3, e no grupo 01 na fase 6. Nesta mesma figura, pode ser observado que o grupo 01 apresentou aumentos do cortisol nas fases 3, 4, 5 e 6 ($F_{5,95}=2,99$; $p=0,05$). Já no grupo 02, houve redução do cortisol na fase 2 e aumentos consecutivos nas fases 3, 4, 5 e 6 ($F_{5,112}=2,40$; $p=0,05$).

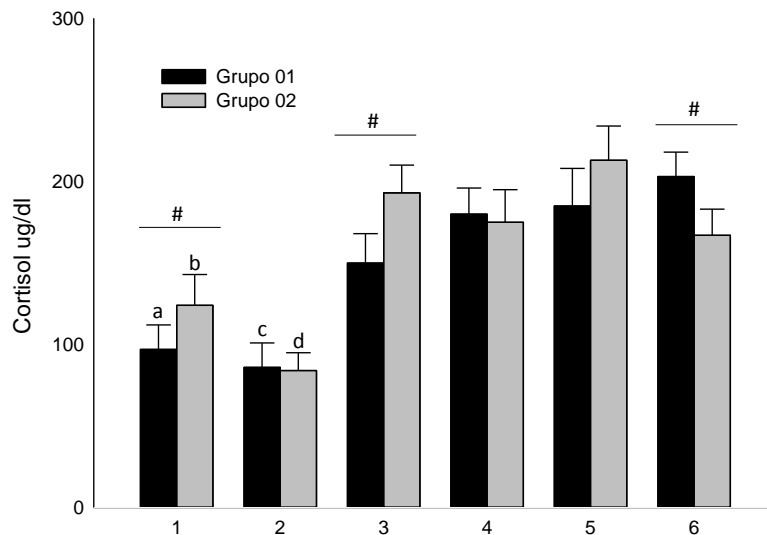


Figura 16- Média (\pm EPM) cortisol (ug/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).

^a $p<0,05$ fase 1 vs 3, 4, 5 e 6 no grupo 01

^b $p<0,05$ fase 2 vs todas as demais no grupo 02

^c $p<0,05$ fase 2 vs 3, 4, 5 e 6 no grupo 01

^d $p<0,05$ fase 2 vs todas as demais 02

$p<0,05$ grupo1 vs grupo 02 nas fases indicadas.

7.1.4. Gonadotrofinas

Nos dois grupos 01 e 02, as concentrações de gonadotrofinas permaneceram constantes ao longo de todas as fases do experimento, ou seja, 0.1 mUI/ml em todas as fases experimentais para todos os animais observados (

Figura 17).

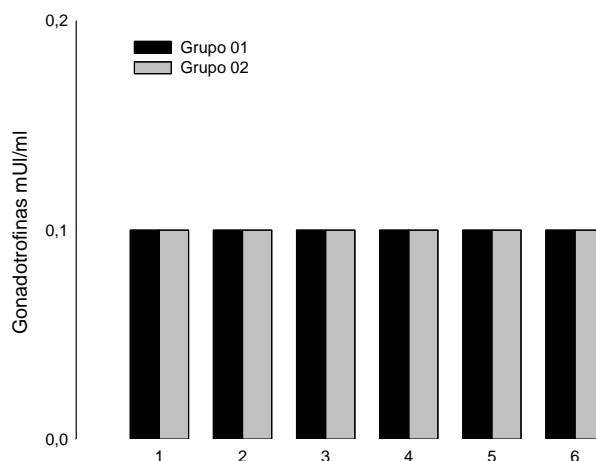


Figura 17- Média (\pm EPM) gonadotrofinas (mUI/ml) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).

7.1.5. Protrombina e Tromboplastina

Foram encontradas diferenças do TTPa entre os grupos 01 e 02, uma vez que foram registrados menores tempos no grupo 02 nas fases 2 ($p=0,001$), 3 ($p=0,03$), fase 4 ($p=0,04$) e 5 ($p=0,05$) (Figura 18-A). No entanto, para o TP foram registradas diferenças entre os grupos apenas nas fases 2 ($p=0,02$), 3 ($p=0,04$) e 6 ($p=0,05$), nas quais o TP formam também maiores no grupo 01 (Figura 18-B).

Nesta figura, ainda é possível observar que o grupo 01 apresentou redução do TTPa ($F_{5,93}=2,18$; $p=0,04$) e TP ($F_{5,93}=11,88$; $p=0,001$) na fase 2, porém há aumentos de ambos os tempos nas fases 4, 5 e 6 (Figura 18-A e B). Já o grupo 02, apresentou redução dos tempos de TTPa ($F_{5,93}=7,13$; $p=0,001$) e TP ($F_{5,93}=14,94$; $p<0,001$) nas fases 2 e 3; no entanto, foram registrados aumentos nas fases experimentais 4, 5 e 6, isto para ambos os tempos dos parâmetros analisados (Figura 18-A e B).

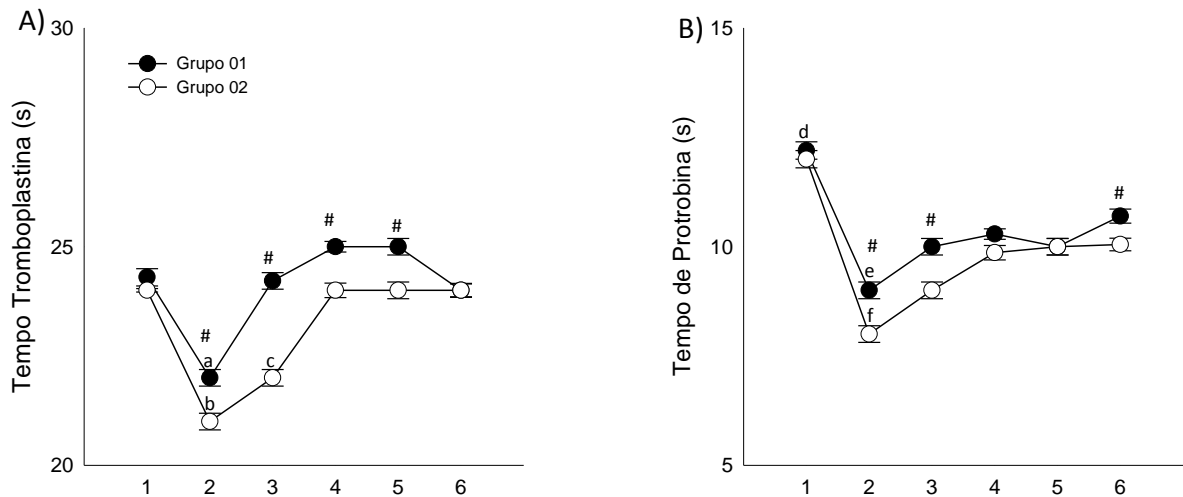


Figura 18- Média (\pm EPM) A) tempos de tromboplastina (s) e B) tempo de protrombina (s) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).

^a p<0,05 fase 2 vs todas as demais fases no grupo 01

^b p<0,05 fase 2 vs todas as demais grupo 02

^c p<0,05 fase 3 vs todas as demais grupo 01

^d p<0,05 fase 1 vs todas as demais para ambos os grupos

^e p<0,05 fase 2 vs todas as demais no grupo 01

^f p<0,05 fase 2 vs todas as demais no grupo 02

#p<0,05 grupo 01 vs grupo 02 nas fases indicadas.

7.1.6. Plaquetas e Fibrinogênio

É possível verificar diferenças no número de plaquetas entre os grupos 01 e 02 ($F_{5, 93}=4,18$; $p=0,003$), pois os valores foram maiores no grupo 02 na fase 03 (Figura 19-A). Todavia, não há diferença nas concentrações de fibrinogênio entre os grupos ($F_{5,93}= 1,08$; $p=0,14$) (Figura 19-B).

Também estão representadas na Figura 19, as médias do grupo 01 e 02 nas diferentes fases experimentais. Desta forma é possível analisar que ambos os grupos 01 ($F_{5,95}=2,27$; $p=0,04$) e 02 ($F_{5,105}=7,22$; $p=0,001$) apresentaram diferenças no número de plaquetas ao longo das fases experimentais. No grupo 01, foram registrados aumentos no número de plaquetas na fase 2, e para o grupo 02 houve aumento nas fases 2 e 3 ($p<0,05$) (Figura 19-A). Em termos das concentrações de fibrinogênio, não foram observadas diferenças para o grupo 01 ($F_{5,95}=0,98$; $p=0,43$), e nem para grupo 02 ($F_{5,105}= 0,57$; $p=0,74$) em nenhuma fase experimental (Figura 19-B).

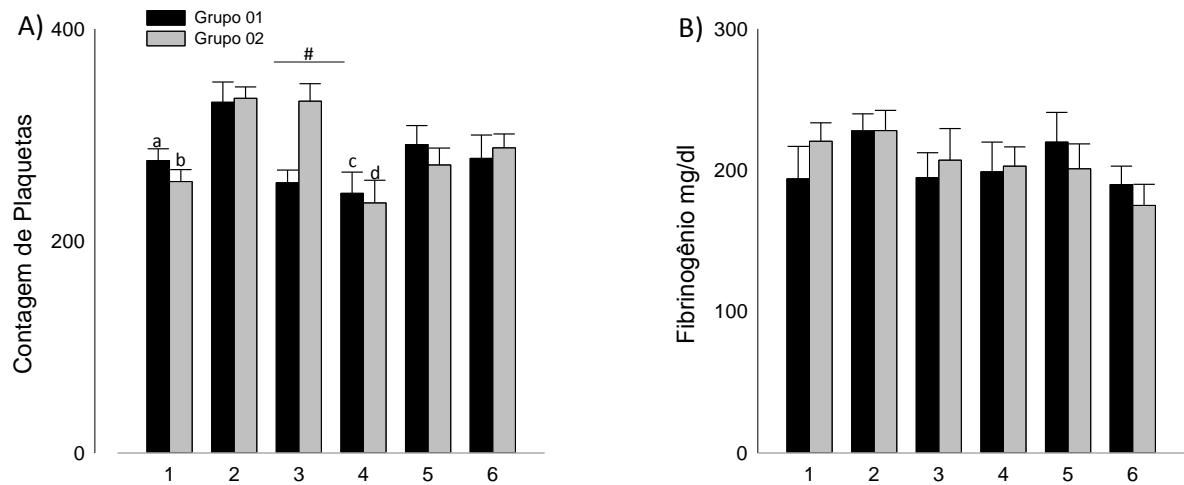


Figura 19- Média (\pm EPM) A) plaquetas (5 mil/nm³) e B) fibrinogênio (mg/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).

^a p<0,05 fase 1 vs 2 no grupo 01

^b p<0,05 fase 1 vs 2 e 3 no grupo 02

^c p<0,05 fase 4 vs 2 e 5 no grupo 01

^d p<0,05 fase 4 vs 2 e 3 no grupo 02

p<0,05 grupo 01 vs grupo 02 nas fases indicadas.

7.1.7. SHBG e Hemoglobina (HG)

As concentrações de SHBG permaneceram constantes e fixas ao longo de todas as fases experimentais, isto é, 2 Nmol/l para ambos os grupos 01 e 02 (Figura 20-A), independentemente do tratamento.

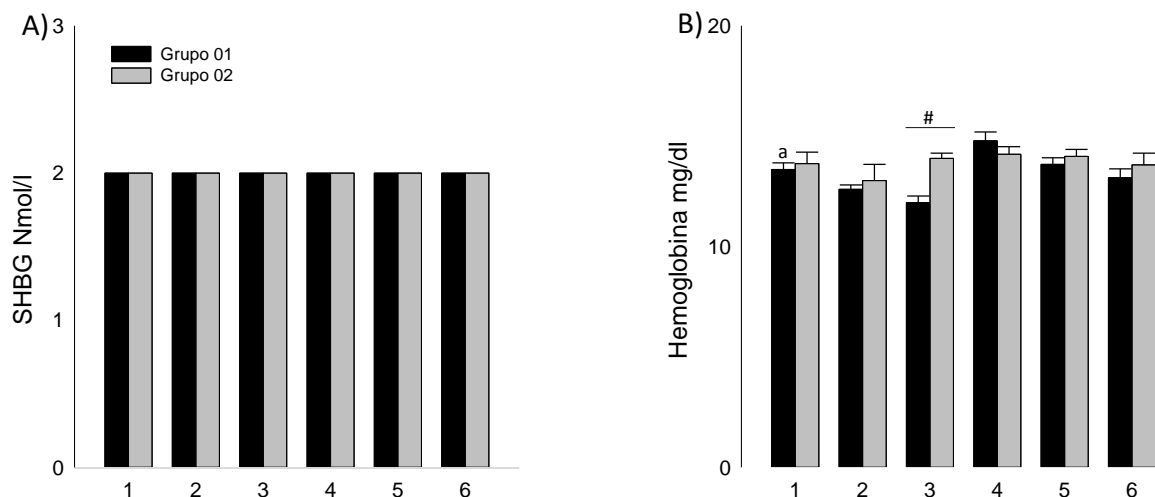


Figura 20- Média (\pm EPM) A) SHBG (Nmol/l) e B) hemoglobina (mg/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).

^a 1 vs 2, 3 e 4 no grupo 01

#=diferença grupo 01 e grupo 02 nas fases indicadas.

Já os valores de HG apresentam diferenças entre os grupos na fase 3, pois suas concentrações foram maiores para o grupo 02 ($p=0,02$) (Figura 20-B). O grupo 01 apresentou diferenças dos valores de HG nas distintas fases experimentais ($F_{3, 211}=9,07$; $p=0,001$), pois houve redução de HG nas fases 2 ($p=0,04$) e 3 ($p=0,001$), e aumento na fase 04 ($p=0,001$). Já em termos do grupo 02, não foram registradas diferenças nos valores de HG ($F_{3, 211}=1,90$; $p=1,34$) nas fases experimentais.

7.1.8. Lipídios

As médias das concentrações de lipídios foram diferentes entre os grupos 01 e 02, uma vez que o grupo 02 apresentou concentrações maiores nas fases 2 ($p=0,05$); 3 ($p=0,01$); 4 ($p=0,04$) e 5 ($p=0,05$) (Figura 21).

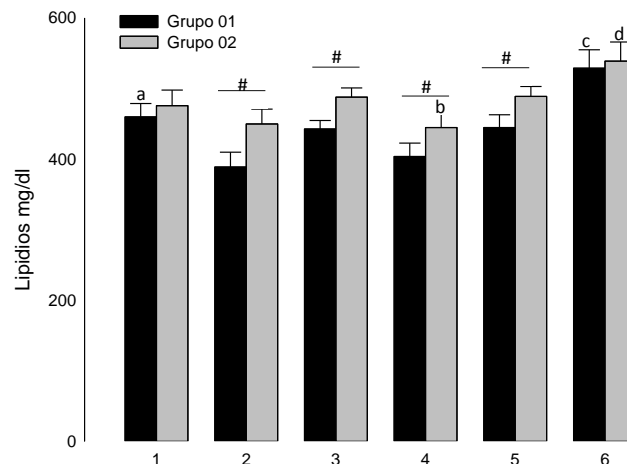


Figura 21- Média (\pm EPM) lipídios (mg/dl) nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) ($n=12$).

^a $p < 0,05$ fase 1 vs 2 e 4 no grupo 01

^b $p < 0,05$ fase 4 vs 1, 3 e 6 no grupo 02

^c $p < 0,05$ fase 6 vs 2, 4 e 5 no grupo 01

^d $p < 0,05$ fase 6 vs 2 e 4 no grupo 02

#=diferença grupo 01 e grupo 02 nas fases indicadas.

No grupo 01, há diferenças dos valores de lipídios entre as fases experimentais ($F_{3, 211}=4,48$; $p=0,001$), pois houve redução nas fases 2 e 4 e aumento na fase 6 ($p < 0,05$). No grupo 02, também foram verificadas diferenças para os valores de lipídios ao longo das fases experimentais ($F_{3, 211}=2,98$; $p=0,04$), portanto, houve redução concentração na fase 4 e aumento na fase 6 ($p < 0,05$) (Figura 21).

7.2. Resultados efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os aspectos comportamentais das fêmeas de macaco-prego

7.2.1. Comportamento não-sexual

Observa-se, na Figura 22, que há diferenças entre os grupos 01 e 02 nos comportamentos de catação ($p < 0,05$); estereotipia ($p < 0,05$) e agonístico ($p < 0,05$). O grupo 02 apresentou maior tempo gasto nos comportamentos de catação nas fases 1 e 3; e para o grupo 01 na fase 5 (Figura 22-A). O grupo 01 apresentou maior tempo gasto em comportamentos esterotipados nas fases 2, 3 e 4 (Figura 22-B); e, o grupo 02, nos comportamentos agonísticos nas fases 1, 2, 4, 5 e 6 (Figura 22-C).

Na Figura 22, ainda é possível observar que, no grupo 01, há mudanças nos comportamentos de catação ($F_{5,104}=3,61$; $p=0,01$); estereotipias ($F_{5,104}=2,91$; $p=0,05$) e agonísticos ($F_{5,104}=4,86$; $p=0,03$) nas distintas fases experimentais, pois houve aumentos na duração dos comportamentos de catação na fase 5 quando comparada às fases 1, 2, 3 e 4 ($p < 0,05$) (Figura 22-A), dos comportamentos de estereotipias na fase 3 comparando-a com as outras fases ($p < 0,05$) (Figura 22-B), e do comportamento agonístico nas fases 3 e 5 em relação às fases 1, 2, 4 e 6 ($p < 0,05$) (Figura 22-C).

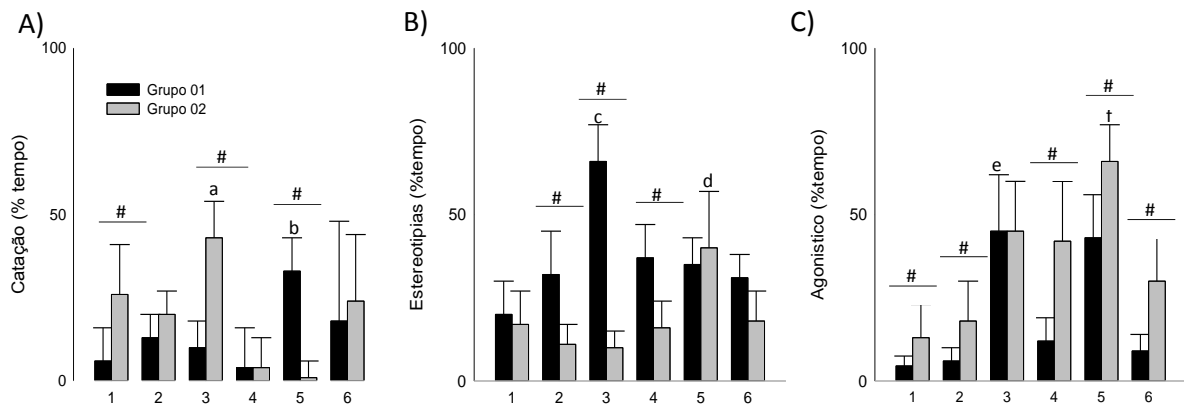


Figura 22- Média (\pm EPM) em horas dos comportamentos não-sexuais A) Catação; B) Estereotipias e C) Agonístico nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do Grupo1); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=12).

^a $p < 0,05$ fase 3 vs 2, 4 e 5 no grupo 02

^b $p < 0,05$ fase 5 vs 1, 2, 3 e 4 no grupo 01

^c $p < 0,05$ fase 3 vs todas as demais no grupo 01

^d $p < 0,005$ fase 5 vs todas as demais no grupo 02

^e $p < 0,05$ fase 3 vs 1, 2, 4 e 6 no grupo 01

^f $p < 0,05$ fase 5 vs 1, 2 e 6 no grupo 02

#=diferença Grupo1 e Grupo 02 nas fases indicadas.

No grupo 02 também foram registradas mudanças na emissão dos comportamentos de catação ($F_{5,90}=4,36$; $p=0,001$), esterotipias ($F_{5,90}=2,85$; $p=0,04$) e agonístico ($F_{5,90}=5,08$; $p=0,001$), porque foram observados aumentos nos comportamentos de catação na fase 3 em relação às fases 2, 4 e 5 ($p<0,05$) (Figura 22-A), do comportamento de esterotipias da fase 5 em comparação às demais ($p<0,05$) (Figura 22-B), e do comportamento agonístico da fase 5 em relação às fases 1, 2 e 6 ($p<0,05$) (Figura 22-C).

7.2.2. Comportamento sexual

Há diferenças na frequência do comportamento sexual dos grupos nas fases 1, 3 e 5, já que foi observado maior frequência na emissão destes comportamentos nas fases 1 e 3 para o grupo 01; e na fase 5 para o grupo 02 (Figura 23) ($p<0,05$). Ainda nessa mesma figura, é possível verificar que o grupo 01 apresenta mudanças na frequência do comportamento sexual, pois foi registrado aumento na frequência do comportamento sexual na fase 3 em comparação às fases 1, 2, 4, 5 e 6 ($F_{4,710}=5,32$; $p=0,001$). Já o grupo 02 apresentou aumento na frequência destes comportamentos na fase 5 em comparação às fases 1, 2, 3, 4 e 6 ($F_{4,731}= 6,37$, $p=0,001$).

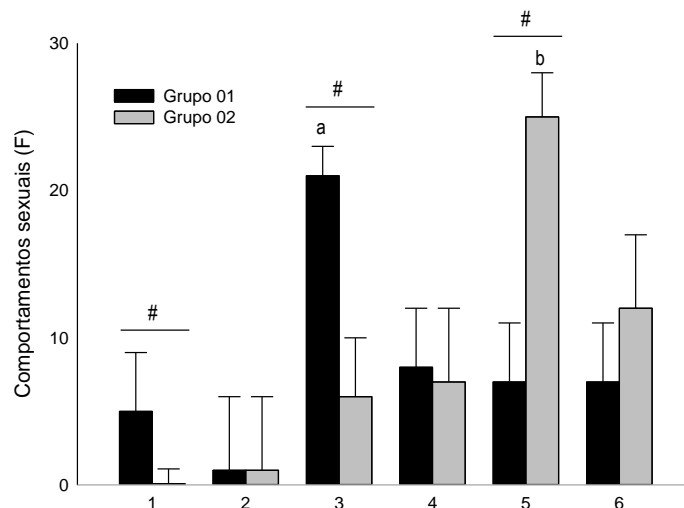


Figura 23- Média (\pm EPM) da frequência dos comportamentos nas fases 1 (Linha de Base); 2 (CHC); 3 (T+CHC no grupo 01 e placebo no grupo 02); 4 (Intervalo do grupo 01); 5 (T+CHC no grupo 02 e placebo no grupo 01); 6 (Intervalo do grupo 02) em fêmeas de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) ($n=12$).

^a $p<0,05$ fase 3 vs todas as fases no grupo 01

^b $p<0,05$ fase 5 vs todas as fases no grupo 02

#=diferença Grupo 01 e Grupo 02 nas fases indicadas.

7.3. Resultados das correlações entre parâmetros hormonais e aspectos comportamentais de fêmeas de macaco-prego.

Foram verificadas correlações hormonais e comportamentais entre os grupos 01 e 02; sendo assim, é possível observar, na Tabela 6, que há correlação entre os grupos nas emissões dos comportamentos não sexuais ($r=0,23$; $p=0,001$), nos comportamentos sexuais ($r=0,24$; $p=0,001$) e nas concentrações de E2 ($r=0,13$; $p=0,01$), de E1 ($r=0,11$; $p=0,04$); de testosterona ($r=0,14$; $p=0,004$) e de DHT ($r=0,16$; $p=0,005$).

Ainda nesta mesma tabela, foi possível observar correlações entre os valores de testosterona do grupo 01 e a emissão do comportamento sexual do grupo 02 ($r=0,14$; $p=0,01$). Há ainda correlações da concentração de cortisol do grupo 01 ao comportamento sexual do grupo 02 ($r=0,16$; $p=0,003$). As concentrações de cortisol do grupo 02 foram positivamente correlacionadas ao comportamento não-sexual ($r=0,12$; $p=0,04$), ao E1 ($r=0,17$; $p=0,002$) e de DHT ($r=0,11$; $p=0,04$) do grupo 01. As concentrações de DHT do grupo 02 ainda foram correlacionadas com o E2 ($r=0,11$; $p=0,04$) e T ($r=0,13$; $p=0,02$) do grupo 02.

Tabela 6- Correlações de Pearson (r) e nível de significância (p) dos dados N-Sexual (comportamento não-sexual), Sexual (comportamento sexual), E2 (estradiol), E1 (estrone), T (testosterona), DHT (dihidrotestosterona) e cortisol entre os valores representantes das fêmeas do grupo 01 (G1) e grupo 02 (G2) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) ($n=12$).

		Correlações						
		N-sexual-G2	Sexual-G2	E2-G2	E1-G2	T-G2	DHT-G2	Cortisol-G2
N-sexual-G1	R	0,23	-0,67	-0,26	-0,03	-0,33	-0,71	0,12
	p	0,001	0,23	0,64	0,48	0,54	0,20	0,04
Sexual-G1	R	-0,02	0,24	0,09	-0,02	0,03	0,05	0,04
	p	0,67	0,001	0,08	0,66	0,54	0,32	0,40
E2-G1	R	0,03	-0,08	-0,13	-0,03	-0,09	-0,07	0,02
	p	0,56	0,13	0,01	0,48	0,09	0,21	0,68
E1-G1	R	-0,04	-0,90	0,07	0,11	-0,10	-0,09	-0,17
	p	0,56	0,09	0,22	0,04	0,06	0,09	0,002
T-G1	R	-0,02	0,14	-0,09	-0,06	0,14	0,05	-0,02
	p	0,62	0,01	0,07	0,27	0,004	0,36	0,63
DHT-G1	R	-0,01	0,07	-0,11	-0,04	0,13	0,16	0,11
	p	0,87	0,18	0,04	0,45	0,02	0,005	0,04
Cortisol-G1	R	0,04	0,16	0,04	0,02	0,09	-0,01	0,06
	p	0,42	0,003	0,38	0,65	0,08	0,91	0,24

* $p<0,05$

Para o grupo 01 os valores de testosterona foram correlacionados ao comportamento não-sexual ($r=0,16$; $p=0,002$) e ao E1 ($r=-0,21$; $p=0,001$); DHT ($r=0,53$; $p=0,001$) e cortisol ($r=0,24$; $p=0,001$). No entanto, não houve correlação entre os valores de testosterona com o comportamento sexual ($r=0,09$; $p=0,09$) e as concentrações de E2 ($r=-0,03$; $p=0,51$). Ainda pode ser observado que os valores de DHT são correlacionados aos de E1 ($r=-0,16$; $p=0,004$), já os de cortisol a concentração de E2 ($r=0,15$; $p=0,006$). Os demais parâmetros não apresentaram correlações entre si ($p>0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7- Correlações de Pearson (r) e nível de significância (p) dos dados N-Sexual (comportamento não-sexual), Sexual (comportamento sexual), E2 (estradiol), E1 (estrona), T (testosterona), DHT (dihidrotestosterona) e cortisol nas fêmeas do grupo 01 de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) (n=6).

		Correlações						
		<i>N-Sexual</i>	<i>Sexual</i>	<i>E2</i>	<i>E1</i>	<i>T</i>	<i>DHT</i>	<i>Cortisol</i>
<i>N-Sexual</i>	R	-	-0,01	-0,03	0,04	0,16	-0,07	0,06
	P	-	0,91	0,52	0,47	0,002	0,19	0,23
<i>Sexual</i>	R	-0,01	-	-0,05	-0,10	0,09	0,08	0,04
	P	0,91	-	0,35	0,07	0,09	0,17	0,47
<i>E2</i>	R	-0,03	-0,05	0	-0,06	-0,03	0,01	0,15
	P	0,53	0,35	-	0,29	0,51	0,73	0,006
<i>E1</i>	R	0,04	-0,10	-0,06	-	-0,21	-0,16	0,03
	P	0,47	0,07	0,29	-	0,001	0,004	0,61
<i>T</i>	R	0,16	0,09	-0,03	-0,21	-	0,53	0,24
	P	0,002	0,09	0,51	0,001	-	0,000	0,001
<i>DHT</i>	R	-0,07	0,07	0,01	-0,16	0,53	-	-0,01
	P	0,19	0,17	0,73	0,004	0,00	-	0,81
<i>Cortisol</i>	R	0,06	0,04	0,15	0,03	0,24	-0,01	-
	P	0,23	0,47	0,006	0,61	0,002	0,81	-

* $p<0,05$

Para o grupo 02, o comportamento sexual foi correlacionado positivamente às concentrações do E2 ($r=0,12$, $p=0,02$), E1 ($r=0,12$; $p=0,02$); testosterona ($r=0,16$; $p=0,002$) e ao DHT ($r=0,12$; $p=0,0$). Observou-se ainda uma correlação positiva entre as concentrações de E2 e as de testosterona ($r=0,10$; $p=0,05$) e DHT ($r=0,10$; $p=0,05$), e negativa em termos das concentrações de cortisol ($r=0,15$; $p=0,005$). As concentrações de testosterona foram correlacionadas negativamente às de E1 ($r=-0,14$; $p=0,01$) e positivamente ao DHT ($r=0,62$; $p=0,001$) e do cortisol ($r=0,11$; $p=0,05$). Já as concentrações de cortisol correlacionam positivamente às expressões do comportamento não-sexual

($r=0,18$; $p=0,001$) e testosterona ($r=0,11$; $p=0,05$), conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8- Correlações de Pearson (r) e nível de significância (p) dos dados N-Sexual (comportamento não-sexual), Sexual (comportamento sexual), E2 (estradiol), E1 (estrone), T (testosterona), DHT (dihidrotestosterona) e cortisol nas fêmeas do grupo 02 de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*) ($n=6$).

		Correlações						
		<i>N-Sexual</i>	<i>Sexual</i>	<i>E2</i>	<i>E1</i>	<i>T</i>	<i>DHT</i>	<i>Cortisol</i>
<i>N-Sexual</i>	R	-	0,04	-0,06	-0,01	-0,01	0,01	0,18*
	P	-	0,44	0,24	0,73	0,84	0,75	0,001
<i>Sexual</i>	R	0,04	-	0,12	0,12	0,16	0,12	-0,09
	P	0,44	-	0,02	0,02	0,002	0,03	0,09
<i>E2</i>	R	-0,06	0,12	-	0,06	0,10	0,10	-0,15*
	P	0,24	0,02	-	0,27	0,05	0,05	0,005
<i>E1</i>	R	-0,01	0,12	0,06	-	-0,14*	-0,05	0,02
	P	0,73	0,02	0,27	-	0,01	0,31	0,60
<i>T</i>	R	-0,01	0,19	0,10	-0,14*	-	0,62	0,11
	P	0,84	0,002	0,05	0,01		0,000	0,05
<i>DHT</i>	R	0,01	0,12	0,10	-0,05	0,62	-	0,09
	P	0,75	0,03	0,07	0,31	0,000		0,11
<i>Cortisol</i>	R	0,18*	-0,09	-0,15*	0,02	0,11	0,09	-
	P	0,001	0,09	0,005	0,60	0,05	0,11	

* $p<0,05$

7.4. Discussão

Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos em fêmeas de macaco-prego

O tratamento prolongado de CHC associado à testosterona promoveu mudanças nas concentrações dos esteroides sexuais e não sexuais das fêmeas, já que foram registrados aumentos de E1, testosterona, DHT e Cortisol. Contudo, os valores de E2 não foram sujeitos a tais mudanças. Nosso intuito era que os padrões hormonais não apresentassem variações fisiológicas significativas, no entanto, foi claramente observado o aumento nas concentrações de testosterona e DHT decorrentes do tratamento à base do gel de testosterona intranasal. A hipótese deste estudo foi embasada na dose reduzida de testosterona administrada pela via intranasal das fêmeas de macaco-prego, uma vez que, de acordo com Banks *et al.* (2009) tem como principal característica a absorção rápida e direta no SNC. Isso teoricamente anularia quaisquer efeitos adversos, inclusive sobre os esteroides

sexuais. No entanto, em fêmeas de ratos (Banks *et al.*, 2009) e macaco-prego (Tavares *et al.*, 2007), foram observadas mudanças do perfil hormonal após a administração de testosterona, mesmo que a testosterona tenha sido administrada pela via intranasal.

Sabe-se que uso exógeno de testosterona promove mudanças no perfil hormonal, visto que parte deste andrógeno é convertido em outros esteroides sexuais, por exemplo, DHT e estradiol (Simpson *et al.*, 2001; Burger, 2002). A testosterona circulante alcança o tecido adiposo e partes do tecido neural. Nestas regiões, há presença da enzima aromatase, que promove a conversão da testosterona em E2, e da enzima 5-alfa-redutase, que promove a conversão de testosterona, em DHT (Simpson *et al.*, 2001; Burger, 2002; Alesci *et al.*, Simpson, 2002; Davis e Worsley, 2013), muito embora nas mulheres, a principal conversão periférica da testosterona seja em E2 (Van Anders *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2012; Davis e Worsley, 2013) e posteriormente, em DHT (Burger, 2002).

Estudos indicam que administração exógena de testosterona em mulheres (Van Anders *et al.*, 1999), ratas (Jones *et al.*, 2012), fêmeas de macaco-prego (Tavares *et al.*, 2007) e fêmeas de macacos rhesus (Casare *et al.*, 2013) promoveu elevação na concentração de E2. Entretanto, este resultado não foi observado no nosso estudo, já que, entre todos os hormônios sexuais analisados, este foi o único que não sofreu alteração. Porém, nos estudos supracitados, foram administradas doses isoladas de testosterona, diferentemente do nosso estudo em que o tratamento de testosterona foi concomitante com CHC. Ressalta-se que na composição do contraceptivo, administrado nas fêmeas de macaco-prego, há presença do E2 (enantato de estradiol- 10 mg), e como já mencionado anteriormente, o mecanismo de ação do CHC é manter a taxa dos esteroides sexuais femininos constantes. Isso confere o mecanismo anovulatório, pois os picos de E2 antecedem a ovulação.

Em ratas, a administração isolada de testosterona promoveu aumento na concentração de E2, porém, quando há inclusão de E2 a conversão periférica de testosterona passa a ser, preferencialmente, em DHT. Acredita-se que este resultado seja um mecanismo adaptativo contra a elevação exacerbada de E2; uma vez que concentrações elevadas deste estrógeno podem trazer consequências graves ao organismo feminino (Santen *et al.*, 2009). Dessa forma, é possível que o tratamento conjunto de T+CHC, utilizado no nosso estudo, tenha influenciado os

resultados de E2 obtidos nas fêmeas de macaco-prego do presente estudo. Sendo assim, é provável que as fêmeas de macaco-prego também apresentem adaptação fisiológica protetiva à elevação da concentração de E2, assim como observado em ratas (Santen *et al.*, 2009)

Em mulheres, além das mudanças hormonais, o uso exógeno de testosterona induz mudanças neurofisiológicas em regiões neurais relacionadas à ativação do comportamento sexual como, por exemplo, no sistema límbico (Van Anders *et al.*, 1999; Tuiten *et al.*, 2000; Van Anders *et al.*, 2011), que promove o aumento do desejo sexual, do bem estar e da satisfação sexual (Tuiten *et al.*, 2000; Van Anders *et al.*, 2011). Estes resultados são semelhantes aos encontrados em ratas, visto que também há evidências de que o tratamento exógeno com testosterona é capaz de promover a ativação das regiões neurais, especificamente, do bulbo olfatório, do hipotálamo, do hipocampo e do núcleo estriado (Banks *et al.*, 2009). Ressalta-se ainda que, em mulheres, outro efeito conhecido dos androgênicos na sua sexualidade ocorre, por exemplo, via ação direta sobre a genitália, onde provavelmente os androgênios modulam a ação estrogênica responsável pelo aumento de fluxo sanguíneo, com consequente melhora no trofismo e na lubrificação vaginal (Traish *et al.*, 2002).

É provável que, assim como em mulheres (Tuiten *et al.*, 2000; Van Anders *et al.*, 2011) e em ratas (Banks *et al.*, 2009), o uso exógeno de testosterona ative áreas neurais envolvidas no controle do comportamento sexual em outras fêmeas de vertebrados, pois fêmeas de peixes (Munakata and Kobayashi 2010), de aves (Ketterson *et al.*, 2005) e de macaco-prego (Tavares *et al.*, 2007) também apresentam aumento na frequência das expressões do comportamento sexual sob ação da testosterona. Acreditamos que, assim como nestas fêmeas supracitadas, possivelmente, o tratamento com a testosterona administrado no presente estudo foi capaz de ativar também regiões neurais envolvidas na expressão dos comportamentos sexuais nas fêmeas estudadas. Vale ressaltar que os resultados obtidos também indicam um aumento da frequência da expressão sexual nas fêmeas de macaco-prego, que por sua vez foi correlacionada à elevação das concentrações de testosterona.

Normalmente, durante as fases do ciclo menstrual, as fêmeas de macaco-prego exibem notáveis evidências do comportamento sexual, e solicitam cópula com machos-alfa (dominantes), por meio de comportamentos de vocalizar, de olhar

mútuo, de levantar das sobranças, de massagear (mamas, axilas e genitália) entre outros (Carosi e Visalberghi, 2002). Tais comportamentos são persistentes e ditos como indicativos da aproximação do período ovulatório, o que coincide com aumento de E2 (Carosi *et al.*, 1999; Carosi *et al.*, 2005). Nestas macacas, é atribuída ao E2 a função na modulação do comportamento sexual, visto que há uma correlação positiva entre o aumento de E2 e a maior expressão dos comportamentos sexuais (Carosi *et al.*, 1999; Carosi e Visalberghi, 2002; Carosi *et al.*, 2005, Carnegie *et al.*, 2005). Este resultado é exatamente o mesmo observado em outros primatas como, por exemplo, na *Macaca fuscata* (O'Neill *et al.*, 2004), *Macaca mulatta* (Shideler *et al.*, 2001) e *Sapajus nigritus* (Tiddi *et al.*, 2015).

Muito embora o papel do E2 no comportamento sexual das fêmeas macaco-prego seja incontestável (Carosi *et al.*, 1999; Carosi e Visalberghi, 2002; Carosi *et al.*, 2005, Carnegie *et al.*, 2005), nossos resultados apontam para uma ação conjunta do E2 e da testosterona na ativação do comportamento sexual destas fêmeas, uma vez que verificou-se correlações positiva entre a elevação de testosterona e uma maior expressão dos comportamentos sexuais. Este resultado corrobora o encontrado por Tavares *et al.* (2007). Neste sentido, há possibilidade de inferirmos que as expressões dos comportamentos sexuais das fêmeas de macaco-prego também sejam moduladas pela ação da testosterona, possivelmente como acontece em mulheres, nas quais a administração de testosterona tem trazido mudanças positivas no aumento do desejo, na satisfação e no bem estar sexual (Davis e Worsley, 2013). Esses resultados ressaltam o papel importante na expressão dos comportamentos sexuais das fêmeas exercido tanto pela testosterona como pelo E2.

Em contraste aos benefícios trazidos ao comportamento sexual, a administração de testosterona também é negativamente relacionada a vários efeitos adversos como, por exemplo, o aumento de acne (Sun *et al.*, 2014; Miao *et al.*, 2015), a infertilidade, alterações mamárias, a hipertrofia muscular (Huang *et al.*, 2014) além de mudanças na taxa de glicose no sangue (Caronia *et al.*, 2013). A ocorrência de tumores também tem sido documentada (Davis *et al.*, 2012), além das consequências graves à fisiologia reprodutiva, pois o excesso de testosterona no organismo das fêmeas afeta diretamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, resultando assim em mudanças nas secreções dos hormônios hipofisários FSH e LH (Goldstein *et al.*, 2004). Estas alterações hormonais diminuem a produção de

testosterona endógena causando drásticos efeitos na síntese de outros esteroides sexuais, o que compromete as funções reprodutivas de modo geral (Simpson *et al.*, 2001; Burger, 2002).

Em fêmeas de macaco rhesus, a exposição aos andrógenos causa alterações clínicas importantes, possivelmente devido às mudanças neuroendócrinas, tais como: aumento da secreção de LH e anormalidades na produção endógena nas concentrações de progesterona e estrógenos (Casare *et al.*, 2013). Estas alterações são semelhantes em mulheres que apresentam ovários policísticos, que leva à desordem hormonal e que compromete as funções reprodutivas. Dessa forma, percebe-se a importância de mais pesquisas que objetivem estudar a dose e as vias mais adequadas para a administração de testosterona nas mulheres; uma vez que o uso de testosterona tem sido cada vez mais crescente. Ressalta-se ainda que há uma parcela significativa do público feminino que tem feito uso da testosterona em idade reprodutiva, o que poderá trazer a médio ou longo prazo, graves consequências à fisiologia reprodutiva.

Há também uma correlação entre as elevações na concentração de testosterona e o índice de suicídio e distúrbios bipolares em mulheres, uma vez que mulheres que apresentam comportamentos indicativos de distúrbios bipolares, também apresentam altas concentrações de testosterona (Sher *et al.*, 2014; Wooderson *et al.*, 2015). Além do mais, a testosterona possui papel fundamental na competição intra-sexual (Cobey *et al.*, 2013). Indiretamente, ela antecipa os comportamentos competitivos entre as mulheres, o que eleva a agressividade e a competição na fase ovulatória, isso porque ocorre o aumento destes comportamentos justamente na fase de elevação da testosterona (Maner *et al.*, 2013, Hahn *et al.*, 2016). Uma das principais funções da testosterona está relacionada à competitividade e às estratégias sociais relacionadas à concorrência, à aquisição ou à defesa de recursos, incluindo parceiros ou oportunidades sexuais, o que pode induzir a distúrbios comportamentais de agressividade (van Anders *et al.*, 2011).

Em consideração ao mencionado, também foi objetivo do nosso estudo analisar o comportamento agonístico das fêmeas de macaco-prego cativas, ou seja, tudo o que estivesse relacionado à defesa ou às brigas entre os indivíduos, que são usados como inferência de competição intra-sexual e/ou relações de dominância ou hierarquia social. Nossos resultados apontam para um aumento da duração do

comportamento agonístico em ambos os grupos de fêmeas de macaco-prego sob a administração do tratamento com testosterona (Figura 22- C). Sendo assim, foi possível verificar que o aumento das concentrações de testosterona é coincidente com a apresentação de comportamentos de disputas, de defesa ou de briga entre as fêmeas de macaco-prego analisadas neste estudo. Houve maior expressão destes comportamentos nas fases em que a testosterona também estiveram elevados. Outro resultado obtido nas fêmeas de macaco-prego foi a maior duração dos comportamentos estereotipados, que aconteceu nas fases em que elas também apresentaram maior concentração de testosterona (Figura 22-B).

Em mulheres, a elevação de testosterona traz alterações comportamentais importantes, por exemplo, ansiedade, irritabilidade e depressão, sendo estes os efeitos negativos do uso constante deste androgênio (McHenry *et al.*, 1996; van Anders *et al.*, 2011). Por outro lado, em mulheres que apresentam disfunção sexual, a testosterona pode atuar no aumento da concentração de serotonina, promovendo, assim, uma terapia antidepressiva por meio de sua administração exógena (Ensieh *et al.*, 2014). No entanto, é importante lembrar que, em modelos animais, por exemplo, em macacos cativos, há outros fatores que podem ativar comportamentos de estresse tais como a presença dos pesquisadores e o tratamento experimental (Abbott *et al.*, 2003). Em cativeiro, é comum a emissão de comportamentos indicativos de estado estresse social entre os indivíduos, visto que, animais mantidos nestas condições apresentam comportamentos adversos em relação àqueles animais que normalmente são apresentados pelos exemplares de vida livre (Pauletti *et al.*, 2005). Sabe-se que o estado de estresse dos animais cativos pode ser decorrente de variáveis externas, como: espaço físico, acesso ao alimento, hierarquias reprodutivas, estado reprodutivo e elevação do cortisol (Broom *et al.*, 1990).

Assim, o cortisol pode ser usado como um excelente indicador do estado de estresse dos animais (Gleeson, 2002; Hellhammer *et al.*, 2009), pois a resposta endócrina ao estresse envolve o aumento da liberação de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo e o aumento da estimulação simpática da medula suprarrenal. A CRH estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (hormônio hipofisário) pela adenohipófise a qual, por sua vez, estimula no córtex suprarrenal a produção dos principais hormônios glicocorticoides, por exemplo, o cortisol. Este hormônio, cuja concentração está claramente aumentada em situações de estresse, é

conhecida pela sua função catabólica, anti-inflamatória, homeostática e estimulante do metabolismo lipídico, glicolítico e proteico (Helhammer *et al.*, 2009). O cortisol é, deste modo, considerado o mais importante avaliador das situações indutoras de estresse (Santos *et al.*, 2014).

Nessa direção, resultados da presente investigação, apontaram para elevação das concentrações de cortisol na fase de tratamento com testosterona (Figura 16), que também é coincidente com a maior apresentação dos comportamentos indicativos de estresses (agonísticos e esterotipias) nas fêmeas de macaco-prego (Figura 22- B e C). Sabe-se que, em primatas não humanos, o cortisol é um hormônio influenciador da emissão dos comportamentos de disputas, injúrias e brigas (Sapolsky, 2005). Além do mais, estes comportamentos podem estar relacionados às questões reprodutivas, visto que, normalmente, as fêmeas, reprodutivamente dominantes, apresentam concentrações mais elevadas de cortisol e, conseqüentemente, comportamentos vigilantes sobre suas subordinadas (Alencar *et al.*, 2006). Evidencia-se que macaco-prego apresentem hierarquias reprodutivas, pois, em vida livre, há grupos com até 40 indivíduos, os quais são constituídos por machos e fêmeas dominantes e seus subordinados (Fragaszy *et al.*, 2004)

A condição social de uma fêmea dentro do grupo, se dominante ou subordinada, exerce influência na atividade do HHA (Hipotálamo-Hipófise-Adrenocortical), responsável pela ativação da secreção de cortisol, que, em condição estressante, apresenta-se em concentrações acima dos valores basais tanto em fêmeas dominantes quanto em subordinadas (Albuquerque *et al.*, 2004). Todavia, em primatas da espécie *Callithrix jacchus*, as concentrações mais baixas de cortisol foram encontradas no plasma das fêmeas socialmente subordinadas (Saltzman *et al.*, 1998). A posição social dentro do grupo também influencia no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, já que existem alterações nos hormônios sexuais, decorrentes, sobretudo, da inibição da fertilização em fêmeas subordinadas.

As alterações hormonais nas diferentes fases do ciclo reprodutivo estão relacionadas à disputa entre fêmeas e entre machos, e também aos mecanismos de hierarquia de dominância reprodutiva (Abbott, 1987; Alencar *et al.*, 2006). Para Abbott (1987), em diferentes sociedades de primatas, são comumente encontradas dominâncias sociais hierárquicas, e um dos efeitos desse sistema é a supressão de reprodução entre indivíduos socialmente subordinados. Segundo Brasil *et al.* (2007), um dos mecanismos que poderia atuar na supressão da fertilidade das fêmeas do

grupo seria o resultado das pistas químicas emitidas pela fêmea dominante (ou reprodutiva). Em primatas neotropicais, estímulos feromonais podem resultar em mudanças importantes na fertilidade das fêmeas subordinadas, como, por exemplo, na taxa de copulação e no número de descendentes (Santos, 2003). Neste contexto, Brasil *et al.* (2007) relataram a ocorrência de atresia folicular em fêmeas subordinadas da espécie *Leontopithecus rosalia* (mico-leão-dourado), provavelmente, imposta pela fêmea dominante ou reprodutora. Acredita-se que esta subordinação seja decorrente da ação dos feromônios emitidos pela fêmea ativamente reprodutiva, sendo possível que isso ocorra por meio de feromônios liberados pelas marcações anogenitais ou circungenitais de cheiro.

Diante das informações mencionadas em relação à comunicação química, entre primatas, cabe destacar que foram encontrados na presente investigação alguns resultados instigantes. Estes referem-se ao aumento dos níveis basais de testosterona (Figura 15- A) verificados na ausência do TT, pois nas fases em que as fêmeas eram do grupo controle do estudo, além das elevações das concentrações de E1 (Figura 14- B) e de cortisol (Figura 16), além também do aumento na frequência dos comportamentos agonísticos e sexuais apresentados respectivamente nas Figura 22- C e Figura 23. Em primatas, as altas concentrações de cortisol (Albuquerque *et al.*, 2004) e testosterona (Edwards e Casto, 2013), assim como a apresentação de comportamentos agonísticos (Bergstrom e Fedigan, 2010; Carré *et al.*, 2011) são indicativos do status de dominância entre os indivíduos. Neste contexto, é possível que alterações hormonais e comportamentais, documentadas no nosso estudo, não estejam ligadas apenas ao tratamento associado entre T+CHC, mas, sim a outros fatores externos, como, por exemplo, à possível comunicação química entre as fêmeas por meio de feromônios, uma vez que foram observadas correlações entre grupos em termos dos parâmetros hormonais e comportamentais dos grupos 01 e 02 (Tabela 6).

Na literatura, é descrito que primatas comumente comunicam-se por meio dos feromônios, que é a comunicação química por meio de moléculas odoríferas específicas. Normalmente estas moléculas são liberadas na urina, na saliva, nas fezes e na pele (Quiatt e Reynolds, 1993). De acordo com Henkel *et al.* (2015) é bastante comum a comunicação por feromônios entre os primatas, e esta pode acontecer mesmo com animais que permanecem fisicamente distantes, isto é, não necessariamente acondicionados no mesmo recinto. Dessa forma, a comunicação

química atua como um importante indicador dos estados fisiológicos e sexuais nos animais e, em geral, o olfato constitui, para os primatas e demais mamíferos, uma fonte importante de informação sobre o meio externo (Quiatt e Reynolds, 1993).

Por estas razões, levanta-se a hipótese de que as fêmeas de macaco-prego tenham alguma comunicação química, que contribuiu de forma significativa para os resultados obtidos neste estudo, o que seria essa uma possível hipótese alternativa para justificar as mudanças hormonais e comportamentais encontradas nas fêmeas na ausência do tratamento com testosterona. Sabe-se que é comum, em muitas espécies de primatas, como: *Leontopithecus rosalia* (Brasil *et al.*, 2007), *Papio anubis* (Galbany *et al.*, 2015), *Callithrix jacchus* (Campennì *et al.*, 2014), *Saguinus oedipus* (Rodrigues *et al.*, 2015) *Ateles geoffroyi* (Cerdeira-Molina *et al.*, 2012) e *Sapajus spp* (Lefevre *et al.*, 2014), a comunicação reprodutiva por sinais olfatórios ou a comunicação química entre os indivíduos (Phillip *et al.*, 2011). Assim como em outras espécies, as fêmeas de *Cebus apella*, que atualmente pertencem ao gênero *Sapajus* também apresentam competição reprodutiva tanto social quanto hormonal (Linn *et al.*, 1995)

Neste contexto, acreditamos que os comportamentos de “massagear as mamas”, “massagear as axilas” e “massagear a genitália, comumente apresentados pelas fêmeas de macaco-prego em termos de seu repertório de comportamentos sexuais, sejam usados como estímulos sobre as glândulas, que estão localizadas nestas regiões, e conseqüentemente, induz a liberação das moléculas odoríferas. Em mulheres, aparentemente ocorre à emissão dos sinais odoríferos pelas regiões axilares e genital, pois normalmente os homens, quando são expostos a tais secreções, apresentam como resposta ao aumento das concentrações de cortisol e de testosterona (Cerdeira-Molina *et al.*, 2013). Levando em consideração as similaridades fisiológicas entre as fêmeas de macaco-prego e mulheres, é provável que os comportamentos de massagear mamas, axilas e genitália ocorram, realmente, com o intuito de ativar sistema olfatório por meio da liberação de alguma molécula odorífera e não apenas no contexto visual.

Outro comportamento que pode ser justificado como indicativo de comunicação química entre primatas, é o comportamento apresentado por machos de se lavarem na urina ou passá-la pelo corpo, comportamento este observado com frequência em macacos. De acordo com Phillips *et al.* (2011), tal comportamento tem cunho sexual, visto que em experimento realizado com fêmeas adultas de macaco-

prego, a exposição delas à urina dos machos promovia ativação das regiões neurais ligadas ao comportamento sexual, por exemplo, o sistema límbico. Torna-se importante mencionar também que as regiões ligadas ao comportamento sexual são mais ativadas na presença da urina dos machos adultos, que apresenta altas concentrações de testosterona.

Considerando-se que fêmeas de macaco-prego são modelos importantes para pesquisas que envolvem a fisiologia reprodutiva, torna-se extremamente relevante o desenvolvimento de estudos com o intuito de investigar a comunicação química entre as fêmeas e o papel que este representa dentro do grupo social. Uma vez que os parâmetros fisiológicos são passíveis de alterações devido à posição social, que o animal ocupa no grupo, bem como pela comunicação química dos indivíduos. Embora a presente investigação não tivesse como objetivo analisar tais parâmetros, os resultados sugerem fortemente a possibilidade de ter ocorrido comunicação química entre as fêmeas estudadas. Neste sentido, fazem-se necessários estudos que objetivem esclarecer quais parâmetros fisiológicos podem sofrer estas alterações, visto que tais modificações são fundamentais para o esclarecimento das mudanças hormonais e comportamentais observadas pelas fêmeas de macaco-prego.

É importante lembrar que o objetivo central do nosso estudo foi analisar os efeitos conjuntos do T+CHC sobre os parâmetros fisiológicos das fêmeas de macaco-prego. Dessa forma, vale destacar que sob a ação da testosterona não são apenas os parâmetros hormonais e comportamentais que sofrem alterações, mas também são documentados na literatura mudanças nos parâmetros hemostáticos (fibrinogênio, antitrombina, fator VII, inibidor do fator do plasminogênio) (Ridker *et al.*, 2001; Norris *et al.*, 2002), alguns dos quais aqui dosados. Além destes, e sob a ação deste androgênio ocorrem também disfunções metabólicas, por exemplo, alterações nas concentrações de lipídios (Pardini, 2013; Groot *et al.*, 2014; Baldan *et al.*, 2015) e nas concentrações de SHBG (Wallwiener *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2013), também dosados no presente estudo. Destaca-se que, normalmente, estes parâmetros fisiológicos são alterados devidos ao hiperandrogenismo, que pode ser decorrente do tratamento exógeno com a testosterona (Ridker *et al.*, 2001; Norris *et al.*, 2002).

O hiperandrogenismo nas mulheres favorece a disfunção metabólica, que pode aumentar os riscos de doenças cardiovasculares, devido a obesidade e a

hipertensão (Norris *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2006). O risco é decorrente em função da presença dos receptores androgênicos, que estão distribuídos nas células cardíacas e endoteliais. Neste sentido, a testosterona pode provocar vários efeitos no organismo feminino, como: vasodilatação e apoptose das células endotelial e consequente aumento do número de plaquetas e formação de coágulos de fibrina (Reis e Abdo, 2014). O risco de doenças cardiovasculares são maiores em mulheres, que apresentam elevação nas concentrações de testosterona como, por exemplo, as que tem ovários policísticos (Baldan *et al.*, 2015; Naderpoor *et al.*, 2015) e as que usam terapias hormonais (Ridker *et al.*, 2001; Norris *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2012).

Muitos dos efeitos fisiológicos sobre o sistema hemolítico estão relacionados à dose administrada de testosterona nas terapias hormonais (Shapiro *et al.*, 1999). Doses acima de 100 ng/dl são diretamente correlacionadas a alterações sistêmicas (Davis *et al.*, 2012), que podem promover mudanças graves nos fatores de coagulação, ocasionando a formação de trombos e a predisposição a doenças cardiovasculares (Naderi, 2016). Cabe mencionar que as alterações nos fatores de coagulação acontecem justamente no TP e no fibrinogênio (Ridker *et al.*, 2001; Norris *et al.*, 2002). De forma semelhante, nossos resultados também demonstraram alterações no TP ao logo de todas as fases do experimento, uma vez que o tempo deste fator hemolítico não retornou às concentrações basais (Figura 18-B). Contudo, os valores de fibrinogênio não apresentaram alterações significativas em nenhuma das fases do experimento (Figura 19-B), assim como os demais parâmetros TPPa (Figura 18-A), como o número de plaquetas (Figura 19-B), que foram verificadas alterações em ambos grupos quando as fêmeas de macacos receberam apenas tratamento com contraceptivo, mas não com o tratamento com testosterona ou este associado ao contraceptivo.

Destaca-se que distúrbios hemostáticos, tais como o aumento das concentrações de fibrinogênio, são positivamente correlacionadas ao número e à severidade de estenoses coronarianas (Cutini *et al.*, 2012; Naderi, 2016), o que aumenta a incidência de infartos do miocárdio e de mortes em pacientes com angina instável (Naderi, 2016). Vale mencionar que há evidências que não apenas a dose de testosterona provoca mudanças fisiológicas nos parâmetros hemolíticos, mas que tais alterações são também correlacionadas à via de administração dos hormônios sexuais. Sabe-se ainda que, pela via oral, há maior risco cardiovascular. Alguns

estudos têm revelado incremento da fração colesterol LDL, diminuição HDL e maior distribuição da gordura abdominal (padrão androgênico), promovendo aumento de citocinas inflamatórias e a redução da adiponectina em mulheres menopausadas (Davis *et al.*, 2008; Groot *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2009). Nesse contexto, é importante ressaltar que os resultados aqui obtidos apontam para a segurança do uso da testosterona na dose e via administradas no que concerne ao fibrinogênio.

As vias não orais (transdérmica, injetável e intranasal) não apresentam metabolismo de primeira passagem pelo fígado, ocasionando, assim, menor potencial para estímulo das proteínas hepáticas e das alterações nos fatores de coagulação. Neste sentido, as vias não orais são consideradas mais favoráveis em termos de risco cardiovascular e fenômenos tromboembólicos (Pardini, 2013). Logo, a via intranasal parece ser uma via especialmente interessante para ser utilizada especialmente se seus efeitos forem dissociados dos riscos inerentes às demais vias de administrações utilizadas e para as quais os efeitos já são documentados na literatura. Assim, os resultados sobre a via ideal para administração de testosterona carecem de uma avaliação de seus efeitos a longo prazo, e apontando para a necessidade de novos estudos na área. Muito embora estudo tenha demonstrado que, pela via injetável, mesmo doses altas de testosterona não provocam mudanças fisiológicas relacionadas à predisposição ao aumento de doenças cardiovasculares, pois não foram registradas alterações hemolíticas, variações das concentrações de lipídios, nem mudanças no peso corporal (Huang *et al.*, 2011).

Como já descrito, um dos fatores colaterais observado nas usuárias de androgênios exógenos é o ganho de peso (Pantel *et al.*, 2009; Janssen *et al.*, 2010). Há estudos que apontam uma correlação entre excesso de peso/obesidade/diminuição da massa magra e aumentos nas concentrações endógenos de testosterona. Groot *et al.* (2014) demonstrou que mulheres com SOP, que normalmente são acima do peso, apresentam concentrações elevadas de testosterona. Esta correlação também tem sido encontrada em mulheres que estão na idade de menopausa, já que doses elevadas de testosterona também promovem um aumento do peso corporal (Janssen *et al.*, 2010). Dessa forma, temos um grave problema de saúde pública, verificado para mulheres que se encaixam nessas condições, as quais estão mais propensas a ocorrência de infarto do miocárdio, à acidente vascular cerebral, à trombose arterial e venosa (Groot *et al.*, 2014).

Entre os fatores fisiológicos que levam à obesidade, está também o decréscimo nas concentrações de SHBG, pois a supressão da SHBG reflete o hiperandrogenismo o que gera alterações metabólicas (Brand e Schouw, 2010). A forte correlação entre testosterona e SHBG possibilita a utilização da SHBG como marcador indireto das disfunções androgênicas femininas e, possivelmente, como fator independente de risco para doença cardiovascular (Brand e Schouw, 2010; Roberts *et al.*, 2013).

Nas fêmeas de macaco-prego, a SHBG não apresentou mudanças ao longo das fases experimentais. Conforme, demonstrado na Figura 20-A, os valores foram os mesmos para ambos os grupos em todas as fases. Dessa forma, nossos resultados não corroboram os encontrados em humanas, uma vez que a elevação das concentrações de testosterona é inversamente proporcional aos valores de SHBG (Brand e Schouw, 2010). Neste sentido, era esperado que as concentrações de SHBG também apresentassem alterações significativas. Outra proteína analisada no nosso estudo foi à hemoglobina, que tem sido também usada clinicamente como marcador nos efeitos adversos da administração exógena de testosterona (Shehzad *et al.*, 2010). Nossos resultados apontam para mudanças nas concentrações de HG a no grupo 01, no qual ocorre um aumento desta proteína partir da fase 3, exatamente quando as fêmeas deste grupo receberam a testosterona. Este resultado corrobora o encontrado na literatura, que demonstra o aumento das concentrações de hemoglobina após tratamento com testosterona, isso em consequência do hiperandrogenismo (Mazer, 2000; Shehzad *et al.*, 2010).

Há também correlação entre o hiperandrogenismo e a centralização de gordura corporal e, de forma mais preditiva, entre o acúmulo de gordura intra-abdominal, que se associam às complicações metabólicas vinculadas ao risco cardiovascular (Reilly *et al.*, 2014). Foi sugerido que o aumento na quantidade de lipídios viscerais e da atividade lipolítica forneceria ao sistema porta um excesso de ácidos graxos livres, capaz de alterar o metabolismo hepático, resultando no aumento da produção de glicose e de triglicerídeos (Reilly *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2015). Consequentemente ocorre a elevação do peso corporal (Janssen *et al.*, 2010) e o aumento da incidência de doenças cardiovasculares nas usuárias de testosterona exógena (Brand e Schouw, 2010; Roberts *et al.*, 2013).

As variações no peso têm sido constantemente avaliadas nas terapias hormonais e nas usuárias de CHC, visto que a administração destes fármacos pode

influenciar na taxa de lipídios e na elevação do peso corporal. Neste contexto, nosso intuito era o de avaliar o peso corporal das fêmeas macaco-prego, para isso elas foram pesadas ao final de cada fase experimental ou a cada 21 dias. Entretanto, estes resultados não foram analisados e muito menos apresentados neste trabalho, porque algumas fêmeas do nosso estudo participavam de outro projeto do CP-UnB, no qual as fêmeas do nosso plantel passaram por restrição alimentar. Conseqüentemente, a condição experimental das fêmeas no outro projeto interferiu nos nossos resultados, já que visivelmente notamos uma perda acentuada de peso delas. No entanto, nossa hipótese era de que o peso não sofreria alterações, já que a variação de peso está diretamente ligada a doses altas de testosterona (Janssen *et al.*, 2010).

Sabe-se que uso exógeno de testosterona tem efeito no metabolismo lipídico, na função das lipases e na distribuição das gorduras corporais (Reilly *et al.*, 2014). Neste contexto, foi nosso intuito avaliar também os valores de lipídios nas fêmeas de macaco-prego. E os resultados não apontam para mudanças no perfil lipídico decorrentes do uso de T+CHC. Contudo, houve variações nos valores de lipídios ao longo das fases experimentais, muito embora essas variações não sejam exclusivas das fases de tratamento de testosterona. Sendo assim, acreditamos que haja outros fatores que influenciam em tais resultados como, por exemplo, os parâmetros metabólicos individuais e a idade. Um resultado interessante é que ambos os grupos apresentaram elevações na última fase do estudo (fase 06) (Figura 21), sendo possível que este resultado seja um indicativo de efeitos prolongados destes dois tratamentos associados T+CHC.

Foi também objetivo do estudo avaliar possíveis efeitos prolongados do uso de T+CHC nas fêmeas de macaco-prego, isso porque na literatura são demonstrados efeitos prolongados do uso de testosterona nas mulheres (Baldassarre *et al.*, 2013) e em fêmeas macaco-prego (Topic *et al.*, 2007). Os efeitos prolongados foram avaliados pelos dados coletados no ciclo menstrual seguinte à administração de testosterona, isto é, foram observados os parâmetros fisiológicos e os comportamentos da fase 4 — intervalo da testosterona para as fêmeas do grupo 01 — e da fase 06 — intervalo da testosterona para as fêmeas do grupo 02. Os resultados apontaram que há um efeito prolongado nas concentrações de testosterona e de cortisol em ambos os grupos, já o comportamento de catação e os parâmetros sexuais apresentaram efeitos prolongados apenas no grupo 02. Para os

demais parâmetros (E2, E1, DHT, TP, TTPa, plaquetas, fibrinogênio, lipídios, HG, GL, gonadotrofina e comportamento não-sexual) não foram registrados efeitos prolongados.

Evidencia-se que os efeitos prolongados nas concentrações de testosterona e no comportamento sexual, encontrados no nosso estudo, são semelhantes aos encontrados por Topic *et al.* (2007). Estes autores também verificaram um aumento também nas concentrações de testosterona e na expressão de comportamentos sexuais na mesma espécie. Dessa forma, é possível observar que não há necessidade do uso diário de testosterona, uma vez que, mesmo após 10 dias de administração desse fármaco, ainda foram observados efeitos da testosterona no organismo das fêmeas. Evidencia-se também que o tempo denominado de intervalo do tratamento (wash out) do presente estudo foi suficiente para análise do nosso objetivo, visto que, nos estudos de Tavares *et al.* (2007) e Topic *et al.* (2007), o intervalo foi de apenas de 10 dias. Este estudo avaliou os efeitos do tratamento de testosterona durante um ciclo menstrual consecutivo, e observamos efeitos ao longo do ciclo menstrual para as concentrações de testosterona e cortisol.

Na medida em que sabe-se que a administração diária de testosterona pode gerar consequências graves no organismo feminino, devido ao seu acúmulo ou excesso (Baldassarre *et al.*, 2013), é imprescindível conhecer os efeitos prolongados deste andrógeno no organismo feminino, quais parâmetros são alterados, e também inferir um período seguro dos efeitos da testosterona no organismo.

Em suma, é relevante mencionar que os resultados divulgados na literatura sobre o uso de testosterona são relatados para mulheres na fase de menopausa, as quais apresentam desarranjos na flutuação dos esteroides sexuais (Reis e Abdo, 2014). Neste contexto, pouco se sabe sobre os riscos que as mulheres saudáveis ou as em idade reprodutiva correm quando utilizam tratamento exógeno de testosterona. Em contrapartida, tão importante quanto conhecer os riscos associados ao tratamento com testosterona, é conhecer também os possíveis benefícios associados ao uso desse androgênio para o organismo feminino sobretudo para aquelas mulheres que utilizam o tratamento clinicamente (*e.g.* como forma de suprir a diminuição desse androgênio com o avançar da idade na fase de menopausa, ou para o tratamento da SOP).

Outro aspecto importante deste estudo é o fato de que associado ao tratamento com testosterona foi utilizado o tratamento com contraceptivo nas fêmeas

de macaco-prego. Considerando-se que o uso dessa associação tem sido verificada para um número considerável de mulheres atualmente, os resultados aqui obtidos são fundamentais para uma possível elucidação desses efeitos combinados sobre o ciclo menstrual em fêmeas de uma espécie de primata, que fisiologicamente apresenta aspectos de sua fisiologia bem semelhantes às mulheres.

No presente estudo, o uso destes tratamentos trouxe mudanças nas concentrações de testosterona, E1, DHT e de cortisol, no TP e no comportamento sexual e não-sexual (agonístico e estereotípias) das fêmeas de macaco-prego. Em contrapartida, não foram observados efeitos do T+CHC sobre os parâmetros fisiológicos de (SHBG, número de plaquetas, fibrinogênio, TTPa, HG, Glo, lipídios, e gonadotrofinas) o que permite inferir a segurança de seu uso para as doses e períodos utilizadas nos respectivos tratamentos, e minimiza potencialmente seus riscos.

Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo podem ser relevantes para futuras pesquisas que tenham como proposta avaliar a ação do tratamento de testosterona em usuárias de CHC. Pelo menos em fêmeas de macaco-prego, foram observadas alterações em alguns dos parâmetros fisiológicos mesmo administrando testosterona pela via intranasal e com doses menores que as das descritas na literatura. Dessa forma, é necessário divulgar os resultados obtidos como alerta às usuárias destes tratamentos associados, pois podem ocorrer alterações significativas, como alterações hormonais e nos fatores de coagulação sanguínea, que podem ser importantes na homeostasia feminina. Neste contexto, faz-se necessário a realização de um monitoramento nas mulheres antes, durante e depois do tratamento com testosterona, que pode ajudar na identificação de riscos desnecessários à saúde ou auxiliar a decisão de utilizar o tratamento ou não como adjuvante para condições clínicas que requerem a suplementação por testosterona.

8. EFEITOS DO USO PROLONGADO DE TESTOSTERONA ASSOCIADO AO CHC SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DAS FÊMEAS JOVENS E ADULTAS DE MACACO-PREGO

Na medida em que havia diferença entre a idade das fêmeas de macaco-prego que participaram do estudo, o intuito desta sessão foi analisar o tratamento prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas adultas e jovens de macaco-prego. Neste sentido, serão apresentados os resultados e a discussão dos dados referentes à idade das fêmeas.

8.1. Resultados dos efeitos do tratamento prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego

8.1.1. Estradiol e Estrona

Os valores de E2 das fêmeas adultas foram maiores que o das jovens na fase LB, CHC e TT ($p < 0,05$) (Figura 24-A). Entretanto, para os valores de E1 não houve diferenças observáveis entre as fêmeas jovens e adultas ($F_{1,187} = 1,03$; $p = 0,11$) (Figura 24-B).

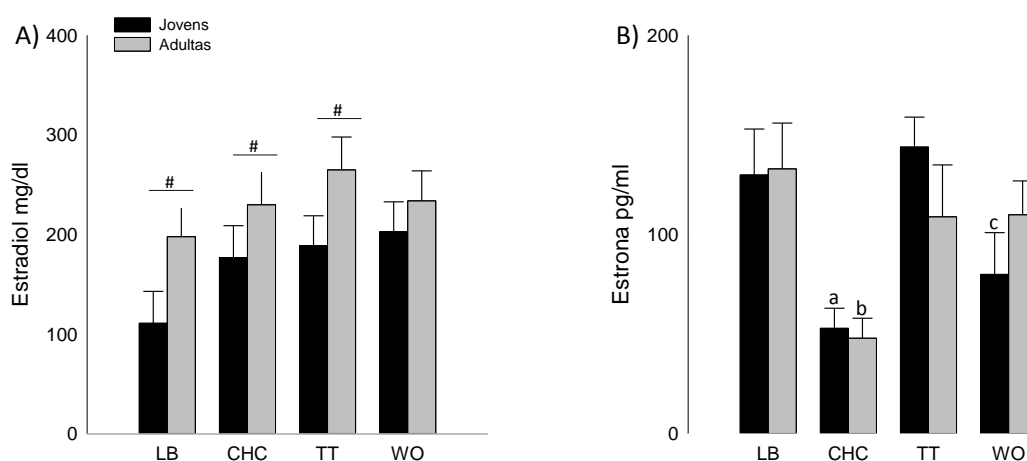


Figura 24- Médias (\pm EPM) A) estradiol (E2) mg/dl e B) estrona (E1) (pg/ml) analisadas nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens ($n=5$) e adultas ($n=7$) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

^a $p < 0,05$ CHC vs todas as demais no grupo das jovens

^b $p < 0,05$ CHC vs todas as demais no grupo das adultas

^c $p < 0,05$ WO vs TT no grupo das jovens

#=diferença entre as fêmeas jovens e adultas nas fases indicadas.

Para as fêmeas jovens, valores de E2 não foram diferentes nas distintas fases experimentais ($p > 0,05$) (Figura 24-A). No entanto, as concentrações de E1 apresentaram redução na fase CHC ($p < 0,05$), e diferenças entre as fases TT e WO ($p = 0,04$) (Figura 24-B). Nas fêmeas adultas também não foram encontradas diferenças nos valores de E2 ao longo das fases experimentais ($p > 0,05$) (Figura 24-A), porém houve redução dos valores de E1 na fase de CHC $p < 0,05$ (Figura 24-B).

8.1.2. Testosterona e DHT

Não foram verificadas diferenças entre os grupos de fêmeas jovens e adultas para as concentrações de testosterona ($F_{1,187} = 0,37$; $p = 0,89$) e DHT ($F_{1,187} = 0,97$; $p = 0,90$) (Figura-25). Também é possível observar que ambos os grupos, ou seja, das fêmeas jovens e das adultas apresentaram aumentos nas concentrações de testosterona (Figura 25-A) e DHT (Figura 25-B) nas fases TT e WO ($p < 0,05$).

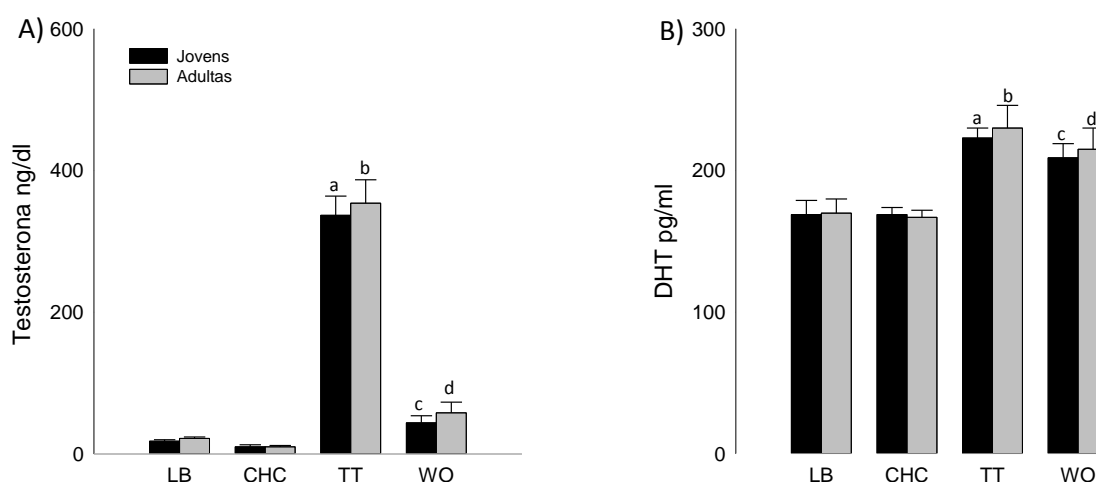


Figura 25- Média (\pm EPM) A) testosterona ng/dl e B) DHT(pg/ml) analisadas nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens ($n=5$) e adultas ($n=7$) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

^a $p < 0,05$ LB vs todas as demais fases no grupo das jovens

^b $p < 0,05$ vs todas as demais fases no grupo das adultas

^c $p < 0,05$ LB vs todas as demais fases no grupo das jovens

^d $p < 0,05$ vs todas as demais fases no grupo das adultas

8.1.3. Cortisol

Foram observadas diferenças entre as concentrações de cortisol das fêmeas jovens e adultas ao longo de todas as fases experimentais ($F_{1,187} = 24,04$; $p = 0,001$).

Isso porque as fêmeas jovens apresentaram concentrações mais elevadas de cortisol em todas as fases (Figura 26). Nesta mesma figura, é possível verificar que, para as jovens, houve um aumento das concentrações de cortisol nas fases TT e WO ($p < 0,05$); no entanto, nas fêmeas adultas, este aumento ocorreu apenas na fase WO ($p < 0,05$).

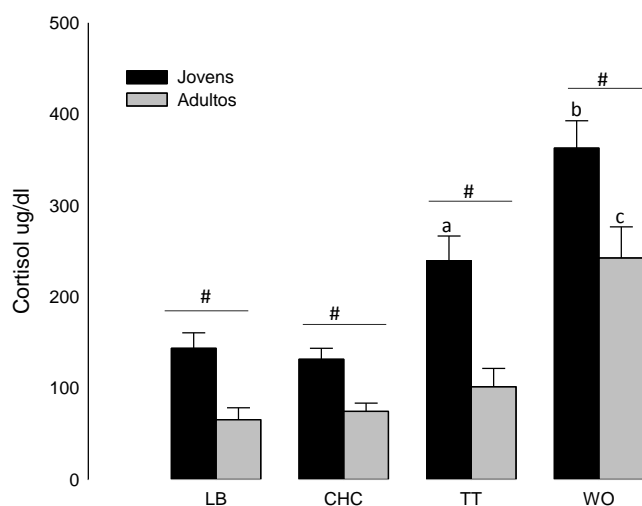


Figura 26- Média (\pm EPM) cortisol (ug/dl) analisada nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens ($n=5$) e adultas ($n=7$) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

^a $p < 0,05$ TT vs demais fases no grupo das jovens

^b $p < 0,05$ WO vs demais fases no grupo das jovens

^c $p < 0,05$ WO vs demais fases no grupo das adultas

$p < 0,05$ Fêmeas jovens vs adultas nas fases indicadas.

8.1.4. Protrombina e Tromboplastina

Os resultados apontaram diferenças entre os grupos das fêmeas jovens e adultas no tempo de TP ($F_{1,187} = 6,54$; $p = 0,03$) e TPPa ($F_{1,187} = 12,93$; $p = 0,001$). As diferenças no tempo TPPa entre os grupos aconteceram nas fases LB, TT e WO ($p < 0,05$) (Figura 27-A); já no TP aconteceram nas fases LB e WO ($p < 0,05$) (Figura 27-B). Ambos os grupos apresentaram redução dos tempos de TP e TPPa na fase CHC ($p < 0,05$), e aumentos no TPPa nas fases T e WO ($p < 0,05$), conforme apresentado na (Figura 27).

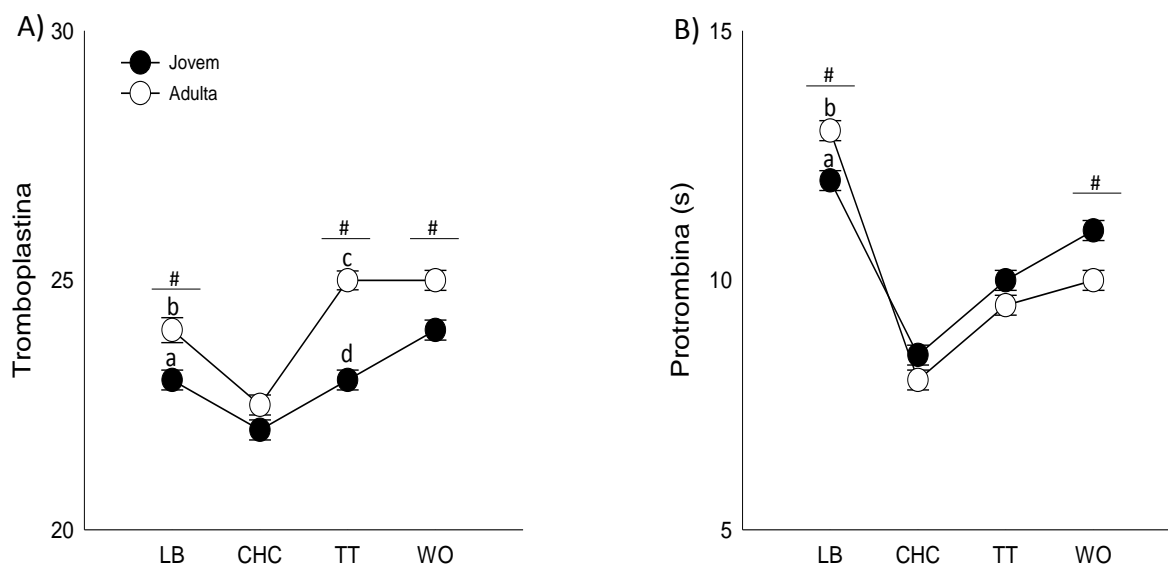


Figura 27- Média (\pm EPM) A) Tempo de tromboplastina (s) e B) Tempo de protrombina (s) analisada nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens ($n=5$) e adultas ($n=7$) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

^a $p < 0,05$ CHC vs demais fases no grupo das jovens

^b $p < 0,05$ CHC vs demais fases no grupo das adultas

^c $p < 0,05$ CHC vs demais fases no grupo das jovens

^d $p < 0,05$ CHC vs demais fases CHC e TT grupo das adultas

$p < 0,05$ Fêmeas jovens vs adultas nas fases indicadas.

8.1.5. Plaquetas e Fibrinogênio

Não há diferenças no número de plaquetas ($F_{1,187}=1,06$; $p=0,54$) e nos valores de fibrinogênio ($F_{1,187}=0,26$; $p=0,89$) entre os grupos das jovens e adultas (Figura 28), embora ambos os grupos tenham apresentado aumento do número de plaquetas na fase de CHC ($p < 0,05$) (Figura 28-A). Ainda é possível observar que as concentrações de fibrinogênio não apresentaram diferenças para nenhum dos grupos analisados ($p > 0,05$) (Figura 28-B). Também não houve diferenças entre o grupo das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego ao longo de todas as fases (Figura 28-B).

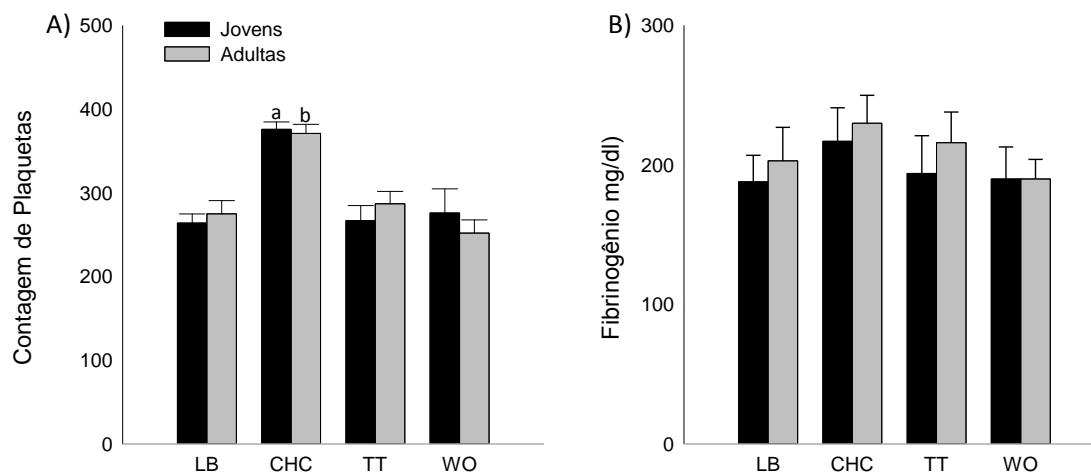


Figura 28- Média (\pm EPM) A) plaquetas (5 mil/nm³) e B) fibrinogênio (mg/dl) nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

^a p<0,05 CHC vs demais fases no grupo das jovens

^b p<0,05 CHC vs demais fases no grupo das adultas

8.1.6. Lipídios e Hemoglobina

As concentrações de lipídios foram maiores nas fêmeas adultas nas fases CHC, TT e WO ($F_{1,187}=4,27$; $p=0,03$). Já as de hemoglobina não foram diferentes entre as fêmeas jovens e adultas ($F_{1,187}=0,29$; $p=0,29$) (Figura 29). Os valores de lipídios sofreram elevação nas fêmeas adultas nas fases TT e WO ($p<0,05$); entretanto, as fêmeas jovens apresentaram redução nas fases CHC, TT e WO ($p<0,05$) (Figura 29-A). Para as concentrações de hemoglobina não foram encontradas diferenças nos grupos em nenhuma das fases observadas ($p>0,05$) (Figura 29-B).

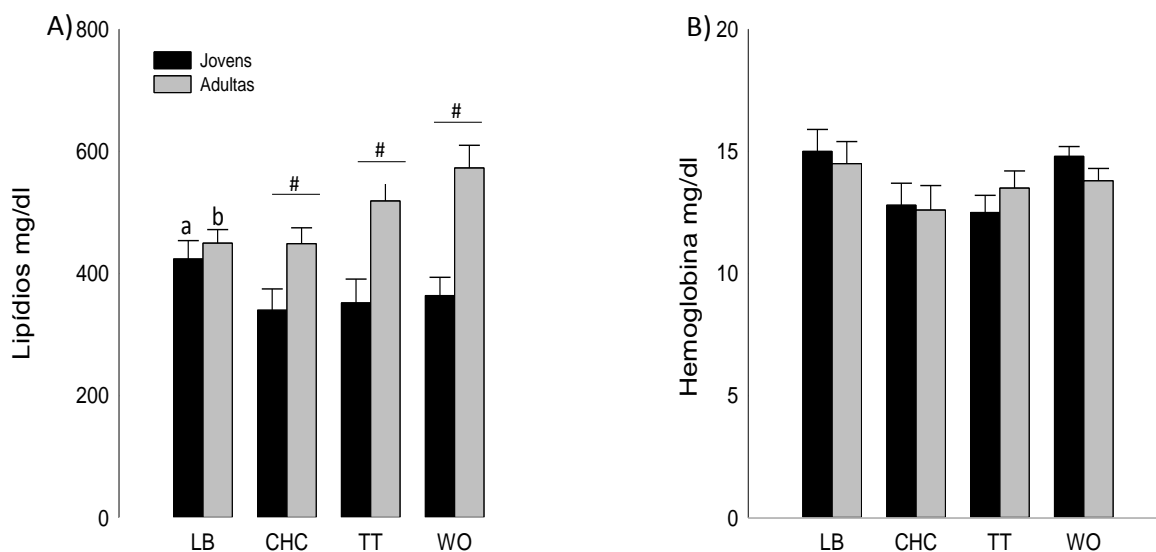


Figura 29- Média (\pm EPM) A) lipídios (mg/dl) e B) hemoglobina (mg/dl) nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens ($n=5$) e adultas ($n=7$) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

^a $p < 0,05$ LB vs demais fases no grupo das jovens

^b $p < 0,05$ LB vs TT e WO no grupo das adultas

$p < 0,05$ Fêmeas jovens vs adultas nas fases indicadas.

8.2. Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao contraceptivo hormonal sobre os aspectos comportamentais das jovens e adultas de macaco-prego

Na tabela 9, é possível verificar que a frequência de comportamento sexual das jovens e das adultas foi diferente nas fases CHC ($F_{1,21}=3,18$; $p=0,05$), TT ($F_{1,21}=4,03$; $p=0,04$) e WO ($F_{1,21}=5,02$; $p=0,02$), visto que as adultas apresentaram maior frequência destes comportamentos nestas fases experimentais. Já no que se refere ao comportamento não-sexual, as fêmeas jovens apresentaram maior média do agonístico nas fases TT ($F_{1,21}=9,98$; $p=0,005$) e WO ($F_{1,21}=4,78$; $p=0,04$), quando comparadas às adultas. Não houve diferenças entre as médias dos comportamentos de estereotípias e de catação dos grupos durante as fases experimentais ($p > 0,05$).

Em ambos os grupos, foram encontradas as maiores médias dos comportamentos sexual nas fases TT e WO ($p < 0,05$); nas fêmeas jovens, o comportamento agonístico também teve os maiores valores nas fases de TT e WO ($p < 0,05$). Porém, os demais parâmetros comportamentais não foram diferentes durante as fases experimentais em nenhum dos dois grupos monitorados ($p > 0,05$), conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 9- Média (\pm EPM) comportamento sexual (frequência) e dos comportamentos estereotípias, agonístico e catação (duração em horas) nas fases de LB (Linha de base), CHC (Contraceptivo Hormonal Combinado), TT (tratamento com T+CHC) e WO (intervalo do tratamento de T ou sem T) nas fêmeas jovens (n=5) e adultas (n=7) de macaco-prego (*Sapajus libidinosus*).

Grupo	Comportamento	LB	CHC	TT	WO
J	Sexual	0,10 (\pm 0,1)	0,27 (\pm 0,4) [#]	7 (\pm 0,99) ^{a#}	3 (\pm 2) ^{b#}
A		0,33 (\pm 0,1)	1,31 (\pm 0,3)	13 (\pm 2) ^a	8,8 (\pm 2) ^b
J	Estereotípias	134 (\pm 57)	305 (\pm 91)	101 (\pm 0,1)	81 (\pm 30)
A		79 (\pm 50)	126 (\pm 80)	18 (\pm 36)	19 (\pm 26)
J	Agonístico	50 (\pm 42)	42 (\pm 25)	575 (\pm 111) ^c	569 (\pm 97) ^d
A		42 (\pm 37)	11 (\pm 22)	107 (\pm 129)	192 (\pm 113)
J	Catação	52 (\pm 26)	34 (\pm 22)	24 (\pm 40)	60 (\pm 35)
A		23 (\pm 16)	44 (\pm 19)	73 (\pm 65)	73 (\pm 57)

^a p<0,05 sexual fase TT vs LB e WO

^b p<0,05 sexual fase WO vs LB e CHC

^c p<0,05 agonístico fase TT vs LB e CHC

^d p<0,05 agonístico fase WO vs LB e CHC

p<0,05 sexual jovens vs adultas

8.3. Discussão

Efeitos do uso prolongado de testosterona associado ao CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das jovens e adultas de macaco-prego

A idade é um fator determinante na avaliação dos esteroides sexuais, com o passar do tempo são encontradas alterações hormonais, morfológicas e comportamentais nos animais (Hansen *et al.*, 2008; Perheentupa e Huhtaniemi, 2009; Nappi *et al.*, 2010). Sendo assim, tornou-se relevante a análise dos dados fisiológicos e comportamentais considerando a idade das fêmeas de macaco-prego. Neste contexto, é importante mencionar que a idade das macacas jovens foi, precisamente, determinada nos seus registros de nascimento do plantel do CP-UnB. No entanto, as macacas adultas tiveram a idade estimada com base nos registros, que indicam que elas já chegaram ao CP-UnB adultas. Desta forma, a idade das macacas adultas foi estimada com base nestas informações somada ao tempo em que essas fêmeas encontram-se mantidas no CP. Sendo assim, nossa estimativa é que estas macacas tenham aproximadamente 18 anos, no entanto, não descartamos a possibilidade de essa idade ser superior.

Em consideração ao mencionado, nosso objetivo foi avaliar os efeitos dos tratamentos de CHC e T+CHC sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego. Neste sentido, o tratamento de CHC nas macacas parece ter apresentado efeitos semelhantes, uma vez que, independentemente da idade, ambos os grupos apresentaram semelhanças nas concentrações dos esteroides sexuais. Os resultados apontaram para uma redução nas concentrações de E1 (Figura 24-B), porém as concentrações de E2 (Figura 24-A), testosterona e DHT (Figura 25) não apresentaram alterações. Os efeitos do tratamento conjunto de T+CHC na fisiologia hormonal também foram semelhantes já que, em ambos os grupos, houve elevação das concentrações E1 (Figura 24-B), testosterona e DHT (Figura 25) na fase TT. Todavia os valores de E2 (Figura 24-A) não foram alterados.

Também foram feitas análises entre os grupos das fêmeas jovens e adultas ao longo de todas as fases experimentais. Os resultados demonstraram que não há diferenças nos valores dos esteroides sexuais E1 (Figura 24-B), testosterona e DHT (Figura 25 A-B). Entretanto, os valores de E2 foram maiores nas fêmeas adultas nas fases LB, CHC e TT. É importante evidenciar que, em mulheres, os principais indicativos da aproximação da senescência reprodutiva são as elevações nas concentrações de E2 e do FSH ao longo do ciclo menstrual (Nappi *et al.*, 2010). Assim, é possível que as concentrações elevadas de E2 encontradas nas fêmeas de macaco-prego sejam decorrentes do envelhecimento reprodutivo, que são associados ao envelhecimento natural do organismo.

Em mulheres, as concentrações de E2 encontram-se elevadas na fase perimenopausa, ou seja, a que antecede a menopausa (encerramento dos ciclos menstruais) (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009). Já no período da menopausa há declínio acentuado nas concentrações de E2 devido ao envelhecimento ovariano (Shaw *et al.*, 2011). Ressalta-se ainda que não apenas as mulheres apresentam alterações nos parâmetros hormonais; há também elevação de FSH e E2 em fêmeas senescentes de chimpanzés (Jones *et al.*, 2007) rhesus (Kim *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2005) e babuínos (Atsalis e Videan, 2009). Sendo assim, faz-se necessária a análise do FSH na caracterização do envelhecimento reprodutivo das fêmeas de macaco-prego do CP-UnB. Contudo, nossos resultados apontam para a elevação de E2, que pode ser um parâmetro usado como inferência do envelhecimento.

Do ponto de vista biológico, as flutuações mensais dos esteroides sexuais são indicativos da fase reprodutiva nas fêmeas (Burger *et al.*, 2002). Em mulheres, esta fase tem duração média de 35 anos (Roberts, 2007). No entanto, o início do envelhecimento reprodutivo acontece bem antes do período denominado de menopausa; já que há indicativos de senescência reprodutiva em mulheres jovens, antes mesmo dos 30 anos de idade (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009). De acordo com os estudos de Rooij *et al.* (2005) e Broekmans (2009), por volta dos 25 anos de idade já são registrados declínios acentuados no número de folículos ovarianos, entretanto, essa redução ainda não afeta a fertilidade, que apresenta alterações significativas mesmo depois dos 35 anos de idade (Perheentupa e Huhtaniemi, 2009). Além disso, embora sem sinais perceptíveis à mulher, alterações sutis na secreção hormonal ocorrem antes da menopausa como, por exemplo, a elevação FSH, e conseqüentemente, mudanças na secreção dos hormônios ovarianos (Santoro e Randolph, 2011).

Outro parâmetro hormonal que pode ser apontado como indicativo do envelhecimento é o hormônio cortisol. Normalmente os indivíduos idosos apresentam concentração de cortisol menor que os jovens (Gust *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2001). A redução na concentração de cortisol é justificada pela diminuição na secreção CRH, que compromete assim as concentrações de cortisol. É importante lembrar que a síntese do cortisol é estimulada pelo ACTH, que se encontra regulado pelo CRH hipotalâmico, (Helhammer *et al.*, 2009). Imediatamente após sua liberação na corrente sanguínea, o hormônio ACTH inicia seus efeitos sobre as camadas corticais das adrenais, estimulando principalmente a secreção de hormônios glicocorticoides e mineralocorticóides. Esses hormônios agem periféricamente exercendo importantes efeitos na regulação do metabolismo glicídico, no equilíbrio hidrossalino e nos processos inflamatórios e imunológicos, respondendo ainda pela retroalimentação negativa a nível hipofisário e hipotalâmico (Gust *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2001).

Ressalta-se ainda que o envelhecimento promove mudanças morfológicas, que comprometem a atividade e a regulação do eixo HHA. Um desses efeitos recai sobre a ativação excessiva do HHA, e conseqüentemente ocorrem alterações na secreção dos hormônios adrenais (Magri *et al.*, 2001). De acordo com Garrido *et al.* (2012), as alterações no HHA são decorrentes das mudanças morfológicas e fisiológicas em termos das regiões hipotalâmicas decorrentes do processo natural do

envelhecimento. Em indivíduos idosos, a redução de cortisol pode também ser justificada devido ao retorno lento das concentrações basais da ACTH, já que este é três vezes mais lento em idosas que em mulheres jovens (Veldhuis *et al.*, 2013).

É interessante mencionar que, em ratas (Garrido *et al.*, 2012) e em macacas rhesus (Gust *et al.*, 2000) também são registradas alterações na secreção de cortisol em indivíduos idosos. Neste contexto, nossos resultados corroboram os encontrados por estes autores, pois fêmeas de macaco-prego adultas apresentaram, ao longo de todas as fases experimentais, concentrações menores de cortisol (média de 107 ug/dl) do que as encontradas nas fêmeas jovens (média 218 ug/dl). Este resultado corrobora o encontrado por Lahoz *et al.* (2007), que também descreveu concentrações maiores de cortisol em fêmeas jovens (média 218 ug/dl) que adultas (128 ug/dl) de macaco-prego. No entanto, vale mencionar que, nas fases TT e WO, as fêmeas do nosso estudo apresentaram os maiores valores de cortisol, possivelmente decorrentes do TT.

Embora a idade seja um fator influenciador das concentrações de cortisol (Gust *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 2012; Veldhuis *et al.*, 2013), em macaco-prego, as concentrações de cortisol também podem ser sensíveis às variações circadianas, ao acesso ao alimento, aos parceiros sexuais, à hierarquia reprodutiva e às variações ambientais (temperatura, seca, chuva etc) (Carnegie *et al.*, 2011). Outra condição que deve ser analisada é o fato de se manter os animais em cativeiro, fato que pode também promover a elevação de cortisol e assim, causar alterações comportamentais (Sapolsky *et al.*, 2002; Foerster *et al.*, 2010). Muito embora, com a exposição repetida ao estresse, representado muito possivelmente pelo experimentador e pela manutenção em condições cativas, o organismo habitue-se ao estressor, isto também pode promover a manutenção das concentrações de cortisol elevadas (Koch *et al.*, 2014).

Além do mais, o estresse pode estar relacionado ao ciclo menstrual, porque as concentrações de cortisol são sincronizadas aos demais hormônios ovarianos, sendo que as concentrações maiores de cortisol ocorrem na fase pré-ovulatória (Wolfram *et al.*, 2011), inclusive em fêmeas de macaco-prego (Carnegie *et al.*, 2011). Sabe-se que, nesta fase do ciclo menstrual, também são registrados aumentos expressivos nas concentrações de testosterona e E2, que são essenciais para ovulação (Fragaszy *et al.*, 2004; Carnegie *et al.*, 2005; Carosi *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2011), além de maior emissão dos comportamentos sexuais (Carnegie *et al.*,

2005; Carosi *et al.*, 2005). Estas alterações hormonais e comportamentais estão correlacionadas às alterações comportamentais exibidas por fêmeas de macaco-prego (Fragaszy *et al.*, 2004; Carnegie *et al.*, 2005; Carosi *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2011).

Em ratos, concentrações elevadas de E2 conferem resistência ao estresse (Koch *et al.*, 2014). De acordo com Luine *et al.* (2007), ratas ooforectomizadas são mais ansiosas, e a reposição estrogênica reduz o estado de estresse neste grupo. Desta forma, os estrógenos, principalmente o E2, podem assim ter um papel fundamental no controle do estresse e dos níveis de cortisol, exercendo, então, um papel ansiolítico no organismo. Este dado pode ser transposto para o estudo em questão, pois as macacas adultas também apresentaram maiores concentrações de E2 e redução de cortisol. Por outro lado, as jovens apresentaram menores concentrações de E2 e maiores de cortisol.

O estresse pode ser avaliado pelas alterações nos comportamentos estereotipados e agonísticos dos animais. Ambos foram avaliados no presente estudo. Embora estes comportamentos não tenham sido diferentes entre os grupos das jovens e das adultas, é possível notar que as jovens apresentaram, numericamente, maiores expressões destes comportamentos em todas as fases do experimento. Além do mais, as fêmeas jovens apresentaram maior taxa de comportamentos estereotipados nas fases TT e WO (Figura 26), e estes são coincidentes aos maiores valores de cortisol (Tabela 9).

Foi também objetivo do nosso estudo avaliar a concentração de outros parâmetros fisiológicos, possivelmente afetados pelos tratamentos ora utilizados, tais como: TP, TTPa, plaquetas e fibrinogênio e também as concentrações de hemoglobina e de lipídios. É possível observar que, na fase CHC, houve redução dos TP e TTPa (Figura 27) e aumento do número de plaquetas (Figura 28-A) para ambos os grupos. Já os valores de fibrinogênio não apresentaram diferenças (Figura 28-B). Reiteramos que o estrógeno presente na composição do CHC pode trazer alterações e até complicações na homeostase hemolítica (Ashraf *et al.*, 2012; Dragoman, 2014). Desta forma, os resultados do nosso estudo demonstram que houve alterações em alguns destes parâmetros (plaquetas, TP e TTPa), independentemente da idade das macacas.

Os resultados demonstraram diferenças nos TTPa e TP entre as fêmeas jovens e adultas, pois foi registrado menor tempo de TTPa nas fases LB, TT e WO

(Figura 27-A) nas jovens, e de TP (Figura 27-B) nas fases LB e WO nas macacas adultas. Sabe-se que o envelhecimento traz consequências à homeostasia hemolítica. Entre as várias alterações observadas durante o envelhecimento, como as cardiovasculares, morfológicas, entre outras, também pode-se acrescentar a redução do tempo de formação de coágulos encontrados nos indivíduos idosos (Bolliger *et al.*, 2012). Evidencia-se, ainda, que a redução no tempo de coagulação traz graves consequências ao sistema hemolítico, pois são observados aumentos na concentração de fibrinogênio com o avançar da idade (Ferrucci *et al.*, 2005; Bolliger *et al.*, 2012)

Embora nossos resultados não tenham demonstrado aumento na concentração de fibrinogênio nas fêmeas de macaco-prego, os TPPa e TP apresentaram alterações entre os grupos das fêmeas jovens e adultas de macaco-prego. Este resultado reforça a ideia de que as macacas adultas, possivelmente, estejam sofrendo mudanças fisiológicas decorrentes do envelhecimento. Outra justificativa para esta hipótese são os altos níveis de lipídios encontrados no grupo das macacas adultas, visto que a concentração foi maior nas fases CHC, TT e WO. Sabe-se que, nas mulheres, a concentração de lipídios é afetada tanto na perimenopausa como na menopausa (Wiacek *et al.*, 2001). Nestas fases, são registrados aumento do peso corporal e elevação na concentração de lipídios (Hagner *et al.*, 2009).

Em suma, é possível enfatizar que os resultados obtidos sobre a concentração de E2, cortisol, TP, TPPa e lipídios indiquem diferenças entre as fêmeas adultas e jovens de macaco-prego. São necessários, portanto, estudos que avaliem estes resultados sem os tratamentos hormonais, uma vez que eles podem comprometer os resultados. Porém, é possível que as macaco-prego estejam apresentando parâmetros fisiológicos senescentes, já que tais resultados corroboram os obtidos em ratas (Garrido *et al.*, 2012) e em macacas rhesus (Gust *et al.*, 2000) e inclusive, em mulheres (Bolliger *et al.*, 2012; Gust *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 2012; Veldhuis *et al.*, 2013). Deste modo, os resultados aqui apresentados indicaram diferenças em vários padrões fisiológicos das macacas que possivelmente são decorrentes da idade. Assim, é possível concluir que os efeitos sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais da administração de CHC e de T+CHC sejam semelhantes em fêmeas jovens e adultas.

9. CONCLUSÕES

Com base em nosso conhecimento este estudo é o primeiro a descrever os efeitos da administração de contraceptivo hormonal injetável em fêmeas de macaco-prego. Da mesma forma, não temos conhecimento sobre outros estudos que tenham investigado o uso de testosterona associado ao contraceptivo hormonal neste tipo de modelo animal, uma vez que não há na literatura outros resultados descrevendo tais efeitos, na espécie aqui estudada. Nesse sentido, nossos resultados são relevantes para melhor compreensão dos mecanismos de ação do tratamento isolado de contraceptivo hormonal, assim como a associação dos tratamentos de testosterona ao contraceptivo sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais considerando as similaridades fisiológicas, que estas macacas compartilham com mulheres.

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos podemos considerar que:

- I. Foi observado um efeito do tratamento de CHC nos parâmetros fisiológicos das macacas, uma vez que as concentrações de E1 foram reduzidas e as E2 mantiveram-se constantes. De forma similar aos efeitos da administração de CHs em mulheres, foram observadas alterações nos parâmetros de coagulação sanguínea (e.g. número de plaquetas e nos tempos de protrombina e tromboplastina) nas fêmeas de macaco-prego submetidas ao tratamento com CHC, o que aponta para o uso da espécie como modelo viável para estudos futuros sobre o tema.
- II. Mesmo que reduzida se comparada a outros estudos (Tavares *et al.*, 2007; Topic *et al.*, 2007) a dose de testosterona associada ao CHC promoveu mudanças nas concentrações dos esteroides E1, T, DHT e cortisol. Todos estes parâmetros apresentaram aumentos para as fêmeas tratadas nos grupos experimental e controle contrabalanceados.
- III. As concentrações de E2 mantiveram-se, praticamente, constantes em todas as fases dos experimentos. Acreditamos que o E2 tenha permanecido nestas condições devido ao tratamento do CHC. Muito embora não se possa excluir

- a possibilidade, que tenha havido conversão extragonadal de testosterona em E2.
- IV. Foi observado efeito prolongado nas concentrações de testosterona e de cortisol em ambos os grupos. Nesse sentido, é possível que não haja necessidade da administração diária de testosterona, visto que, mesmo após 10 dias, ainda são verificados o aumento de sua concentração em nível plasmático.
 - V. É razoável supor que tenha havido uma comunicação química, entre as fêmeas de macaco-prego, por meio de pistas olfativas com o aumento das concentrações dos esteroides. Possivelmente, o aumento dos esteroides verificado para o grupo tratado com testosterona tenha sido percebido pelo grupo de comparação, ou seja, que as fêmeas tenham se utilizado de pistas químicas na comunicação intraespecífica. Sabe-se que os primatas comumente comunicam-se por meio dos feromônios, que são liberados pela urina, saliva, fezes e pele (Phillips *et al.*, 2011).
 - VI. Os tratamentos à base do contraceptivo isolado ou do contraceptivo associado à testosterona intranasal nas fêmeas de macaco-prego jovens e adultas parecem ter apresentado efeitos análogos, visto que independentemente da idade, ambos os grupos apresentaram semelhanças nos parâmetros fisiológicos e comportamentais, guardadas as diferenças em termos dos parâmetros fisiológicos de E2, cortisol, TP, TTPa e lipídios das fêmeas adultas como indicativos de senescência.

Finalmente, baseado nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que os tratamentos de CHC e de testosterona associado ao CHC promoveram alterações fisiológicas e comportamentais relevantes nas fêmeas de macaco-prego estudadas. Entretanto, é preciso considerar alguns fatores que podem ter influenciado esses resultados e que merecem novas investigações:

- I. Embora a concentração de 0,24 μ /ml de testosterona utilizada nas macacas estudadas fosse inferior à utilizada em estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com a mesma espécie (0,48 μ /ml) (Tavares *et al.*, 2007 e Topic *et al.*, 2007), os nossos resultados hormonais e comportamentais foram similares aos destes estudos futuros, tais alterações podem ser indícios de doses supra-fisiológicas. Sendo assim, são necessários estudos que avaliem os efeitos de concentrações menores de testosterona sobre estes parâmetros.
- II. Um fator importante que merece atenção é a idade das fêmeas adultas do CP, uma vez que os resultados das análises fisiológicas podem ser deturpados, caso não seja considerada esta variável. Nesse sentido, são necessárias análises dos padrões fisiológicos indicativos de senescência das fêmeas adultas do CP-UnB, pois é possível que estas macacas tenham idade superior à nossa estimativa.
- III. Por último, o fato de fêmeas de macaco-prego usarem pistas olfativas pode ser um fator que influenciou nos resultados hormonais e comportamentais. Nesse sentido, são necessários estudos que busquem minimizar esta comunicação. Para fins de estudos subsequentes é importante que ambos os grupos experimentais e controles sejam submetidos simultaneamente ao tratamento à base de testosterona ou que elas sejam mantidas em cativeiro de modo, que possa impedir essa possível forma de comunicação.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott DH. Behaviourally mediated suppression of reproduction in female primates. *Journal of Zoology*. 213: 455-470, 1987.

Abbott DH, Keverne EB, Bercovitch FB, Shively CA, Mendoza SP, Saltzman W, Snowdon CT, Ziegler TE, Banjevic M, Garland T, Sapolsky RM. Are subordinates always stressed? a comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior*. 43, 67-82, 2003.

Africander D, Verhoog N, Hapgoodb JP. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*. 76: 636-652, 2011.

Albuquerque ACSR, Nascimento MCL, Santos HM, Sousa MB. Função ovariana e adrenocortical de fêmeas adultas do sagui (*Callithrix jacchus*) em relação ao comportamento de emigração. *A Primatologia no Brasil*. 8: 301-316, 2004.

Alencar AI, Sousa MBC, Abbott DH, Yamamoto ME. Contested dominance modifies the anovulatory consequences of social subordination in female marmosets. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39: 647-658, 2006.

Alesci S, Bornstein SR. Neuroimmunoregulation of Androgens in the Adrenal Gland and the Skin. *Hormone Research*. 54: 281-286, 2000.

Alexander GM, Sherwin BB. Sex steroids, sexual behavior and selection attention for erotic stimuli in women using oral contraceptives. *Psychoneuroendocrinology*. 18: 91-102, 1993.

Altmann J. *Observational study of behavior: sampling methods*. University of Chicago. 1 ed: 242-247, 1979.

Asare GA, Santa S, Ngala RA, Asiedu B, Afriyie D, Amoah AGB. Effect of hormonal contraceptives on lipid profile and the risk indices for cardiovascular disease in a Ghanaian community. *Journal of International of Women's Health*. 6: 597-603, 2014.

Ashraf M, Favaloro EJ, Jerry K. Relationship between short activated partial thromboplastin times, thrombin generation, procoagulant factors and procoagulant phospholipid activity. *Blood Coagulation Fibrinolysis*. 23: 203-207, 2012.

- Atsalis S, Videan E. Reproductive aging in captive and wild common chimpanzees: Factors influencing the rate of follicular depletion. *American Journal Primatology*. 71: 271-282, 2009.
- Aujard F, Heistermann M, Thierry B, Hodges JK. Functional significance of behavioral, morphological, and endocrine correlates across the ovarian cycle in semifree ranging female Tonkean macaques. *American Journal of Primatology*. 46: 285-309, 1998.
- Babu SR; Swarna MS, Padmavathi P; Reddy PP. Evaluation of FSH, LH and testosterone levels in different subgroups of infertile males. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 19: 45-49, 2004.
- Bachmann G, Bancroft J, Braunstein G, Burger H, Davis S, Dennesstein L. Female androgen insufficiency: the Princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. *Fertility and Sterility*. 77: 660-665, 2002.
- Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update* 18: 73-91, 2012.
- Bahamondes L, Bahamondes MV. New and emerging contraceptives: a state-of-the-art review. *Journal of Women's Health*. 6. 221-23, 2014.
- Baldani DP, Skrgatic L, Ougouag R. Polycystic Ovary Syndrome: Important Underrecognised Cardiometabolic Risk Factor in Reproductive-Age Women. *International Journal Endocrinology*. 2015: 1-17, 2015.
- Baldassarre M, Giannone FA, Foschini MP, Battagli C, Busacchi P, Venturoli S, Meriggiola MC. Effects of long-term high dose testosterone administration on vaginal epithelium structure and estrogen receptor- α and - β expression of young women. *International Journal of Impotence Research*. 25: 172-177, 2013.
- Bancroft J, Vukadinovic Z. Sexual addiction, sexual compulsivity, sexual impulsivity, or what? Toward a theoretical model. *Journal Sexual Research*. 41: 225-234, 2004.
- Banks WA. Drug Delivery to the Brain in Alzheimer's Disease: Consideration of the Blood-brain Barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64: 629-639, 2012.
- Banks WA, Morley JE, Niehoff ML, Mattern C. Delivery of testosterone to the brain by intranasal administration: Comparison to intravenous testosterone. *Journal of Drug Targeting*. 17: 91-97, 2009.

Banks WA, Kastin AJ. Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems. *Life Sciences*. 48: 117-121, 1991.

Banks WJ. *Histologia Veterinária Aplicada*. São Paulo: Editora Manole. 2° ed. 10-39, 1991.

Basson R, Althof S, Davis S, Fugl-Meyer K, Goldstein I, Leiblum S, Meston C, Rosen R, Wagner G. Summary of the recommendations on sexual dysfunctions in women. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1: 24-34, 2004.

Battaglia C, Nappi RE, Mancini F, Cianciosi A, Persico N, Busacchi P, Facchinetti F, de Aloysio D. Menstrual cycle-related morphometric and vascular modifications of the clitoris. *Journal Sexual Medicine*. 12: 2853-2561, 2008.

Baumeister R. Sexual economics: sex as female resource for social exchange in heterosexual interactions. *Personality and Social Psychology Review*. 8: 339-363, 2004.

Berger J, Heinrichsa M, von Dawansa B, Wayc BM, Chen FS. Cortisol modulates men's affiliative responses to acute social stress. *Psychoneuroendocrinology*. 63: 1-9, 2016.

Bergstrom MI, Fedigan LM. Dominance among female white-faced capuchin monkeys (*Cebus capucinus*): hierarchical linearity, nepotism, strength and stability. *Behaviour*. 147: 899-931, 2010.

Bitzer J, Simon JA. Current issues and available options in combined hormonal contraception. *Contraception*. 84: 342-356, 2011.

Blumenthal PD, Edelman A. Hormonal contraception. *Obstetric and Gynecology*. 112: 670-684, 2008.

Boisseau N, Enea C, Diaz V, Dugué B, Corcuff JB, Duclo M. Oral contraception but not menstrual cycle phase is associated with increased free cortisol levels and low hypothalamo-pituitary-adrenal axis reactivity. *Journal of Endocrinological Investigation*. 36: 955-964, 2013.

Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfusion Medicine Reviews*. 26:1-13, 2012.

Borges ALV, Olorun FO, Fujimori E, Hoga LAK, Tsui AO. Contraceptive use following spontaneous and induced abortion and its association with family planning services in primary health care: results from a Brazilian longitudinal study. *Reproductive Health*. 12: 2-10, 2015.

Bouchard C, Labrie F, Derogatis L, Girard G, Ayotte N, Gallagher J, Cusan J, Archer DF, Portman D, Lavoie L, Beauregard A, Côté I, Martel C, Vaillancourt M, Balsler J, Moyneur R. Effect of intravaginal dehydroepiandrosterone (DHEA) on the female sexual function in postmenopausal women: ERC-230 open-label study. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 25: 181-190, 2016.

Bozzini N, Messina ML, Borsari R, Hilario SG, Pinotti JA Comparative study of different dosages of goserelin in size reduction of myomatous uteri. *Journal American Association Gynecology Laparoscopists*. 11: 462-3, 2004.

Brand JS, Schouw YT. Testosterone, SHBG and cardiovascular health in postmenopausal women. *International Journal of Impotence Research*. 22: 91-104, 2010.

Braunstein GD. Androgen insufficiency in women: summary of critical issues. *Fertility and Sterility*. 77: 94-99, 2002.

Braunstein GD. Safety of testosterone treatment in postmenopausal women. *Fertility and Sterility*. 88:1-17, 2007.

Brasil AF, Ferreira AMR, Moraes IA, Pissinatti A. Study of follicular atresia in *Leontopithecus rosalia* of different status hierarchical. *Revista Universitaria Rural*. 27: 69-71, 2007.

Brito MB, Nobre F, Vieira CS. Hormonal contraception and cardiovascular system. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 96: 81-89, 2011.

Broekmans FJ. Testing for ovarian Reserve in assisted reproduction programs: the current point of view. *Facts Views Vis Obygn*. 1: 79-87, 2009.

Broom DM. Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 27: 22-28, 1996.

Buckler HM, Robertson WR, Wu FCW. Which androgen replacement therapy for women?. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 83: 3920-3924, 1998.

Bulun SE, Lin Z, Imir G, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacology Review*. 57: 359-383, 2005.

Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Progress in Hormone Research*. 57: 257-276, 2002.

Caiafa JS, Bastos M. Programa de profilaxia do tromboembolismo venoso do Hospital Naval Marcílio Dias: um modelo de educação continuada. *Jornal Vascular Brasileiro*. 1: 103-112, 2002.

Campenni M, Manciocco A, Vitale A, Schino G. Exchanging grooming, but not tolerance and aggression in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal Primatology*. 77: 222-228, 2015.

Carnegie SD, Fedigan LM, Ziegler TE. Behavioral indicators of ovarian phase in white-faced capuchins (*Cebus capucinus*). *American Journal Primatology*. 67: 51-68, 2005.

Carnegie SD, Fedigan LM, Ziegler TE: Social and environmental factors affecting fecal glucocorticoids in wild, female white-faced capuchins (*Cebus capucinus*). *American Journal Primatology*. 73: 861-886, 2011.

Caronia LM, Dwyer AA, Hayden D, Amati F, Pitteloud N, Hayes FJ. Abrupt decrease in serum testosterone levels after an oral glucose load in men: implications for screening for hypogonadism. *Clinical Endocrinology*. 78: 291-296, 2013.

Carosi M, Heistermann M, Visalberghi E. Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progesterin levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys. *Hormone and Behavior*. 36: 252-265, 1999.

Carosi M, Visalberghi E. Analysis of tufted capuchin (*Cebus apella*) courtship and sexual behavior repertoire: changes throughout the female cycle and female interindividual differences. *American Journal of Physical Anthropology*. 118: 11-24, 2002.

Carosi M, Linn GS, Visalberghi E. The Sexual Behavior and Breeding System of Tufted Capuchin Monkeys (*Cebus apella*). *Advances in the Study of Behavior*. 35: 105-149, 2005.

- Carré, JM, McCormick CM, Hariri AR. The social neuroendocrinology of human aggression. *Psychoneuroendocrinology*. 36: 935-944. 2011.
- Casare RJ, Freitas CG, Centra LJ. Androgens in poor responders. *Reproduction Climacteric*. 28: 80-85, 2013.
- Cerda-Molina AL, Hernández-López L, Díaz-Díaz G, Mejía-Varas F, Chavira R, Mondragón-Ceballos R. Housing With Females Increases Testosterone and Cortisol Levels in Captive Groups of Black-Handed Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Zoo Biology* 31: 490-497, 2012.
- Cerda-Molina AL, Hernández-López L, Claudio E. , Chavira-Ramírez R, Mondragón-Ceballos R. Changes in Men's Salivary Testosterone and Cortisol Levels, and in Sexual Desire after Smelling Female Axillary and Vulvar Scents. *Endocrinology*. 4: 1-9, 2013.
- Chandra A, Martinez GM, Mosher WD, Abma JC, Jones J. Fertility, family planning, and reproductive health of U. S. women. *National Center for Health Statistics*. 23: 89-95, 2005.
- Chiaffarino F, Chatenoud L, Dindelli M, Meschia M, Buonaguidi A, Amicarelli F, Surace M, Bertola E, Di Cintio E, Parazzini F. Reproductive factors, family history, occupation and risk of urogenital prolapse. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 82: 63-67, 1999.
- Cid MC, Schnaper HW, Kleinnan HK, Estrogens and the vascular endothelium, *American Journal Cardiology*. 90: 11-16, 2002.
- Ciocca DR, Roig LMV. Estrogen receptor in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Reviews*. 16: 35-57, 1995.
- Cobey KD, Klipping C, Buunk AP. Hormonal contraceptive use lowers female intrasexual competition in pair-bonded women. *Evolution and Human Behavior*. 34: 294-298, 2013.
- Coelho CG, Falótico T, Izar P, Mannu M, Resende BD, Siqueira JO, Ottoni EB. Social learning strategies for nut-cracking by tufted capuchin monkeys (*Sapajus* spp). *Animal Cognition*. 18: 911-919, 2015.
- Davis AR, Castano PM. Oral contraceptives and libido in women. *Annual Review of Sexual Research*. 15: 297-320, 2004.

Davis SR, Moreau M, Kroll R, Bouchard C, Panay N, Gass M, Braunstein GD, Hirschberg AL, Rodenberg C, Pack S, Koch H, Moufarege A, Studd J. Testosterone for low libido in postmenopausal women not taking estrogen. *The New England Journal of Medicine*. 359: 2005-2017, 2008.

Davis SR, Davison SI. Current perspectives on testosterone therapy for women. *Menopausal Medicine*. 20: S1-S4, 2012.

Davis SR, Worsley R, Miller KK, Parish SJ, Santoro N. Androgens and Female Sexual Function and Dysfunction—Findings From the Fourth International Consultation of Sexual Medicine. *The Journal of Sexual Medicine*. 13: 168-178, 2016.

De Paula FJF, Soares Jr. JM, Haidar MA, Lima GR, Baracat EC. The benefits of androgens combined with hormone replacement therapy regarding to patients with postmenopausal sexual symptoms. *Maturitas*. 56: 69-77, 2007.

DeBruine L, Jones BC, Haselton MG, Perrett DI. Evidence for Menstrual Cycle Shifts in Women's Preferences for Masculinity: A Response to Harris (in press) "Menstrual Cycle and Facial Preferences Reconsidered". *Evolutionary Psychology*. 8: 768-775, 2010.

Debinski W, Tatter SB. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 9: 1519-1527, 2009.

Dennerstein VWM, Wauthoz N, Rosière R, Amighi K, Mathieu V, Lefranc F, van Gool SW, Vleeschouwer S. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM?. *Cancers*. 5: 1020-1048, 2013.

Denson TF, DeWall CN, Finkel EJ. Self-Control and Aggression. *Current Directions in Psychological Science*. 21: 20-25, 2012.

Di Bitetti M, Janson CH. Reproductive socioecology of tufted capuchins (*Cebus apella nigritus*) in northeastern Argentina. *International Journal of Primatology*. 22: 127-142, 2001.

Dimitrakakis C, Zhou J, Bondy CA. Androgens and mammary growth and neoplasia. *Fertility and Sterility*. 77: 26-33, 2002.

Domingues SFS, Caldas-Bussier MC. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. 30: 57-71, 2007.

Cayan F, Dilek U, Pata Ö, Dilek S. Comparison of the Effects of Hormone Therapy Regimens, Oral and Vaginal Estradiol, Estradiol+Drospirenone and Tibolone, on Sexual Function in Healthy Postmenopausal Women. *The Journal Sexual Medicine*. 5: 132-138, 2008.

Dragoman MV. The combined oral contraceptive pill- recente developments, risks and benefits. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 30: 1-10, 2014.

Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reproduction Biology Endocrinology*. 4: 1-11, 2006.

Edelman A, Jensen JT, Bulechowsky M, Cameron J. Combined oral contraceptives and body weight: do oral contraceptives cause weight gain? A primate model. *Human Reproduction*. 26: 330-336, 2010.

Edwards DA, Casto KV. Women's intercollegiate athletic competition: Cortisol, testosterone, and the dual-hormone hypothesis as it relates to status among teammates. *Hormones and Behavior*. 64: 153-160, 2013.

Edwards AD, O'Neal JL. Oral contraceptives decrease saliva testosterone but do not affect the rise in testosterone associated with athletic competition. *Hormones and Behavior*. 56: 195-198, 2009.

Ekholm UB, Turkmen S, Hammarbäck S, Bäckström T. Sexuality and androgens in women with cyclical mood changes and pre-menstrual syndrome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 93: 248-255, 2014.

Elmlinger MW, Kuhnel W, Ranke MB. Reference ranges for sérum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone (DHEA-S), cortisol and ferritin in neonates, children and Young adults. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 40: 1151-1160, 2002.

Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. The origins of age-related proinflammatory state *Blood*. 105: 2294-2299, 2006.

Filho GB. Bogliolo Patologia Geral. In Capítulo 6- Distúrbios da Circulação (Konradin Metz) 97-130. Editora Guanabara Koogan: 3ed, 2008.

Fooladi E, Robin J. Bell MBBS, Fiona J, Penelope J. Robinson MB, Kulkarni J, Davis SR. Testosterone Improves Antidepressant-Emergent Loss of Libido in Women: Findings from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal Sexual Medicine*. 11: 831-839, 2014.

Ferrari, E., et al. Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *European Journal of Endocrinology*. 144: 319-329, 2001.

Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. The origins of age-related proinflammatory state. *Journal Blood*. 105: 2294-2299, 2005.

Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertility and Sterility*. 71: 405-414, 1999.

Filho GB. Bogliolo Patologia Geral. *In: Distúrbios da Circulação*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 3 ed: 99-101, 2008.

Finotti MCCF. Síndrome de insuficiência androgênica na mulher: diagnóstico e implicações terapêuticas. *Brasília Médica*. 50: 312-317, 2013.

Fisberg RM, Stella RH, Morimoto JM, Pasquali LS, Philippi ST, Rosário MD. Latorre O. Perfil lipídico de estudantes de nutrição e a sua associação com fatores de risco para doenças cardiovasculares. *Arquivos Brasileiros Cardiologia*. 76: 137-142, 2001.

Flegal KM, Ogden CL, Wei R, Kuczmarski RL, Johnson CL. Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index. *American Society for Nutrition*. 73: 1086-1093, 2001.

Fragaszy DM, Visalberghi E, Fedigan L. The complete capuchin: the biology of the genus *Cebus*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

Fragaszy DM, Liu Q, Wright BW, Allen A, Brown CW, Visalberghi E. Wild Bearded Capuchin Monkeys (*Sapajus libidinosus*) Strategically Place Nuts in a Stable Position during Nut-Cracking. *Plos One*. 8: 56182, 2013.

Freedman JE, Loscalzo J. Trombose arterial e venosa. In: Longo DL (Org). Medicina Interna de Harrison. Porto Alegre, AMGH. 18 ed: 951-955, 2011.

Freeman EW, Kroll R, Rapkin A, Pearlstein T, Brown C, Parsey K, Zhang P, Patel H, Foegh M. Evaluation of a unique oral contraceptive in the treatment of premenstrual dysphoric disorder. *Journal of Women's Health and Gender-Based Medicine*. 10: 561-569, 2003.

Fruzzetti F, Trémollières F, Bitzer J. An overview of the development of combined oral contraceptives containing estradiol: focus on estradiol valerate/dienogest. *Gynecological Endocrinology*. 28: 400-408, 2012.

Galbany J, Tun J, Altmann J, Alberts SC. Canine Length in Wild Male Baboons: Maturation, Aging and Social Dominance Rank. *Plos One*. 10: 1-17, 2015.

Gallo M, Grimes DA, Schulz K, Helmerhorst F. Combination estrogen-progestin contraceptives and body weight: systematic review of randomized controlled trials. *Obstetrics and Gynecology*. 103: 359-373, 2004.

Garrido P, de Blas M, Del Arco A, Segovia G, Mora F. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiology Aging*. 33: 375-382, 2012.

Giometti IC, Castilho ACS, Sá-Filho OG, Papa PC, Buratini Jr J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. 33: 34-52, 2009.

Glaser RL, Dimitrakakis C, Messenger AG. Improvement in scalp hair growth in androgen-deficient women treated with testosterone: a questionnaire study. *British Journal of Dermatology*. 166: 274-278, 2012.

Gleeson M. Biochemical and Immunological Markers of Overtraining. *Journal of Sports Science and Medicine*. 2: 31-41, 2002.

Glynn RJ, Rosner B. Comparison of risk factors for the competing risks of coronary heart disease, stroke, and venous thromboembolism. *American Journal Epidemiology*. 162: 975-982, 2005.

Godoy JM. Fatores de risco e eventos trombóticos. *Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia*. 31: 122, 2009.

Gompel A, Plu-Bureau G. Are we overestimating the stroke risk related to contraceptive pills?. *Current Opinion Neurology*. 27: 29-34, 2014.

Gray ME, Thain DS, Cameron EZ, Miller LA. Multi-year fertility reduction in free-roaming feral horses with single-injection immunocontraceptive formulations. *Wildlife Research*: 37: 475-481, 2010.

Groot FG. Platelets as pivot in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 124: 475-476, 2014.

Guerrieri GM, Martinez PE, Klug, SP, Haq NA, Vanderhoof VH, Koziol DE, Vaishali B, Kalantaridou SN, Calis KA, Rubinow DR, Schmidt PJ, Lawrence N. Effects of physiologic testosterone therapy on quality of life, self-esteem, and mood in women with primary ovarian insufficiency. *Menopause*. 21: 952-961, 2014.

Guo W, Bachman E, Vogel J, Li M, Peng L, Pencina K, Serra C, Sandor NL, Jasuja R, Montano M, Basaria S, Gassmann M, Bhasin S. The Effects of Short-Term and Long-Term Testosterone Supplementation on Blood Viscosity and Erythrocyte Deformability in Healthy Adult Mice. *Endocrinology*. 156: 1623-1629, 2015.

Gust DA, Wilson ME, Stocker T, Conrad S, Plotsky PM, Gordon TP. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 85: 2556-2563, 2000.

Hagner W, Hagner-Derengowska M, Wiacek M, Zubrzycki IZ. Changes in level of VO₂max, blood lipids, and waist circumference in the response to moderate endurance training as a function of ovarian aging. *Menopause*. 16: 1009-1013, 2009.

Hahn AC, Fisher CI, Cobey KD, DeBruine LM, Jones BC. A longitudinal analysis of women's salivary testosterone and intrasexual competitiveness. *Psychoneuroendocrinology*. 64: 117-122, 2016.

Haider S; Darney PD. Injectable contraception. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 50: 898-906, 2007.

Hall KS, White KOC, Rickert VI, Reame N, Westhoff C. Influence of depressed mood and psychological stress symptoms on perceived oral contraceptive side effects and discontinuation in young minority women. *Contraception*. 86: 518-525, 2012.

Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Human Reproduction*. 23: 699-708, 2008.

Hatcher RA, Guillebaud J. The pill: combined oral contraceptives. In: Hatcher RA, Trussell J, Stewart F. *Contraceptive technology*. New York: Ardent Media. 7: 405-466, 1998.

Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 34: 163-171, 2009.

Henkel S, Lambides AR, Berger A, Thomsen R, Widdig A. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) recognize group membership via olfactory cues alone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 69: 2019-2034, 2015.

Herrington DM. Role of estrogen receptor-alpha in pharmacogenetics of estrogen action. *Current Opinion in Lipidology*. 14: 145-150, 2003.

Huang G, Tang E, Aakil A, Anderson S, Jara H, Davda M, Stroh H, Trivison TG, Bhasin S, Basaria S. Effects on Sexual Function, Body Composition, Muscle Performance and Physical Function in a Randomized Trial. *Menopause*. 21: 612-623, 2014.

Hugon-Rodin J, Gompel A, Plu-Bureau G. Epidemiology of hormonal contraceptives related venous thromboembolism. *European Journal of Endocrinology*. 171: 221-230, 2014.

Jack KM, Schoof VAM, Sheller CR, Rich CI, Klingelhofer PP, Ziegler TE, Fedigan L. Hormonal correlates of male life history stages in wild white-faced capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). *General and Comparative Endocrinology*. 195: 58-67, 2014.

Janson CH, Boinski S. Morphological and behavioral adaptations for foraging in generalist primates: the case of the cebines. *American Journal of Physical Anthropology*. 88: 483-498, 1992.

Janssen I, Powell LH, Kazlauskaitė R, Dugan SA. Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. *Obesity*. 18: 604-610, 2010.

Jones DR, Schmidt RJ, Pickard RT, Foxworthy PS, Eacho PI. Repressão mediada por receptores de estrogénio da transcrição do gene da lipase hepática humana. *Journal of Lipid Research*. 43: 383-391, 2002.

Jones KP, Walker LC, Anderson D, Lacreuse A, Robson SL, Hawkes K. Depletion of ovarian follicles with age in chimpanzees: similarities to humans. *Biology Reproduction*. 77: 247-251, 2007.

Jones BA, Watson NV. Perinatal BPA exposure demasculinizes males in measures of affect but has no effect on water maze learning in adulthood. *Hormones and Behavior*. 61, 605-610, 2012.

Junge W, Mellinger U, Parke S, Serrani M. Metabolic and haemostatic effects of estradiol valerate/dienogest, a novel oral contraceptive: a randomized, open-label, single-centre study. *Clinical Drug Investigation*. 31: 573-584, 2011.

Juster RP, Raymond C, Desrochers AB, Bourdon O, Durand N, Wan N, Pruessner JC, Lupien SJ. Sex hormones adjust “sex-specific” reactive and diurnal cortisol profiles. *Psychoneuroendocrinology*. 63: 282-290, 2016.

Kallio S, Puurunen J, Ruukonen A, Vaskivuo A, Piltonen T. Antimullerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertility and Sterility*. 99: 1305-1310, 2013.

Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *British Medical Journal*. 323: 1-9, 2001.

Ketterson ED, Nolan VJr, Sandell M. Testosterone in Females: Mediator of Adaptive Traits, Constraint on Sexual Dimorphism, or Both?. *The American Naturalist*. 166: 85-98, 2005.

Khadera YS, Ricea J, Johna L, Abueitab O. Oral contraceptives use and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Contraception* 68: 11-17, 2003.

Kim W, Jesses HM, Auger AP, Terasawa E. Postmenopausal increase in KiSS-1, GPR54, and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH-1) mRNA in the basal hypothalamus of female rhesus monkeys. *Peptides*. 30: 103-110, 2009.

Kim CH, Houles CM, Lee HA. The effect of transdermal testosterone gel pretreatment on controlled ovarian stimulation and IVF outcome in low responders. *Fertility and Sterility*. 95: 679-683, 2011.

Koch H, McCormack K, Sanchez MM, Maestriperi D. The development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in rhesus monkeys: Effects of age, sex, and early experience. *Developmental Psychobiology*. 56: 86-95, 2014.

Konkle BA. Bleeding and thrombosis. *In*: Kasper D, Fauci A, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill. 17 ed: 363-370, 2008.

Krapf JM, Simon JA. The role of testosterone in the management of hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women. *Maturitas*. 63: 213-219, 2009.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Patologia Básica*. *In*: *Desordens hemodinâmicas trombose e choque*. Editora Saunders: 8 ed: 43-48, 2008.

Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 82: 396-402, 1997.

Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin S-X, Simard J, Labrie C. Is DHEA a hormone? Starling review. *Journal Endocrinology*. 187:169-96, 2005.

Labrie F, Archer D, Bouchard C, Cusan L, Gomez JL, Girard G. Serum steroid levels during 12-week intravaginal dehydroepiandrosterone administration. *Menopause*. 16: 897-906, 2009.

Lahoz MM, Nagle CA, Porta M, Farinati Z, Manzur TD. Cortisol response and ovarian hormones in juvenile and cycling female *Cebus* monkeys: effect of stress and dexamethasone. *American Journal Primatology*. 69: 551-561, 2007.

Lanza LL, Mcquay LJ, Rothman KJ, Bone HG, Kaunitz AM, Harel Z, Ataher Q, Ross D, Arena PL, Wolter KD. Use of depot medroxyprogesterone acetate contraception and incidence of bone fracture. *Obstetrics and Gynecology*. 121: 593-600, 2013.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D, von Mühlen D. Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo Study. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 85: 645-651, 2000.

Lefevre CE, Wilson VAD, Morton FB, Brosnan SF, Paukner A, Bates TC. Facial Width-To-Height Ratio Relates to Alpha Status and Assertive Personality in Capuchin Monkeys. *Plos One*. 9: e93369, 2014.

Lidegaard O, Kreiner S. Contraceptives and cerebral thrombosis: a fiveyear national case-control study. *Contraception*. 65: 197-205, 2002.

Lidegaard O, kegaard EL, Jensen A, Skovlund CW, Keiding N. Thrombotic stroke and myocardial infarction with hormonal contraception. *The New England Journal Medicine*. 366: 2257-2266, 2012.

Vlieg AH, Rosendaal FR, Risk of venous thrombosis associated with different types of combined oral contraceptive preparations. *Polish Archives of Internal Medicine*. 124: 85-87, 2014.

Lima MC, Nikolak E, Scalercio SRR, Jacometto ISN, Bussiere MCC, Domingues SFS. Monitoring in plasma sanguineous sex steroids during the cycle ovarian *Sapajus apella* and *Sapajus libidinosus* (capuchin monkey) kept in captivity. *Ciência Animal*. 22: 65-67, 2012.

Lima-Verde I, Rossetto R, Figueiredo J. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Revista Brasileira. Reprodução Animal*. 35: 472-482, 2011.

Linn GS, Mase D, Lafrancois D, O'Keeffe RT, Lifshitz K. Social and menstrual cycle phase influences on the behavior of group-housed *Cebus apella*. *American Journal Primatology*. 35: 41–57, 1995.

Little AC, Jones BC. Variation in facial masculinity and symmetry preferences across the menstrual cycle is moderated by relationship context. *Psychoneuroendocrinology*. 37: 999-1008, 2012.

Little AC, Burriss RP, Petrie M, Jones BC, Roberts SC. Oral contraceptive use in women changes preferences for male facial masculinity and is associated with partner facial masculinity. *Psychoneuroendocrinology*. 38: 1777-1785, 2013.

Lobo RA, Rosen RC, Yang HM, Block B, Van Der Hoop RG. Comparative effects of oral esterified estrogens with and without methyltestosterone on endocrine profiles and dimensions of sexual function in postmenopausal women with hypoactive sexual desire. *Fertility and Sterility*. 79: 1341-52, 2003.

Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery*. 64: 614-628, 2012.

Lopez LM, Grimes DA, Chen-Mok M, Westhoff C, Edelman A, Helmerhorst FM. Hormonal contraceptives for contraception in overweight or obese women. *Obstetrics and Gynecology*. 116: 1206-1207, 2010.

Lubianca JN, Faccin CS, Fuchs FD. Oral contraceptives: a risk factor for uncontrolled pressure among hypertensive women. *Contraception*. 67: 19-24, 2003.

Luine VN, Beck KD, Bowman RE, Frankfurt RE, MacLusky NJ. Chronic Stress and Neural Function: Accounting for Sex and Age. *Journal of Neuroendocrinology*. 19: 743-751, 2007.

Lynch Alfaro JW, Silva JR JS, Rylands AB. How Different Are Robust and Gracile Capuchin Monkeys? An Argument for the Use of *Sapajus* and *Cebus*. *American Journal of Primatology* 00:1-14, 2012.

Magri F, Locatelli M, Balza G, Molla G, Cuzzoni G, Fioravanti M, Solerte SB, Ferrari E, Cravello L, Muzzoni B, Casarotti D, Paltro M, Pontiggia B. Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Journal Endocrinology*. 144: 319-29, 2001.

Maijer AM, Semple S. Investigating Potential Effects of the Contraceptive Implanon on the Behavior of Free-Ranging Adult Female Barbary Macaques. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 19:16-23, 2016.

Majerus PW, Tollefsen DM. Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. *Goodman and Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*, McGraw Hill, Rio de Janeiro, 10 ed: 2003.

Maner JK, McNulty JK. Attunement to the fertility status of same-sex rivals: women's testosterone responses to olfactory ovulation cues. *Evolution and Human Behavior*. 34: 412-418, 2013.

Manzoli L, De Vito C, Marzuillo C, Boccia A, Villari P. Oral contraceptives and venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *Drug Safety*. 35: 191-205, 2012.

Margolis K, Adami H, Luo J, Ye W, Weiderpass E. A prospective study of oral contraceptive use and risk of myocardial infarction among Swedish women. *Fertility and Sterility*. 88: 310-316, 2007.

Martin P, Bateson P. Measuring behaviour. Cambridge: Cambridge University Press. 2 ed, 1993.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 296: 2178-2180, 2002.

Mawet M, Maillard M, Klipping C, Zimmerman Y, Foidar JM, Bennink HJTC. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. Published online: 27: 463-475, 2015.

Mazer NA. New clinical applications of transdermal testosterone delivery in men and women. *Journal Controlled Release*. 65: 303-315, 2000.

McHenry J, Carrier N, Hull E, Kabbaj M, Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 17: 121-155, 1996.

Melo NRM, Filho ASP. Manual de Anticoncepção. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. In: Contraceptivo injetável. 1 ed: 20-26, 1997.

Metze K. Distúrbios da coagulação. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 99-182, 2011.

Miao MS, Guo L, Tian S. Effect of motherwort total alkaloids on a testosterone propionate-induced acne: mouse model. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 25: 1-4, 2015.

Miller SL, Maner JK. Scent of a woman: Men's testosterone responses to olfactory ovulation cues. *Psychological Science*, 21: 276-283, 2010.

Miller KK, Meenaghan E, Lawson EA, Madhusmita M, Gleysteen S, Schoenfeld D, Herzog D, Klibanski A. Effects of risedronate and low-dose transdermal testosterone on bone mineral density in women with anorexia nervosa: a randomized, placebo-controlled study. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 96: 2081-2088, 2011.

Mishell DRJr, Kletzky OA, Brenner PF, Roy S, Nicoloff J. The effect of contraceptive steroids on hypothalamic-pituitary function, *American Journal Obstetric and Gynecology*. 128: 60-74, 1977.

- Mizrachi D, Auchus RJ. Androgens, estrogens and hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 301: 37-42, 2009.
- Monroe DM, Hoffman M. *Theories of Blood Coagulation: Basic Concepts and Recent Updates*. Duke University, Durham. 1 ed: 2012.
- Morley JE, Perry HM. Androgens and Women at the Menopause and Beyond. *Journal Gerontology*. 58: 409-416, 2003.
- Munakata A1, Kobayashi M. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 456-468, 2010.
- Naderi S. Testosterone Replacement Therapy and the Cardiovascular System. *Current Atherosclerosis Reports*. 1: 18: 19, 2016.
- Naderpoor N, Shorakae S, Courten B, Misso ML, Moran LJ., Teede HJ. Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 21: 560-574, 2015.
- Nagle CA, Denari JH, Quiroga S, Riarte A, Merlo A, Germino NI, Gómez-Argaña F, Rosner JM. The Plasma Pattern of Ovarian Steroids during the Menstrual Cycle in Capuchin Monkeys (*Cebus apella*). *Biology of Reproduction*. 21: 979-983, 1979.
- Nappi RE, Albani F, Santamaria V, Tonani S, Magri F, Martini E, Chiovato L, Polatti F. Hormonal and psycho-relational aspects of sexual function during menopausal transition and at early menopause. *Maturitas*. 67: 78-83, 2010.
- Navarro G, Allard C, Xu W, Mauvais-Jarvis F. The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females. *Obesity*. 23: 713-719, 2015.
- Nichols SM, Bavister BD, Brenner CA, Didier PJ, Hrrison RM, Kubisch HM. Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Human Reproduction*. 20:79-83, 2005.
- Norris LA, Joyce M, O'Keeffe N, Sheppard BL, Bonnar J. Haemostatic risk factors in healthy postmenopausal women taking hormone replacement therapy. *Maturitas*. 43: 125-33, 2002.
- O'Neill AC, Fedigan LM, Ziegler TE. Relationship between ovarian cycle phase and sexual behavior in female Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *American Journal of Physical Anthropology*. 125: 352-362, 2004.

Oelkers WK. Effects of estrogens and progestogens on the renin aldosterone system and blood pressure. *Steroids*. 61: 166-171, 1996.

Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocytegranulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*. 2: 1757-2215, 2009.

Ortiz ME, Ortiz RE, Fuentes MA, Parraguez VH, Croxatto HB. Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with post-fertilization events in the new-world monkey *Cebus apella*. *Human Reproduction*. 19: 1352-1356, 2004.

Pachaly JR, Brito HFV. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. *A Hora da Veterinária*. 18. 59-65, 2000.

Patel SM, Ratcliffe SJ, Reilly MP, Weinstein R, Bhasin S, Blackman MR, Cauley JA, Sutton-Tyrrell K, Robbins J, Fried LP, Cappola AR. Higher serum testosterone concentration in older women is associated with insulin resistance, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Journal Clinic Endocrinology Metabolism*. 94: 4776-4784, 2009.

Pardini DP. Terapia de reposição hormonal na menopausa. *Endocrinologia Clínica*. Lucio Vilar. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 5 ed: 40, 2013.

Pauletti CM, Biedzicki-de-Marques AA, LealZanchet AM. A primatologia no Brasil. In: *Impacto da visitação no comportamento do macaco-prego (Cebus apella) em parques zoológicos*. Porto Alegre. 5 Ed: 146, 2005.

Perheentupa A, Huhtaniemi I. Aging of the human ovary and testis. *Molecular Cellular Endocrinology*. 299:2-13, 2009.

Phillips KA, Buzzell AC, Holder N, Sherwood CC. Why do capuchin monkeys urine wash? An experimental test of the sexual communication hypothesis using fMRI. *American Journal of Primatology*. 73: 578-584, 2011.

Phillips A, Sherwood CC. Age-related differences in corpus callosum area of capuchin monkeys: *Neuroscience*. 202: 202-208, 2012.

Picardo CM, Nichols M, Edelman A, Jensen J. Women's knowledge and sources of information on the risks and benefits of oral contraception. *Journal American Medicine Womens Association*. 58: 112-116, 2003.

Pisanski K, Hahn AC, Fisher CI, DeBruine LM, Feinberg DR, Jones BC. Changes in salivary E2 predict changes in women's preferences for vocal masculinity. *Hormones and Behavior*. 66: 493-497, 2014.

Plu-Bureau G, Maitrot-Mantelet L, Hugon-Rodin J, Canonico M. Hormonal contraceptives and venous thromboembolism: an epidemiological update. *Journal Clinic Endocrinology Metabolism*. 27: 25-34, 2013.

Quiatt D, Reynolds V. *Primate Behaviour: Information, Social Knowledge, and the Evolution of Culture*. Cambridge: Cambridge University Press. 1 ed. 10-34, 1993.

Reichin S. Neuroendocrinology. In: Wilson JD; Foster DW. *Text book of Endocrinology*. Philadelphia: WB. Saunders Company. 8 ed: 135-220, 1992.

Reilly PA, Lehr T, Haertter S, Connolly SJ, Yusuf S, Eikelboom JW, Ezekowitz MD, Nehmiz G, Wang S, Wallentin L. The Effect of Dabigatran Plasma Concentrations and Patient Characteristics on the Frequency of Ischemic Stroke and Major Bleeding in Atrial Fibrillation Patients. *Journal American College Cardiology*. 63: 321-328, 2014.

Reis SLB, Abdo CHN. Benefits and risks of testosterone treatment for hypoactive sexual desire disorder in women: a critical review of studies published in the decades preceding and succeeding the advent of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Clinics*. 69: 294-303, 2014.

Resende BD, Oliveira DAG, Ramos da Silva ED, Ottoni EB. Capuchin monkey (*Cebus apella*) vocalizations in response to loud explosive noises. *Neotropical Primates*. 14: 25-28, 2008.

Ridker PM. High-Sensitivity C-Reactive Protein Potential Adjunct for Global Risk Assessment in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 103: 1813-1818, 2001.

Roberts SC, Cobey KD, Klapilová K, Havlíček J. An Evolutionary Approach Offers a Fresh Perspective on the Relationship Between Oral Contraception and Sexual Desire. *Archives of Sexual Behavior*. 42: 1369-1375, 2013.

Roberts H. Managing the menopause. *British Medical Journal*. 334: 736-741, 2007.

Rodrigues RC, Carrijo C, Uribe CE, Gasbarri A, Tavares MCH. Sexual behavior and progesterone levels in elderly female capuchin monkeys (*Cebus libidinosus*). *Neurobiologia*. 74: 10-19, 2011.

Rodrigues AM, Wittwer D, Kitchen DM. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. *Journal of Contraception and Reproductive Health Care*. 77: 925-935, 2015.

Ronde W, van der Schouw IT, Muller M, Grobbee DE, Gooren LJG, Pols HAP, Jong FH. Associations of Sex-Hormone-Binding Globulin (SHBG) with Non-SHBG-Bound Levels of Testosterone and Estradiol in Independently Living Men. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 90: 157-162, 2005.

Rooij IAJ, Broekmans FJM, Scheffer GJ, Looman CWN, Habbema JDF, Jong FH, Fauser BJCM, Themmen APN, Velde ER. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: A longitudinal study. *Fertility and Sterility*. 83: 979-987, 2005.

Rosendaal FR, Vlieg VHA, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Hemostasis*. 1: 1371-1380, 2003.

Rosendaal FR. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. *British Medical Journal*. 339: 1-8, 2009.

Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Brief Review. 22: 201-210, 2002.

Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology American Society Hematology Education Program*. 1: 1-12, 2005.

Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, Christella M, Thomassen LG, Nicolaes GA, Meijers JC, Bouma BN, Büller HR, Prins MH, Tans G. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study. *Lancet*. 354: 2036-2040, 1999.

Rosner W, Auchus Rj, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: utility, limitations and pitfalls in measuring testosterone: endocrine society position statement. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 92: 405-413, 2007.

Royer PA, Jones KP. Progestins for Contraception: Modern Delivery Systems and Novel Formulations, *Clinical Obstetric Gynecology*. 57: 644-658, 2014.

Ryan KJ, Petro Z, Kaiser J. Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cells. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 28: 355-358, 2003.

Saltzman W, Prudom SL, Schultz-Darken NJ, Abbott DH. Reduced adrenocortical responsiveness to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in socially subordinate female marmoset monkeys. *Psychoneuroendocrinology*. 25: 463-477, 2000.

Sanders SA, Graham CA, Bass JL, Bancroft J. A prospective study of the effects of oral contraceptives on sexuality and well-being and their relationship to discontinuation. *Contraception*. 64: 51-58, 2001.

Sandset PM, Hoibraaten E, Eilertsen AL, Dahm A. Mechanisms of thrombosis related to hormone therapy. *Thrombosis Research*. 123: 70-73, 2009.

Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A 2009 History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrinology Review*. 30: 343-375.

Santoro N, Randolph JF. Reproductive Hormones and the Menopause Transition. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 38: 455-466, 2011.

Santos P, Machado T, Osiecki A, Góes S, Leite N & Stefanello J. A necessidade de parâmetros referenciais de cortisol em atletas: Uma revisão sistemática. *Motricidade*. 10: 107-125, 2014.

Sapolsky RM. The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. *Science*. 308: 648-652, 2005.

Schindler AE. Non-Contraceptive Benefits of Oral Hormonal Contraceptives. *Int Journal Endocrinology Metabolism*. 11: 41-47, 2013.

Scommegna A, Pandya GN, Christ M, Lee AW, Cohen MR. Intrauterine Administration of Progesterone by a Slow Releasing Device. *Fertility and Sterility*. 21: 201-210, 1970.

Serfaty D. *Contracepção*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2 ed: 2005.

Shaheen K, Alraies MC, Alraiyes AH, Christie R. Factor V Leiden: How great is the risk of venous thromboembolism?. *Clinic Journal of Medicine*. 79: 265-272, 2012.

Shapiro J, Christiana J, Frishman WH. Testosterone and other anabolic steroids as cardiovascular drugs. *American Journal of Therapeutics*. 1999; 6: 167-74.

Shaw, N. D. et al. Differential effects of aging on estrogen negative and positive feedback. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*. 301: 351-355, 2011.

Shehzad B, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, Eder R, Tennstedt S, Ulloor J, Zhang A, Choong K, Lakshman KM, Mazer NA, Miciek R, Krasnoff J, Elmi A, Knapp PE, Brooks B, Appleman E, Aggarwal S, Bhasin G, Hede-Brierley L, Bhatia A, Collins L, LeBrasseur N, Fiore LD, Bhasin S. Adverse Events Associated with Testosterone Administration. *New England Journal of Medicine*. 363: 109-122, 2010.

Sher L, Grunebaum MF, Sullivan GM, Burke Ak, Cooper TB, Mann J, Oquendo MA. Testosterone levels in suicide attempters with bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research*. 46: 1267-1271, 2014.

Shideler SE, Gee NA, Chen J, Lasley BL. Estrogen and progesterone metabolites and follicle-stimulating hormone in the aged macaque female. *Biology of Reproduction*. 65: 17-18, 2001.

Shifren JL, Braunstein GD, Simon JA, Casson PR, Buster JE, Redmond GP. Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy. *New England Journal Medicine*. 343: 682-688, 2009.

Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *International Journal Obesity*. 26: 335-343, 2002.

Simon J, Braunstein G, Nachtigall L, Utian W, Katz M, Miller S, Waldbaum A, Bouchard C, Derzko C, Buch A, Rodenberg C, Lucas J, Davis S. Testosterone patch increases sexual activity and desire in surgically menopausal women with hypoactive sexual desire disorder. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 90: 5226-5233, 2005.

Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Bonn WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase - a brief overview. *Annual Review of Physiology*. 64:93-127, 2002.

- Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86: 225-230, 2003.
- Sitruk-Ware R, Nath A, Mishell DR. Contraception technology: past, present and future. *Contraception*. 87: 319-330, 2013.
- Sitruk-Ware R. New progestagens for contraceptive use. *Human Reproduction Update*. 12: 169-178, 2006.
- Sonfield A. The Affordable Care Act and Reproductive Health: Potential Gains and Serious Challenges. *Journal of Health Politics*. 38: 373-391, 2013.
- Sousa MBC, Ziegler TE. Influência da variação diurna no sangue e estresse na excreção fecal de esteróides em *Callitrix jacchus*. *A Primatologia no Brasil*. 7: 319-331, 2000.
- Speroff L. Role of progesterone in normal breast physiology. *The Journal of Reproductive Medicine*. 44: 172-179, 1999.
- Stocco C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*. 73: 473-487, 2008.
- Strier KB. Reproductive strategies of new world primates: interbirth intervals and reproductive rates. *A Primatologia no Brasil*. 8: 53-63, 2004.
- Streuli I, Fraisse T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, Ziegler D. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertility and Sterility*. 90: 395-400, 2008.
- Strufaldi R, Pompel LM, Steiner ML, Cunha PE, Ferreira JA, Peixoto S, Fernandes CE. Effects of two combined hormonal contraceptives with the same composition and different doses on female sexual function and plasma androgen levels. *Contraception*. 82: 147-154, 2010.
- Sulak PJ, Scow RD, Preece C, Riggs MW, Kuehl TJ. Hormonal withdrawal symptoms in oral contraceptive users. *Obstetric and Gynecology*. 95: 261-266, 2000.
- Sullivan EL, Cameron JL. A rapidly occurring compensatory decrease in physical activity counteracts diet-induced weight loss in female monkeys. *American Journal of Physiology*. 298:1068-1074, 2010.

Sun CL, Li CL, Huang L. The clinical effect of anti-acne compound for acne treatment. *Journal Chinese Aesthetic Medicine*. 23: 38-40, 2014.

Swenson MJ. Circul Metze ação sanguínea e sistema cardiovascular. In: Swenson MJ, Reece WO. *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*, 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

Tajima K, Orisaka M, Mori T, Kotsuji F. Ovarian theca cells in follicular function. *Reproductive BioMedicine*. 15: 591-609, 2007.

Tavares MC, Abreu C, Waga I, Gomes U, Tomaz C, Mattern C. Effects of intranasally administered testosterone on sexual proceptive behavior in female capuchin monkeys. *Behavioural Brain Research*. 179: 33-42, 2009.

Tepper NK, Curtis KM, Steenland MW, Marchbanks PA. Blood pressure measurement prior to initiating hormonal contraception: a systematic review. *Contraception*. 87: 631-638, 2013.

Tiddi B, Wheeler BC, Heistermann M, Female behavioral proceptivity functions as a probabilistic signal of fertility, not female quality, in a New World primate. *Hormones and Behavior*. 73. 148-155, 2015.

Topic B, Tavares MC, Tomaz C, Mattern C. Prolonged effects of intra-nasally administered testosterone on proceptive behavior in female capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Behavioural Brain Research*. 179: 60-68, 2007.

Traish AM, Kim N, Min K, Munarriz R, Goldstein I. Role of androgens in female genital sexual arousal: receptor expression, structure and function. *Fertility and Sterility*. 77: 11-18, 2002.

Tsutsui, T. Ubuka, G.E. Bentley, L.J. Kriegsfeld, Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Discovery, progress and prospect. *General Comparative Endocrinology*. 177, 305-314, 2012.

Tuiten A, Honk JV, Koppeschaar H, Bernards C, Thijssen J, Verbaten R. Time Course of Effects of Testosterone Administration on Sexual Arousal in Women. *Archives of general psychiatry*. 57: 149-153, 2000.

Udoff LC. Androgen production and therapy in women. [Monograph on the Internet]. UpTo Date online; 2009.

- Valdez K, Cuneo S, Gorden P, Turzillo A. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *Journal of Animal Science*. 83: 597-603, 2005.
- van Anders SM, Gray PB. Hormones and Human Partnering. *Annual Review Sex Research*. 18: 60-93, 2007.
- van Anders SM, Goldey KL, Kuo PX. The steroid/peptide theory of social bonds: Integrating testosterone and peptide responses for classifying social behavioral contexts. *Psychoneuroendocrinology*. 36: 1265-1275, 2011.
- van Anders SM, Steiger J, Goldey KL. Effects of gendered behavior on testosterone in women and men. *PNAS*. 112: 13805-13810, 2015.
- Vlieg VHA, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP, Doggen CJ, Rosendaal FR. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. *British Medical Journal*. 339: 1-8, 2009.
- Vandever MA, Kuehl TJ, Sulak PJ, Witt I, Coffee A, Wincek TJ, Kathleen Z. Reape KZ. Evaluation of pituitary-ovarian axis suppression with three oral contraceptive regimens. *Contraception*. 77: 162-170, 2008.
- Veldhuis JD, Sharma A, Roelfsema F. Age-Dependent and Gender-Dependent Regulation of Hypothalamic-Adrenocorticotrophic-Adrenal Axis. *Endocrinology Metabolism Clinical*. 42: 201-225, 2013.
- Vercellini P, Eskenazi B, Consonni D, Somigliana E, Parazzini F, Abbiati A, Fedele L. Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 17: 159-170, 2011.
- Visser M, Holinka CF, Coelingh-Bennink HJ. First human exposure to exogenous single-dose oral estetrol in early postmenopausal women. *Climacteric*. 1: 31-40, 2008.
- Vlieg AH, Rosendaal FR. Risk of venous thrombosis associated with different types of combined oral contraceptive preparations. *Polish Archives of Internal Medicine*. 124 85-87: 2014.

Wallwiener CW, Wallwiener LM, Seeger H, Mück AO, Bitzer J, Wallwiener M. Prevalence of Sexual Dysfunction and Impact of Contraception in Female German Medical Students. *The Journal of Sexual Medicine*. 7: 2139-2148, 2010.

Wang WH , Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Human Reproduction*. 16: 1464-1468, 2001.

Wanyonyi SZ, Stones WR, Sequeira E. Health-related quality of life changes among users of depot medroxyprogesterone acetate for contraception. *Contraception*. 84: 17-22, 2011.

Weinberg ME¹, Manson JE, Buring JE, Cook NR, Seely EW, Ridker PM, Rexrode KM. Low sex hormone-binding globulin is associated with the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism*. 55: 1473-1480, 2006.

Wermeling DP, Record KA, Thomas KH, Archer SM, Clinch T, Rudy AC. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a New Intranasal Midazolam Formulation in Healthy Volunteers. *Anesthesia and Analgesia*. 103: 344-349, 2006.

Westhoff CL, Kelsey A, Petrie SC. Using changes in binding globulins to assess oral contraceptive compliance. *Contraception*. 87: 176-181, 2013.

White T, Özel B, Jain JK, Stanczyk FZ. Effects of transdermal and oral contraceptives on estrogen-sensitive hepatic proteins. *Contraception*. 74: 293-296, 2006.

Wiacek MW, Zubrzycki IZ. Measures of menopause driven differences in levels of blood lipids, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone in women aged 35 to 60 years: National Health and Nutrition Examination Survey III and National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002 study. *Menopause*. 18: 60-66, 2011.

Wickman JM, Groves A; Patel N. Androgen Therapy in Women. *US Pharmacist*. 39: 42-46, 2014.

Wiegratz I, Kutschera E, Lee JH, Moore C, Mellinger U, Winkler UH, Kuhl H. Effect of four different oral contraceptives on various sex hormones and serum-binding globulins. *Contraception*. 67: 25-32, 2003.

Wierman ME, Basson R, Davis SR, Khosla S, Miller KK, Rosner W, Santoro N. Androgen Therapy in Women: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 91: 3697-3710, 2006.

Woensel M, Wauthoz N, Rosière R, Amighi K, Mathieu V, Lefranc F, van Gool SW, Vleeschouwer S. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM?. *Cancers*. 5: 1020-1048, 2013.

Wolfram M, Bellingrath S, Kudielka BM. The cortisol awakening response (CAR) across the female menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology*. 36: 905-912, 2011.

Wooderson SC, Gallagher P, Watson S, Young AH. An exploration of testosterone levels in patients with bipolar disorder. *British Journal of Psychiatry*. 1: 136-138, 2015.

Wu FCW, Butler GE, Kelnar CJH, Stirling HF, Huhtaniemi I. Patterns of pulsatile luteinizing and follicle stimulating hormone secretion in prepubertal (midchildhood) boys and girls and patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann's syndrome): a study using an ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 72: 1229-1237, 1991.

Xu H, Wade JA, Peipert JF, Zhao Q, Madden T, Secura GM. Contraceptive Failure Rates of Etonogestrel Subdermal Implants in Overweight and Obese Women. *Obstetrics and Gynecology*. 120: 21-26, 2012.

Yarak S, Parada MOAB, Bagatin E, Talarico-Filho S, Hassun KM. Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 80: 395-410, 2005.

Ziller M, Ziller V, Haas G, Rex J, Kostev K. Risk of venous thrombosis in users of hormonal contraceptives in German gynaecological practices: a patient database analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 289: 413-419, 2014.

Zimmerman MJC, Eijkemans HJT, Bennink C, Blankenstein MA, Fauser BCJM. The effect of combined oral contraception on testosterone levels in healthy women: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 20: 76-105, 2014.



Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Brasília, 27 de outubro de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Efeitos do uso de anticoncepcional a administração crônica de testosterona no ciclo menstrual de fêmeas de *Cebus libidinosus* (Macaco-Prego)”, UnBDoc 101375/2011, sob responsabilidade Professora Maria Clotilde Henriques Tavares, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM