

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE PRIMATAS DA ESPÉCIE *CALLITHRIX JACCHUS*
SUBMETIDOS AO CATIVEIRO

MYRNA CAMPOS FERRAZ

Botucatu – SP

Julho/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE PRIMATAS DA ESPÉCIE *CALLITHRIX JACCHUS*
SUBMETIDOS AO CATIVEIRO

MYRNA CAMPOS FERRAZ

Tese apresentada ao Programa de
Pós - Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título
de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

Botucatu – SP

Julho/2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Ferraz, Myrna Campos.

Avaliação de primatas da espécie *Callithrix jacchus* submetidos ao cativeiro /
Myrna Campos Ferraz. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Primatas - Reprodução. 2. Animais selvagens em cativeiro. 3. Reprodução
animal. 4. Estudos de validação.

Palavras-chave: *Callithrix jacchus*; Estresse; Primatas; Reprodução; Validação.

Nome do Autor: Myrna Campos Ferraz

Título: **AVALIAÇÃO DE PRIMATAS DA ESPÉCIE *CALLITHRIX JACCHUS* SUBMETIDOS AO CATIVEIRO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof. Dr. José Mauricio Sforcin
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Data de Defesa: 15 de julho de 2013.



**“Quando você entende o valor de cada vida, você pensa menos no passado e luta para defender o futuro...”
(Dian Fossey)**

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe por ser fonte inesgotável de amor incondicional, sabedoria e compreensão e por tantas vezes ter deixado seus sonhos adormecidos para despertar os meus. Ao meu namorado André Vicente Ruiz de Matos (Parmesão) por todo carinho, amor e paciência...Por dividir comigo os momentos de angústias e incertezas e por ter deixado tantas vezes as suas obrigações de lado para se preocupar com as minhas...

À nossa querida Vovó Maria Bárbara Lopes Ruiz (*in memoriam*) por ter me ensinado que viver muito não é sinônimo de sofrimento e que a idade avançada nada mais é do que um ponto de partida. Tenho certeza que seja qual for a estrada que venha a tomar sua presença guiará sempre meus passos.

A minha querida Brida que nos deixou durante esse estudo, por ter feito parte da minha vida, por todos os momentos que passamos juntas e por todos os meus momentos de solidão que você preencheu...saudades eternas...

A todos os animais que fizeram e fazem parte da minha vida ...e ao meu Catatau.. Obrigada!!

Aos saguis que fizeram parte deste experimento, por terem me ensinado com seus olhares, gestos e vocalizações tanto sobre respeito e confiança, peço perdão por não ter conseguido oferecer à vocês tudo aquilo que gostaria...

Agradecimentos

À minha orientadora e grande amiga Profa. Eunice Oba por ter aceitado esse desafio e por ter sido muito mais do que orientadora. Obrigada pela compreensão, pelos conselhos e pela paciência.

À família Matos por serem tão queridos e por me suportarem durante tanto tempo.

Ao amigo Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira por toda a sua dedicação e amizade.

Ao Prof. Ricardo de Oliveira Orsi pelo apoio durante todos esses anos....E pela paciência sempre...

À Profa. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt pela amizade, ajuda e pelas longas conversas no corredor.

Ao Prof. José Paes (Paisísticoooo) e a Profa. Yuri... Muito obrigada pela amizade e pelo apoio em horas tão difíceis ...

Ao Prof. Nereu Carlos Prestes por sempre ter me apoiado, pelas palavras sempre tão sensatas e pela imensa ajuda.

Ao Prof. Sony Dimas Bicudo pela ajuda oferecida.

À Profa. Maria Denise Lopes e à Profa. Fernandada Cruz Landim e Alvarenga.

Ao Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães por sempre estar pronto a ajudar, pela troca de e-mails, pelos conselhos enfim pela grande colaboração neste trabalho.

À minha amiga irmã Conceição Goes por todo o carinho, amizade e apoio.

À minha querida prima Juliana Lobo pela ajuda e apoio.

À minha dinda Ieda pelo amor e carinho.

Ao meu padrinho e amigo D. Xavier pela sua amizade em momentos às vezes tão complicados.

Ao Prof. Carlos Roberto Teixeira por ter permitido que esse experimento fosse desenvolvido no CEMPAS.

Aos funcionários do CEMPAS Georgete, Irineu e Renato pelo carinho, mas principalmente pela dedicação aos saguis. Agradeço a minha amiga Zilogás (Ligia Francelino)... Você me mostrou que ainda existe esperança nas turmas que estão se formando.

Ao Prof. Rupert Palme por ter me recebido em seu laboratório A Edith Klobetz (meu anjo Vienense) obrigada pela paciência no laboratório.

À amiga Carla Queiroz por ter sido incansável durante as extrações e pela grande amizade.

Às meninas do laboratório, Carol, Caroline, Thalita e Cynthia pelas brincadeiras e apoio.

À Talita Santos pela ajuda nas coletas, à Flavia Cunha e a Giovana Brombini por terem me ajudado a tratar dos pequenos.

À minha grande amiga Bruna Miranda por ter me escutado durante os piores momentos e pela sua dedicação aos animais.

Aos residentes do CEMPAS Marcelo, Guilherme e Dani pelo apoio dado a mim e principalmente ao suporte clínico dado aos saguis.

À todos os funcionários da FMVZ-Unesp- Botucatu e aos Funcionários da Biblioteca da Universidade

À todas as amizades conquistadas e aos amigos do "Botequim do Seu Varte" pelas horas de descontração, pelas conversas e pelo apoio...

Sem a participação de todos vocês teria sido muito mais difícil!!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro dado a este trabalho (2009/52654-9; 2010/51926-2).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3 - MENSURAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SALIVAR EM PRIMATAS DA ESPÉCIE <i>Callithrix jacchus</i> MANTIDOS EM CATIVEIRO.....	42
Tabela 1: Concentrações dos padrões das curvas (originais e ajustados) dadas em ng/mL.....	48
 CAPÍTULO 4 - VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICÓIDES FECAIS PARA PRIMATAS DA ESPÉCIE <i>Callithrix jacchus</i>.....	 56
Tabela 1: Médias das concentrações de metabólitos fecais de cortisol (ng/g) dois dias antes da aplicação do ACTH, no dia da aplicação e dois dias depois.....	64
 CAPÍTULO 5 - VALIDAÇÃO BIOLÓGICA E LABORATORIAL DE METABÓLITOS FECAIS DE PROGESTERONA E DE ESTRADIOL: AVALIAÇÃO HORMONAL DA ATIVIDADE REPRODUTIVA DE SAGUIS COMUNS <i>Callithrix jacchus</i>.....	 74
Tabela 1: Médias e Desvios Padrões das concentrações (ng/g) de metabólitos de progesterona nas fases folicular e lútea de fêmeas de <i>Callithrix jacchus</i>	92
Tabela 2: Comparação entre as médias individuais (ng/g) dos momentos anteriores à gestação com as médias obtidas (ng/g) no período gestacional..	99
Tabela 3: Comparação entre as médias individuais de estradiol (ng/g) do período gestacional com as médias de estradiol (ng/g) obtidas no período pós parto.....	99
 CAPÍTULO 6 - EFEITO DA PRÓPOLIS BRUTA NA DIETA DE SAGUIS <i>Callithrix jacchus</i> MANTIDOS EM CATIVEIRO, ANTES E DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	 107
Tabela 1: Médias e Desvios Padrões do peso (g) entre os grupos de saguis durante os meses gestacionais.....	114

CAPÍTULO 7 - MAL FORMAÇÃO FETAL EM SAGUI COMUM (<i>Callithrix jacchus</i>).....	120
Tabela 1: Peso das fêmeas de <i>Callithrix jacchus</i> levadas para a realização de parto cesariana e biometria das suas respectivas proles.....	127
Tabela 2: Peso das fêmeas de <i>Callithrix jacchus</i> e biometria das suas respectivas crias nascidas de partos normais.....	127
Tabela 3: Número médio de comportamentos relacionados à atitudes de alerta na presença e na ausência de agentes estressores em primatas da espécie <i>Callithrix jacchus</i>	130

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – O USO DE CONDICIONAMENTO INSTRUMENTAL E CLÁSSICO COM REFORÇO POSITIVO PARA A COLETA DE SALIVA E PESAGEM DE SAGUIS (<i>Callithrix jacchus</i>) PARA FINS DE PESQUISA.....	25
Figura 1: “Clicker” utilizado para o condicionamento instrumental para coleta de saliva em <i>Callithrix jacchus</i>	32
Figura 2: Sagui comum (<i>Callithrix jacchus</i>) entrando na gaiola experimental após condicionamento.....	33
Figura 3: Mensuração do peso de <i>Callithrix jacchus</i> após condicionamento.....	33
Figura 4: Sagui comum retornando à gaiola de origem.....	34
Figura 5: <i>Callithrix jacchus</i> recebendo recompensa (Danoninho®).....	34
Figura 6: Coleta de saliva em <i>Callithrix jacchus</i> realizada através de condicionamento instrumental.....	36
 CAPÍTULO 3 - MENSURAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SALIVAR EM PRIMATAS DA ESPÉCIE <i>Callithrix jacchus</i> MANTIDOS EM CATIVEIRO.....	 42
Figura 1: Colheita de saliva em <i>Callithrix jacchus</i> após condicionamento.....	46
Figura 2: Curva ajustada obtida no ensaio para a mensuração da IgA salivar de <i>Callithrix jacchus</i>	49
Gráfico 1: Concentrações da IgA salivar (em ng/mL) de saguis comuns das 52 amostras que permaneceram dentro da curva	49

CAPÍTULO 4 - VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICÓIDES FECAIS PARA PRIMATAS DA ESPÉCIE <i>Callithrix jacchus</i>.....	56
Figura 1: Embalagem Synacthen Depot®.....	61
Gráfico 1: Representação das médias das leituras (ng/g) dois dias antes da aplicação do ACTH, no dia da aplicação e dois dias depois.....	66
CAPÍTULO 5 - VALIDAÇÃO BIOLÓGICA E LABORATORIAL DE METABÓLITOS FECAIS DE PROGESTERONA E DE ESTRADIOL: AVALIAÇÃO HORMONAL DA ATIVIDADE REPRODUTIVA DE SAGUIS COMUNS <i>Callithrix jacchus</i>.....	74
Figura 1: Chapa cega utilizada para separar o casal de <i>Callithrix jacchus</i>	82
Figura 2: Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de progesterona em amostras fecais de sagui comum (<i>Callithrix jacchus</i>) adicionada de quantidade conhecida de progesterona.....	87
Figura 3: Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de progesterona em amostras fecais de sagui comum (<i>Callithrix jacchus</i>) pela técnica de EIA.....	88
Figura 4: Curva Standart própria do conjunto diagnóstico comercial da Cayman ChemicalCompany® para dosagem de progesterona no plasma sanguíneo com limite de detecção: 80% B/B0: 10 pg/mL • Sensibilidade: 50% B/B0: 70 pg/mL.....	89
Figura 5: Representação das diferenças entre as médias (ng/g) das concentrações de metabólitos de progesterona fecal nas fases folicular e lútea medidas em momentos fisiológicos distintos (antes e após a puberdade).....	90
Figura 6: Médias das concentrações de metabólitos de progesterona (ng/g) no terço inicial, médio e final das gestações de fêmeas de <i>Callithrix jacchus</i>	93
Figura 7: Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de estradiol em amostras fecais de sagui comum (<i>Callithrix jacchus</i>).....	95

Figura 8: Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de estradiol em amostras fecais de sagui comum (<i>Callithrix jacchus</i>) pela técnica de EIA.....	95
Figura 9: Curva Standart própria do conjunto diagnóstico comercial da Cayman ChemicalCompany® para dosagem de estradiol no plasma sanguíneo com limite de detecção: 80% B/B0: 20 pg/mL • Sensibilidade: 50% B/B0: 125 pg/mL.....	96
Figura 10: Médias das concentrações de metabólitos de estradiol (ng/g) antes, durante e após as gestações de saguis (<i>Callithrix jacchus</i>).....	100
CAPÍTULO 6 - EFEITO DA PRÓPOLIS BRUTA NA DIETA DE SAGUIS <i>Callithrix jacchus</i> MANTIDOS EM CATIVEIRO, ANTES E DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	107
Figura 1: Peso dos saguis (g) machos e fêmeas separados entre os momentos (p=0,67).....	113
Figura 2: Peso entre os grupos controle e tratado após o agrupamento dos casais de saguis.....	114
CAPÍTULO 7 - MAL FORMAÇÃO FETAL EM SAGUI COMUM (<i>Callithrix jacchus</i>).....	119
Figura 1: Imagem radiográfica de abdômen de fêmea de <i>Callithrix jacchus</i> submetida a parto cesariana.....	126
Figura 2: Cesariana em <i>Callithrix jacchus</i>	126
Figura 3: Fetos de <i>Callithrix jacchus</i> apresentando mal formação.....	128
Figura 4: Fetos de <i>Callithrix jacchus</i> apresentando mal formação.....	129

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1. SAGUI COMUM (<i>Callithrix jacchus</i>).....	5
2. ESTRESSE.....	8
3. ESTRESSE E REPRODUÇÃO.....	12
4. ESTRESSE E SISTEMA IMUNE.....	13
5. CONDICIONAMENTO OPERANTE.....	16
6. MÉTODOS NÃO INVASIVOS.....	17
7. ENZIMOIMUNOENSAIO.....	19
8. VALIDAÇÃO LABORATORIAL.....	20
9. VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA.....	21
9.1 DESAFIO COM ACTH.....	21
10. PRÓPOLIS.....	22
CAPÍTULO 2 – O USO DE CONDICIONAMENTO INSTRUMENTAL E CLÁSSICO COM REFORÇO POSITIVO PARA A COLETA DE SALIVA E PESAGEM DE SAGUIS (<i>Callithrix jacchus</i>) PARA FIS DE PESQUISA.....	25
RESUMO E ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
OBJETIVOS.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	30

NOTA ÉTICA	35
RESUTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO 3 - MENSURAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SALIVAR EM PRIMATAS DA ESPÉCIE <i>Callithrix jacchus</i> MANTIDOS EM CATIVEIRO.....	42
RESUMO E ABSTRACT.....	43
1.0 INTRODUÇÃO.....	44
2.0 OBJETIVOS.....	45
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 LOCAL DE ESTUDO.....	45
3.2 ANIMAIS UTILIZADOS.....	46
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
3.4 DOSAGEM DA IgA SALIVAR.....	47
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.0 CONCLUSÕES.....	51
6.0 AGRADECIMENTOS.....	51
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 4 - VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICÓIDES FECAIS PARA PRIMATAS DA ESPÉCIE <i>Callithrix jacchus</i>.....	56
RESUMO E ABSTRACT.....	57
1.0 INTRODUÇÃO.....	58
2.0 OBJETIVOS.....	59
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	59

3.1 LOCAL DE ESTUDO.....	59
3.2 ANIMAIS UTILIZADOS.....	60
3.3 ALIMENTAÇÃO OFERECIDA.....	60
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	61
3.5 EXTRAÇÃO.....	62
3.6 ENZIMOIMUNOENSAIO.....	63
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
3.8 NOTA ÉTICA.....	63
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.0 CONCLUSÕES.....	67
6.0 AGRADECIMENTOS.....	68
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CAPÍTULO 5 - VALIDAÇÃO BIOLÓGICA E LABORATORIAL DE METABÓLITOS FECAIS DE PROGESTERONA E DE ESTRADIOL: AVALIAÇÃO HORMONAL DA ATIVIDADE REPRODUTIVA DE SAGUIS COMUNS <i>Callithrix jacchus</i>.....	74
RESUMO.....	75
ABSTRACT.....	76
INTRODUÇÃO.....	77
OBJETIVOS.....	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	80
EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS HORMONAIS.....	82
DOSAGENS DE METABÓLITOS DE PROGESTERONA FECAL.....	83
VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA.....	83
VALIDAÇÃO LABORATORIAL.....	84
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86

VALIDAÇÃO LABORATORIAL (METABÓLITOS FECAIS DE PROGESTERONA).....	86
CURVA DOSE-RESPOSTA.....	86
CURVA DE PARALELISMO.....	87
CONTROLE DE QUALIDADE.....	88
VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA E CICLICIDADE OVARIANA.....	89
GESTAÇÃO.....	92
VALIDAÇÃO LABORATORIAL (METABÓLITOS FECAIS DE ESTRADIOL).....	94
CURVA DOSE-RESPOSTA.....	94
CURVA DE PARALELISMO.....	95
CONTROLE DE QUALIDADE.....	96
VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA PARA METABÓLITOS FECAIS DE ESTRADIOL.....	97
CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS FECAIS DE ESTRADIOL ANTES, DURANTE E APÓS O PERÍODO GESTACIONAL.....	97
CONCLUSÕES.....	100
AGRADECIMENTOS.....	101
NOTA ÉTICA.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
CAPÍTULO 6 - EFEITO DA PRÓPOLIS BRUTA NA DIETA DE SAGUIS <i>Callithrix jacchus</i> MANTIDOS EM CATIVEIRO, ANTES E DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	107
RESUMO.....	108
ABSTRACT.....	108
INTRODUÇÃO.....	109
OBJETIVOS.....	110

MATERIAL E MÉTODOS.....	110
LOCAL DE ESTUDO.....	110
ANIMAIS UTILIZADOS.....	111
PRÓPOLIS UTILIZADA.....	111
TRATAMENTOS.....	111
PESO.....	112
NOTA ÉTICA	112
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	112
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	112
CONCLUSÕES.....	115
AGRADECIMENTOS.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
CAPÍTULO 7 - MAL FORMAÇÃO FETAL EM SAGUI COMUM (<i>Callithrix jacchus</i>).....	120
RESUMO E ABSTRACT	121
INTRODUÇÃO.....	122
OBJETIVO.....	123
RELATO DE CASO.....	123
DISCUSSÃO	127
CONCLUSÕES.....	131
AGRADECIMENTOS.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
DISCUSSÃO GERAL.....	134
CONCLUSÕES GERAIS.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
NORMAS DAS REVISTAS.....	159

RESUMO

FERRAZ, M. C. **AVALIAÇÃO DE PRIMATAS DA ESPÉCIE *CALLITHRIX JACCHUS* SUBMETIDOS AO CATIVEIRO.** Botucatu, 2013, 211 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Os condicionamentos clássico e instrumental com a utilização de reforço positivo aplicados aos animais da espécie *Callithrix jacchus* foram efetuados com praticidade e sucesso. Neste estudo as concentrações da IgA salivar na espécie de primatas *Callithrix jacchus* foram muito baixas. Sendo essa espécie utilizada como modelo biológico em diversos estudos e sendo a imunoglobulina A importante na verificação do status imunológico e como indicadora para medir o estresse em vários animais incluindo primatas não humanos, sugerimos novos estudos utilizando outras técnicas para a quantificação da IgA presente na saliva destes animais. Possivelmente devido às condições estruturais e ao desconhecimento do histórico dos animais, não foi possível concluir a validação fisiológica para os metabólitos fecais de glicocorticóides na espécie em estudo. Sendo assim para obter resultados fidedignos em pesquisas utilizando estes animais como modelo experimental, se faz necessário possuir estrutura contra frio e calor intenso, assim como manter os animais em local protegido de visitantes, sons e outros animais. Além disso, existe a necessidade do conhecimento do histórico dos animais e da utilização de uma colônia coesa com linhagem conhecida. Os conjuntos comerciais da Cayman Chemical[®] para a detecção de progesterona e estradiol em plasma humano utilizado nesse estudo para dosagem de metabólitos fecais de progesterona e estradiol em *Callithrix jacchus* foram validados tanto fisiologicamente quanto laboratorialmente permitindo desta forma, detectar aumentos e diminuições nas concentrações da progesterona durante a atividade cíclica ovariana e na fase gestacional como também detectar aumentos e diminuições nas concentrações de estradiol nos períodos antes, durante e após as gestações. A administração da própolis bruta na alimentação de *Callithrix jacchus* auxiliou no ganho de peso de machos e fêmeas antes do período gestacional além de ter colaborado na manutenção do peso do Grupo Tratado

durante a gestação das fêmeas, sugerindo desta forma uma melhor conversão alimentar. Devido a diferença no comportamento dos animais em dias em que não ocorriam eventos estressantes e devido aos relatos descritos na literatura, sugerimos que a alta incidência de natimortos apresentando mal formações pode estar relacionada com os altos níveis de estresse impostos ao grupo.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse; *Callithrix jacchus*; validação; primatas, reprodução.

ABSTRACT

FERRAZ, M. C. **EVALUATION OF PRIMATE *CALLITHRIX JACCHUS* SUBMITTED TO CAPTIVITY.** Botucatu, 2013, 211 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

The classical and instrumental conditioning using positive reinforcement applied to animals *Callithrix jacchus* were made with practicality and success. In this study the concentrations of salivary IgA in primate species *Callithrix jacchus* were very low. Since this species used as a model biological studies and being important in the immunoglobulin A and immune status check as an indicator to measure the stress in many animals including non-human primates suggest further studies using other techniques to quantify IgA in the saliva these animals. Possibly due to structural conditions and the lack of past animal, could not complete validation for physiological fecal glucocorticoid metabolites in the species under study. Thus to obtain reliable results in studies using these animals as an experimental model, it is necessary to have a structure against cold and heat, as well as keep the animals protected site visitors, sounds and other animals. Furthermore, there is a need to know the history of animals and the use of a known strain with cohesive colony. The commercial kits from Cayman Chemical ® for detection of progesterone and estradiol in human plasma used in this study for the determination of fecal metabolites of progesterone and estradiol *Callithrix jacchus* were validated both as laboratory physiologically allowing thereby detect increases or decreases in the concentration of progesterone during the cyclic ovarian activity during pregnancy and also as detecting increases and decreases in the concentration of estradiol in the periods before, during and after pregnancy. The management of the supply of raw propolis *Callithrix jacchus* aided in weight gain of males and females before the gestational period besides having collaborated in maintaining weight during pregnancy treated group of females, thus suggesting a better feed conversion. Because of the difference in the behavior of animals in days when no stressful events occurred and due to reports in the literature, suggest that the high incidence

of stillbirths presenting malformations may be related to high levels of stress imposed on the group.

KEY – WORDS: Stress; *Callithrix jacchus*; validation; primates, reproduction.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Muitas espécies e subespécies de primatas não humanos no Brasil encontram-se ameaçadas de extinção devido à caça, a destruição de seus habitats naturais bem como devido ao comércio clandestino da fauna e flora (VALLE, 2007), sendo assim o desenvolvimento de novas técnicas destinadas ao estudo da fisiologia reprodutiva destes animais, bem como as pesquisas realizadas visando melhor entendimento sobre o impacto causado por fatores estressantes no bem estar de animais mantidos em cativeiro é de grande importância.

Diversas espécies de primatas não humanos formam fortes laços sociais e, assim como nos humanos, os agentes estressores de natureza psicossocial são frequentes em suas vidas (HONESS e MARIN, 2006). Em zoológicos e centros de conservação o meio social dos animais está modificado, a densidade e composição das populações, bem como a reprodução são condicionadas pelo manejo (ZECCHINI, 2002).

Com a intenção de desenvolver ferramentas de pesquisa que pudessem ser utilizadas em animais silvestres e que reduzissem ao máximo o estresse das colheitas, algumas técnicas foram desenvolvidas, como por exemplo, a promoção do condicionamento (COE 2003; COSTA e PINTO, 2003; LAULE, 2003) e a monitoração não invasiva da função endócrina, mensurando metabólitos fecais e urinários (MÖHLE et al., 2002; SHIMIZU et al., 2003).

As técnicas de monitoração não invasivas permitiram aos pesquisadores que fossem analisados aspectos comportamentais, suas relações com os hormônios e o ambiente de cativeiro e sua influência no desempenho

reprodutivo (WHITTEN, 1997; WHITTEN et al., 1998; BOINSKY et al., 1999; PEEL et al., 2005). No entanto, para que se possa dosar hormônios em amostras fecais, torna-se necessária a realização da validação das técnicas de quantificação hormonal, pois a forma e o tempo de excreção dos metabólitos dos hormônios variam muito entre as espécies (WASSER et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2003; CHINNADURAI, 2006).

Sabe-se que durante situações de desafio impostas pelo ambiente físico, social ou ambos, os sistemas regulatórios do organismo desencadeiam alterações fisiológicas e comportamentais na tentativa de restabelecer a homeostase orgânica (Mc EWEN, 2000; Mc EWEN e WINGFIELD, 2003). O conjunto destas modificações é conhecido como resposta ao estresse (SAPOLSKY, 2002).

Quando a ativação dos sistemas de resposta ao estresse ocorre de forma aguda ela é adaptativa, possibilitando ao indivíduo uma resposta imediata, assim aumentando sua chance de sobrevivência. Porém quando esta resposta se torna prolongada, apresentando-se de forma crônica, a persistência das alterações fisiológicas pode ter efeito negativo sobre o organismo, levando ao surgimento de patologias físicas e distúrbios comportamentais, este impacto negativo decorrente do estresse crônico é conhecido como distresse (McEWEN 2000; SAPOLSKY et al., 2000; CHARMANDARI et al., 2005).

Denomina-se distresse portanto, quando o indivíduo se expõe a uma situação onde há um grande custo biológico, levando o organismo a desviar os recursos energéticos das funções biológicas normais para enfrentar o estressor

(MOBERG, 2000). Este desvio de recursos é o que causa os efeitos adversos do estresse, como a falha na reprodução (FOX e HARRISON, 2006).

A espécie *Callithrix jacchus* vem sendo utilizada como modelo em diversas áreas biomédicas como imunológica (PRASAD et al., 2007), terapia celular (SASAKI et al., 2005) e genética (DATSON et al., 2007; KOHU et al., 2008). Esta espécie é um modelo experimental adequado para o estudo da função endócrina uma vez que há uma extensa bibliografia disponível sobre sua endocrinologia, como também pelo seu pequeno porte e por sua alta adaptabilidade ao cativeiro (SOUSA et al., 2002; REGO, 2008). Por serem filogeneticamente semelhantes aos seres humanos em situações que induzem à ansiedade estes pequenos primatas estão sendo cada vez mais utilizados em pesquisas que envolvam a resposta ao estresse.

Estudos relativos à biologia reprodutiva são fundamentais para a avaliação das condições gerais das espécies, auxiliando na identificação de variações das populações de áreas definidas com determinado intervalo de tempo, além de fornecer dados sobre as estratégias de adaptação dos animais em face das mudanças ambientais (WIRZ e RIVIELLO, 2008).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Sagui comum (*Callithrix jacchus*)

O *Callithrix jacchus* conhecido também como sagui comum, é um pequeno primata arbóreo, pertencente à família Callitrichidae que habita a Mata Atlântica brasileira (HEARN, 1983). Todas as espécies da família são onívoras, alimentando-se de grande variedade de material vegetal (exsudatos, sementes, flores, frutos, néctar dentre outros) e animal (artrópodes, moluscos e pequenos vertebrados) (AURICCHIO, 1995).

Algumas características morfológicas desses primatas são: ausência do terceiro molar, órbita ocular presa ao crânio, modificação das unhas, manutenção da forma preênsil do hálux e a redução no tamanho do corpo (STEVENSON e RYLAND, 1988; SGAJ, 2007). O desenvolvimento dos incisivos inferiores e adaptações do intestino possibilitaram a estes animais a extração e utilização de goma das árvores.

A atividade desses animais é muito intensa, passam a maior parte do tempo se locomovendo (MIRANDA, 1997) e despendem mais de 60% do dia em atividades de forrageamento (ERWIN e SACKETT, 1990).

As fêmeas de *C. jacchus* não apresentam sinais externos da ovulação, não menstruam, os ciclos ovulatórios são contínuos e o estro pós-parto pode ser observado poucos dias após o nascimento dos filhotes (CHAMBERS e HEARN, 1979). Os filhotes na maioria das vezes gêmeos são amamentados, normalmente, por um período de aproximadamente 70 dias, o desmame é iniciado 30 dias após o nascimento, quando os filhotes já conseguem pegar os

alimentos com suas mãos ou receber alimentos oferecidos pelos seus parentes (HEARN, 1983).

O cuidado aos filhotes não se restringe ao casal reprodutor (TARDIF, 1994), indivíduos não reprodutores também participam no cuidado à prole (ROUSH e SNOWDON, 2001; HATTORI, 2004). Tal característica é fundamental à manutenção da alta taxa reprodutiva, uma vez que implicaria em uma demanda energética muito alta, tornando-se inviável para a fêmea reprodutora (TARDIF et al, 1986).

O cuidado cooperativo é um sistema relativamente raro em mamíferos e em relação aos primatas parece estar restrito somente aos calitriquídeos (SNOWDON e PICKHARD, 1999).

Os indivíduos cuidadores da prole obtêm benefícios em termos de aptidão abrangente em grupos familiares, além de que ao atingirem a maturidade reprodutiva devido à experiência obtida enquanto cuidadores, geralmente têm maior sucesso reprodutivo que os indivíduos que não tiveram tal experiência (TARDIF e JAQUISH 1997).

Entre os mecanismos envolvidos com o monopólio reprodutivo está a supressão da fertilidade de fêmeas subordinadas (HEARN, 1983). Embora a inibição reprodutiva possa ser expressa em nível hormonal e/ou comportamental, Sousa et al., 2005 concluíram que sob condições de campo, a inibição comportamental pareceu ser predominante em relação à hormonal uma vez que foi verificado funcionamento ovariano em fêmeas subordinadas ao longo do período de estudo.

Digby e Ferrari (1994) proporcionaram novas discussões, uma vez que apresentaram à comunidade científica a ocorrência de reprodução de duas

fêmeas, e não apenas uma, em um grupo selvagem de sagüi comum, sugerindo ocorrer poligínia.

O conceito de flexibilidade no sistema de acasalamento é então admitido para a espécie, onde embora seja considerada prioritariamente a monogâmica, também poderá ocorrer a poligínia e poliândria de modo ocasional (ARRUDA et al., 2005; SOUSA et al., 2005).

Segundo GUIMARÃES (2001), os níveis circulantes de progesterona em fêmeas de primatas neotropicais são oito a doze vezes mais altos que os encontrados em fêmeas de primatas do Velho Mundo e seis a dez vezes mais altos que os descritos em seres humanos

O primeiro pico de progesterona no plasma das fêmeas pode ser encontrado por volta dos 300 dias de idade, mas o padrão não sugere ovulação normal até 6-12 meses depois (HEARN, 1983).

Hearn e Lunn (1975) descreveram um ciclo com duração média de 16.4 dias enquanto Harding et al. (1982) observaram um ciclo ovariano de 30.4 dias. Estes dois relatos foram oriundos de uma mesma colônia. No entanto, os animais utilizados no primeiro estudo foram capturados da natureza e no segundo estudo os saguis utilizados eram nascidos na colônia. O ciclo pode ser dividido em uma fase folicular de $8.3 \pm 0,3$ dias e uma fase lútea de 19.2 ± 0.6 dias (HEARN, 1983).

A fase folicular é caracterizada por níveis basais circulantes de progesterona, aumentos nos níveis de estradiol e um pico pré - ovulatório de LH (GILCHRIST et al., 2001).

No plasma de *C. jacchus*, a fase lútea de cada ciclo ovariano foi definida a partir do aumento sustentado dos níveis de progesterona plasmática acima

de 10ng/mL, até a sua redução a níveis basais. A ovulação deve ocorrer aproximadamente 24 horas antes do aumento de progesterona acima de 10ng/mL. A fase folicular consiste no restante do ciclo e os níveis de progesterona são encontrados abaixo de 10ng/mL (KENDRICK e DIXSON, 1983).

Saldanha et al. (2005), estudando as alterações hormonais antes e pós parto de pares reprodutores de saguis comuns, observaram que a maioria das fêmeas utilizadas apresentaram na terceira semana após o parto, concentrações de progesterona plasmática acima de 10ng/mL, valores compatíveis com a ovulação, caracterizando portanto, o estro pós-parto. Esta espécie em cativeiro não apresenta sazonalidade reprodutiva, reproduzindo-se ao longo de todo ano (VERONA, 2009).

2. ESTRESSE

Quando um animal encontra-se em uma potencial ou real situação de risco o sistema nervoso simpático autônomo é ativado imediatamente, aumentando a atividade da medula das glândulas adrenais desta forma liberando adrenalina e noradrenalina. Estes hormônios induzem a liberação de glicose pelo fígado, o aumento da pressão sanguínea e dos batimentos cardíacos, elevam a frequência respiratória, aumentam o metabolismo dos músculos esqueléticos e no cérebro, induzem a constrição de vasos sanguíneos esplênicos e estimulam a produção de células do sistema imune inato (NELSON, 2000).

Outro sistema ativado é o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), a partir da ativação das células do núcleo paraventricular hipotalâmico ocorre liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF). Este fator alcança o sistema sanguíneo porta-hipofisário chegando à adeno-hipófise, assim induzindo a liberação do hormônio adreno-corticotrófico (ACTH), que por sua vez, induz a liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal, dos quais o cortisol é o principal representante nos primatas (GUYTON, 2008).

O conjunto de respostas desencadeadas frente a um agente estressante (estressor) é chamado de Síndrome Geral da Adaptação (SGA) e pode ser dividido em três estágios que se diferenciam em decorrência do tempo (SELYE, 1959).

O primeiro estágio é chamado de reação de alarme e ocorre quando o animal se defronta com o estressor. Nesta fase, ocorre uma mobilização geral do organismo na tentativa de adaptação às novas condições, havendo a participação do sistema nervoso autônomo simpático na estimulação da medula adrenal para a liberação de catecolaminas (DANTZER e MORMÉDE, 1984).

O segundo estágio, conhecido como adaptação ou resistência, ocorre em decorrência do primeiro, quando o estímulo estressor continua sendo mantido (SELYE, 1959). Nesta fase, o sistema nervoso autônomo simpático entra em hiperatividade e há uma estimulação intensa do sistema neuro-endócrino para a liberação de glicocorticóides pelo córtex adrenal. O animal busca habituar-se à presença do estressor, entrando num estado no qual a resposta a este se torna diminuída (DANTZER e MORMÉDE, 1984).

O último estágio, chamado de exaustão, ocorre quando o estressor é mantido até que o animal não tenha mais capacidade de se adaptar. Não há descanso, nem retorno à homeostasia (DANTZER e MORMÉDE, 1984). As reservas energéticas vão se esgotando e o processo evolui até a morte do animal por falência orgânica múltipla. Esta fase não é necessariamente irreversível, pois depende da importância dos órgãos afetados. Além disso, o animal pode vir a óbito já na fase de alarme, pela descompensação orgânica causada pelo processo (SELYE, 1959).

Outra classificação importante do estresse é relacionada à sua natureza, forma de manifestação e consequências desencadeadas. Assim, o estresse pode ser chamado de eustresse (quando se tratar de um evento positivo, ou seja, do estresse necessário à sobrevivência do indivíduo frente a uma adversidade) ou distresse (quando o estresse desencadeado acabar sendo prejudicial ao organismo). O eustresse normalmente se relaciona à fase de alarme do estresse, quando há retorno à homeostasia, e o distresse às duas últimas fases (resistência e exaustão), nas quais pode começar a ocorrer danos orgânicos (JANOSIK e DAVIES, 1996).

As causas de estresse para os animais selvagens mantidos em cativeiro são variadas (PACHALY et al., 1993). O animal encontra-se geralmente em um ambiente restritivo, com variedade de substratos, plantas, alimentos e temperatura diferentes das oferecidas na natureza (MADER, 1996). Muitas vezes o horário de alimentação e a composição de grupos e casais são determinados pelos humanos, e o contato homem-animal acaba sendo muito próximo (MASON, 1991).

O animal normalmente não necessita de nenhum esforço para buscar alimentos ou procurar um parceiro para a formação de casais. A própria condição de desconforto gerada pelo meio, associada à impossibilidade de fuga, gera uma condição de estresse intensa para estes animais (MENDOZA, 1991).

As principais causas de estresse para os animais selvagens em cativeiro podem ser agrupadas em algumas categorias. Estressores somáticos, como sons, imagens e odores estranhos, manipulação, mudança de espaço físico (de ambiente), calor e frio excessivos e efeitos de fármacos e agentes químicos. Estressores psicológicos como, por exemplo, sentimentos de apreensão, que podem intensificar-se para ansiedade, medo e terror, na sua forma mais severa. Estressores comportamentais relacionados à disputas territoriais ou hierárquicas, superpopulação, condições não familiares de ambiente, mudanças no ritmo biológico, falta de contato social, de privacidade, de alimentos e de estímulos naturais (ORSINI e BONDAN, 2006).

Os problemas induzidos pelo próprio homem, como o alojamento próximo de espécies antagônicas (por exemplo, um predador próximo a uma presa) e estressores mistos como má-nutrição, intoxicações, ação de agentes infecciosos e parasitários, queimaduras, cirurgias, imobilização química e física e confinamento também são exemplos de causas de estresse (FOWLER, 1986).

3. ESTRESSE E REPRODUÇÃO

SELYE (1939) sugeriu uma relação entre os hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA), que são liberados durante o estresse e os hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG), demonstrando assim que o estresse é acompanhado por um aumento da atividade do eixo HPA e por uma redução das funções reprodutivas. O estresse prolongado inibe a secreção de hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) e bloqueia a ovulação (DALLMAN et al., 1985; SWANSON e SIMMONS, 1989).

Nos animais silvestres, o estresse da contenção pode interferir na própria ciclicidade gonadal, uma das alternativas é o acompanhamento dos hormônios gonadais nas excretas (OLIVEIRA et al., 2001).

A reprodução animal pode ser suprimida ou estimulada pelo estresse, dependendo da intensidade, do tempo e da habilidade do animal em interagir com o agente estressor (SHEPHERDSON, 1994). O impacto fisiológico e comportamental de um agente estressor é altamente dependente da percepção e do tipo de resposta comportamental do indivíduo.

O estresse crônico pode induzir alterações no eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal, provocando a redução das concentrações de hormônios esteróides sexuais, levando a uma redução da libido, da atividade sexual ou a uma supressão reprodutiva com conseqüente comprometimento reprodutivo (CARLSTEAD e SHEPHERDSON, 1994).

A função cíclica ovariana pode ser facilmente perturbada por estressores físicos ou emocionais que atuam sobre o hipotálamo alterando a secreção de fatores liberadores ou inibidores de hormônios hipofisários.

O cortisol eleva o nível de glicemia, pois aumenta a gliconeogênese hepática direcionando esta energia para as funções essenciais a situações de desafio. Por outro lado a digestão, o crescimento, a percepção da dor e aspectos fisiológicos e comportamentais da reprodução sofrem inibição por ação deste hormônio (GUYTON, 2008).

4. ESTRESSE E SISTEMA IMUNE

Considerando-se estresse e sistema imunológico, sabe-se que fatores estressantes acabam influenciando o sistema imune (BOSCH et al., 2002).

Um dos primeiros cientistas a demonstrar experimentalmente a ligação do estresse com o enfraquecimento do sistema imunológico foi Louis Pasteur (1822- 1895) (VILELA, 2003). Uma alteração precoce que se observa durante o estresse é o aumento nos níveis dos hormônios corticosteróides secretados pelas glândulas supra-renais. Parece que estes níveis estão em proporções inversas à eficácia dos mecanismos de adaptação (VILELA, 2003).

A glândula supra - renal parece ter um desempenho mais ou menos seletivo no estresse. Em estados de agressão, enquanto a córtex secreta cortisona, a medula da glândula também participa, liberando norepinefrina (noradrenalina). Nas situações estressoras de tensão e ansiedade a liberação medular privilegia a epinefrina (adrenalina) (VILELA, 2003).

As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) afetam as reações imunológicas, seja por reação fisiológica, como por exemplo, a contração do baço, seja por estímulo celular através de receptores específicos (adrenérgicos) na membrana celular, sugerindo um aumento das catecolaminas e inibindo assim as respostas de anticorpos (VILELA, 2003). Portanto as células do sistema imunológico encontram-se sob uma complexa rede de influência dos sistemas nervoso e endócrino.

Estresse interno (infecções) e externos (psicológicos) podem ativar a liberação de citocinas como a IL-1(interleucina-1), que por sua vez, desencadeia fenômenos periféricos e centrais. Periféricamente ocorre liberação de citocinas pelos linfócitos, levando a um aumento de proteínas de fase aguda, liberação de cortisol pela adrenal e diminuição da atividade das células *natural Killer* (NK). O aumento de cortisol por sua vez, funciona como mecanismo de *feedback* negativo para inibir a resposta imunológica exacerbada iniciada pela cascata de citocinas (KRONFOL e REMICK, 2000).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias pode alterar o comportamento e o humor, levando ao aparecimento de uma “síndrome comportamental” caracterizada por fadiga, mal estar, letargia, diminuição do apetite, anedonia e hipersonia, baixa concentração, hiperalgesia e desinteresse pelas atividades em geral. Este quadro ocorre tipicamente em indivíduos com infecções ou situações de estresse (KENT et al., 1992).

Mediadores como neurotransmissores e hormônios diversos atuam sinergicamente com outros produtos linfocitários, macrófagos e moléculas de produtos inflamatórios na regulação de suas ações (VILELA, 2003). Os glicocorticóides e as catecolaminas liberados durante uma situação de estresse

modulam o sistema imunológico através de seus receptores específicos presentes nas células alvo (PADGETT e GLASER, 2003). Uma elevada quantidade de receptores GR (tipo II) de alta especificidade tem sido encontrada no timo, seguido de uma menor concentração nos linfonodos, baço e células mononucleares do sangue periférico (MILLER et al.,1998).

O estresse apresenta um efeito diferencial na função imunológica. O estresse agudo promove uma imuno estimulação, enquanto que o crônico desencadeia um processo de imunossupressão (DHABHAR e McWEN, 1997). Baseado neste fato a imunoglobulina A está sendo estudada como uma possível indicadora de estresse em vários animais incluindo primatas (PERSON,1998; FLORENCE et al.,1999; CARVER e HAU,2000).

Também existem relatos na literatura de que a IgA presente na saliva tem seus níveis reduzidos em humanos em situações de estresse físico e emocional, como em estudantes submetidos a exames e em mulheres vivenciando situações de ansiedade pós-parto (McLLAND et al., 1985; ANNIE e GROER,1991; GLEESON et al., 1995; DEINZER e SCHULLER 1998; NG, et al., 1999); por outro lado em situações de relaxamento, ocorre um aumento dos níveis de IgA na saliva (GREEN et al., 1988).

Existe também uma associação entre mudanças no humor e modificações no sistema imune, encontrando correlação entre a redução de IgA e humor negativo ou pessimismo (STONE et al., 1987; BRENNAN e CHARNETSKI, 2000).

5. CONDICIONAMENTO OPERANTE

Além dos comportamentos inatos ou espontâneos, uma variedade de padrões comportamentais pode ser aprendida. O aprendizado pode ser classificado em três categorias distintas: habituação, condicionamento de resposta ou clássico, e condicionamento operante ou instrumental (CLASSEN, 2000).

A habituação é considerada como uma forma primitiva de aprendizado devido a suas características não associativas (OVERSTREET, 1977), já o condicionamento de resposta ou clássico (Pavloviano) é baseado no fato de que os animais constroem associações entre eventos sucessivos ou estímulos. Um desses eventos ou estímulos induz uma resposta, a chamada resposta incondicional. Quando os estímulos incondicionais são pareados repetitivamente com um outro estímulo (estímulo condicionado), o animal irá formar uma associação entre esses dois estímulos e finalmente irá extrair a mesma resposta na ausência do estímulo não condicional, sendo que essa resposta é chamada de condicionada (CLASSEN, 2000).

Quando uma resposta é seguida de uma recompensa ou por um evento adverso, a resposta ocorrerá mais rapidamente na oferta da recompensa e será menos rápida na situação de um evento adverso. Quando por exemplo, um indivíduo pressiona uma alavanca e como consequência recebe algum alimento esse indivíduo tenderá a puxar mais a alavanca para receber mais alimento (MACPHAIL e LEANDER, 1981).

Os benefícios do condicionamento incluem a diminuição do estresse, uma maior flexibilidade e confiabilidade na coleta de dados e redução no uso

de agentes anestésicos. O treinamento também fornece meios para reduzir comportamentos agonísticos, melhorar os programas de enriquecimento, e aumentar a segurança das pessoas que estão envolvidas nos cuidados destes animais (LAULE, 2003).

6. MÉTODOS NÃO INVASIVOS

O material utilizado para dosagens hormonais pode ser plasma ou soro, saliva, fezes, urina e fezes misturada com urina, como observado em aves devido à excreção conjunta (WASSER et al., 2002), no entanto os métodos tradicionais dos estudos endócrinos, invariavelmente envolvem colheitas seriadas de sangue para a mensuração de hormônios.

O uso das metodologias tradicionais é muitas vezes inviável nas espécies silvestres, como os primatas, por promoverem intensas respostas de estresse que podem comprometer seriamente os resultados de um experimento (WHITTEN, 1997).

Os calitriquídeos não exibem sinais claros do seu status reprodutivo. Como a cópula ocorre durante todo o ciclo, não pode ser um indicativo da ocorrência da ovulação (HEARN, 1983). Portanto se faz necessário a aplicação de métodos de monitoramento endócrino para a determinação das fases do ciclo ovariano (HEISTERMANN et al., 1993). Sendo assim a detecção de metabólitos de hormônios reprodutivos em urina e fezes permite o monitoramento reprodutivo não invasivo, que além de não produzir reações do tipo estresse também não acarreta alterações sociais ou comportamentais que prejudiquem a fertilidade (ZIEGLER et al., 1996).

O acesso para a realização das mensurações hormonais em urina e/ou fezes permite o monitoramento a longo prazo da função reprodutiva de animais em que a colheita diária de sangue é impraticável como na espécie *Saimiri Vanzolini* (mico de cheiro) em que a colheita de sangue seriada pode colocar em risco a saúde do animal (WASSER et al., 1988; SHIMIZU, 2005).

Heisterman (1993) em seu estudo com calitriquídeos relatou um intervalo médio de 48 horas entre um aumento na progesterona plasmática e um aumento significativo nos metabólitos fecais; ou seja, as quantidades mensuradas de esteróides fecais refletem um evento que aconteceu há algum tempo atrás (PALME, 2005).

As amostras fecais para a monitoração endócrina devem ser colhidas no início da manhã. A probabilidade de obter a amostra no início da manhã é de quase 100% e também para haver uma padronização na colheita de amostras. É comum ocorrer variações nas concentrações de alguns metabólitos de esteróides entre o período da manhã e da tarde podendo levar a falsos resultados (SOUSA e ZIEGLER, 1998).

A maior parte dos metabólitos fecais é eliminada sob a forma não-conjugada (forma livre) devido a ação enzimática nas fezes e de bactérias fecais sobre os metabólitos que foram conjugados no fígado. O metabólito excretado, sua forma, o intervalo de tempo entre uma alteração sérica dos níveis de esteróides e a sua correspondente excreção nas fezes ou urina, podem variar consideravelmente entre as espécies e entre os esteróides em uma mesma espécie animal (GRAHAM, 2001). Assim, a validação de métodos não invasivos se torna imprescindível para cada espécie antes da sua aplicação (PALME, 2005).

7. ENZIMOIMUNOENSAIO

As enzimas são os marcadores mais utilizados na atualidade, com as vantagens de não apresentarem riscos associados à exposição de radioisótopos, bem como a possibilidade de amplificação catalítica e da associação com outros marcadores, como por exemplo, os quimioluminescentes e fluorescentes, resultando em ensaios de baixo limite de detecção (TSUJI, 1989; JOHANNSSON, 1991).

O exemplo significativo de enzimoimunoensaios (EIE) heterogêneo é o método que emprega anticorpos imobilizados em placa de poliestireno com número variável de poços de ensaio.

Em protocolo clássico o método é realizado em oito etapas: 1-ativação da placa, 2-lavagem, 3-imobilização dos anticorpos, 4-lavagem, 5-incubação, 6-lavagem, 7-adição do substrato cromogênio e 8- leitura óptica dos poços. Esse sistema de placas possibilita a realização do ensaio de maneira que garanta a uniformidade de todas as etapas tanto para amostras e referências, condição essencial para a confiabilidade dos dados.

A maioria dos EIE utiliza anticorpos específicos para hormônios esteróides não metabolizados ou conjugados de esteróides metabolizados, o que os torna mais aplicáveis para a mensuração de hormônios esteróides circulantes no sangue ou metabólitos conjugados na urina, respectivamente. Entretanto fezes são mais fáceis de colher do que o soro ou urina, sendo a análise de esteróides fecais o método preferencial para monitoramento não invasivo da função endócrina em animais de cativeiro ou de vida livre (LASLEY e KIRKPATRICK, 1991; MUNRO et al., 1991; CZEKALA et al.,1994).

8. VALIDAÇÃO LABORATORIAL

Os kits para dosagens hormonais foram desenvolvidos para a mensuração de hormônios presentes na circulação sistêmica e, como nas fezes há metabólitos hormonais e não o hormônio original existe a necessidade de validação das ferramentas de análises, para não avaliar erroneamente os níveis encontrados (WASSER et al., 2002).

A obtenção adequada da especificidade, sensibilidade, precisão e reprodutibilidade do ensaio, dependem do controle de precisão da pipetagem, controle da temperatura, tempo de incubação e análise dos dados (BROWN e STEINMAIN, 2004).

A curva dose resposta é utilizada para medir a acurácia do teste, ou seja, a quantidade exata do hormônio presente na amostra (BROWN e STEINMAIN, 2004). Por outro lado a curva de paralelismo é realizada para demonstrar se as amostras se comportam de forma semelhante à curva padrão, ou seja, se os metabólitos dos extratos estão interagindo com o anticorpo de forma similar ao hormônio usado como padrão, e se as amostras estão localizadas dentro de valores confiáveis dentro da dosagem, sem subestimar ou superestimar os valores (MÖSTL et al., 2005).

Geralmente a variação entre ensaios é maior que a variação dentro do ensaio. É importante que a concentração de hormônio (dose) tenha valores de resposta próximos, com um coeficiente de variação (CV) de no máximo 20% (BROWN et al., 2004).

9. VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA

A validação fisiológica indica se as concentrações de metabólitos de esteróides encontradas refletem a função gonadal ou adrenal (CATTARUZI, 2008). A validação fisiológica é fundamental para avaliar se a acurácia na mensuração hormonal reflete os eventos fisiológicos de interesse. Pode ser realizada entre dois grupos com diferentes níveis de glicocorticóides ou esteróides, podendo ser essa produção obtida por estimulação natural ou por estimulação da produção hormonal à partir da administração de drogas, sendo utilizada para demonstrar a causa-efeito relacionada entre a administração exógena e subsequente excreção do hormônio (PALME, 2005; CHINNADURAI, 2006)

9.1 DESAFIO COM ACTH

Uma das formas de se estabelecer a relevância fisiológica dos metabólitos quantificados é através de desafios hormonais. A injeção de ACTH deverá estimular a função adrenal e aumentar os níveis de metabólitos de glicocorticóides na urina e nas fezes após um determinado tempo de eliminação (WASSER et al., 2000).

O objetivo do desafio com ACTH é estimar o grau de alteração existente na atividade da síntese enzimática no córtex adrenal provocada por atividade previa. Essa prova requer a administração de uma quantidade suficiente do hormônio para provocar a máxima secreção possível de glicocorticóides pelo córtex adrenal (BROOM e JHONSON, 1993; DANTZER, 1994).

10. PRÓPOLIS

Muitos animais silvestres em vida livre encontram fontes de alimentos que não são oferecidas em zoológicos e locais de preservação, como os calitriquídeos, que se alimentam da goma que é uma resina liberada por algumas espécies de árvores, composta por açúcares e sais minerais, ricos em proteínas (CASTRO e ARAÚJO, 2006). Sendo assim, a própolis produzida e elaborada pelas abelhas a partir de secreções de árvores, flores e folhas e que recebe ainda a adição de substâncias secretadas pelo metabolismo glandular das abelhas (BURDOCK, 1998) pode auxiliar como um recurso alimentar para primatas em cativeiro.

Nas últimas décadas houve um aumento do interesse dos pesquisadores em relação à própolis, fato este devido as suas diversas propriedades biológicas e terapêuticas, como imunomoduladora, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória, dentre outras (BANKOVA et al., 2000; CASTRO, 2001; ORSI et al., 2005; ORSI et al., 2006; SFORCIN, 2007), podendo atuar, também, na redução dos efeitos promovidos por situações estressantes (PALERMO-NETO et al., 2001; MISSIMA et al., 2009).

Garcia et al (2004) demonstraram um maior ganho de peso em coelhos que receberam doses mais baixas de própolis na sua alimentação. Ferraz (2008) em seu estudo com primatas das espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* demonstrou que os animais que receberam a dose mais baixa de própolis tiveram uma melhor manutenção do peso corpóreo quando submetidos ao estresse.

PEREZ (1989) estudando a dose parenteral da própolis sobre a resposta imune em coelhos observou que doses mais altas sugerem uma influência inibitória, enquanto as mais baixas mostraram melhores resultados refletindo-se em níveis mais elevados de imunoglobulinas e anticorpos.

CAPÍTULO 2

The use of instrumental and classical conditioning with positive reinforcement for collection of saliva and for the weighing from marmosets (*Callithrix jacchus*) for research purposes.

O uso de condicionamentos instrumental e clássico com reforço positivo para a coleta de saliva e pesagem de saguis (*Callithrix jacchus*) para fins de pesquisa.

Myrna Campos Ferraz¹, André Vicente Ruiz de Matos², Carlos Roberto Teixeira³,
Bruna Silva Miranda⁴, Lygia Karla Sanches Francelino⁵, Talita Fausto da Motta
Santos⁶Eunice Oba⁷

^{1,2,3,4,5,6,7} Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP - Brasil.

¹ dra_myrnacampos@yahoo.com.br, ² pameso_xl@yahoo.com.br, ³
teixeiracr@fmvz.unesp.br, ⁴ bruna_usp@yahoo.com.br, ⁵lygia.francelino@hotmail.com,
⁶talita_fausto@hotmail.com, ⁷euniceoba@fmvz.unesp.br

¹Myrna Campos Ferraz – dra_myrnacampos@yahoo.com.br / Departamento de
Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- Adress: Distrito de Rubião Júnior s/nº-
Rubião Júnior CEP:18618-000- Botucatu, SP - Brasil. TEL: 55-14 3811-6249/ (FAX)
55- 14 38116326.

Trabalho escolhido para apresentação oral no XIV Congresso e XX Encontro da
Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens – ABRAVAS 2011.

ACKNOWLEDGEMENTS: Financial support by São Paulo Research Foundation
(FAPESP) - (2009/52654-9; 2010/51926-2).

Running head: Conditioning in laboratory animals

* Artigo a ser enviado para a Revista American Journal of Primatology

RESUMO: Para que haja uma melhora no bem-estar de animais selvagens utilizados em pesquisa é necessário o emprego de técnicas que reduzam os efeitos estressantes aos quais os animais são constantemente submetidos. Sabemos que o estresse pode ocasionar alterações fisiológicas podendo alterar os resultados de um experimento e que a cooperação voluntária obtida através do aprendizado pode minimizar sensações de ansiedade vividas por animais mantidos em laboratório. Sendo assim a busca de métodos não invasivos para a coleta de material biológico e exames laboratoriais é de grande importância. O objetivo do presente estudo foi efetuar o condicionamento de saguis-de-tufo-branco para coletas de saliva e pesagem com finalidade de pesquisa. Para tanto utilizamos a técnica do condicionamento instrumental com reforço positivo (recompensa) e de condicionamento clássico com reforço positivo em 24 animais da espécie *Callithrix jacchus* adultos, de ambos os sexos. Segundo as condições deste estudo, todos os animais foram condicionados à coleta de saliva e pesagem de forma satisfatória, rápida e eficiente demonstrando que as técnicas de condicionamento instrumental e clássica, nesta espécie, puderam ser realizadas com sucesso.

Palavras-chave: *Callithrix jacchus*; estresse; condicionamento; bem-estar; pesquisa.

ABSTRACT: To improve the welfare of captive wild animals used in research, it is necessary to apply methods that minimize the stress to which the animals are constantly subjected. Stress produces physiological changes that may interfere with the results of laboratory experiments, and voluntary cooperation through learning may minimize the anxiety experienced by laboratory animals. It is therefore important to develop non-invasive methods for the collection of biological samples and the performance of laboratory exams. The aim of this study was to train common marmosets (*Callithrix jacchus*) for the collection of saliva samples and weighing. Instrumental operant

conditioning with positive reinforcement (reward) and classical conditioning with positive reinforcement was applied to 24 adult marmosets of both genders. All animals were satisfactorily conditioned for the rapid and effective collection of saliva samples and weighing, demonstrating these conditioning techniques may be successfully applied to this species.

Key-Words: *Callithrix jacchus*; stress; conditioning; welfare; research

INTRODUÇÃO

O estresse é bastante observado em animais selvagens em cativeiro (Pachaly et al. 1993) sendo assim é necessário que haja uma preocupação com a qualidade de vida das espécies durante o período de confinamento, havendo a necessidade de adotarmos alternativas para a melhoria de seu bem-estar (Costa & Pinto 2003; Laule 2003) como, por exemplo, a promoção do condicionamento (Coe 2003; Costa & Pinto 2003; Laule, 2003).

O condicionamento animal é normalmente realizado por meio da oferta de recompensas ao indivíduo que apresente uma resposta comportamental desejável (Coe, 2003). Desta forma, os animais são treinados a desenvolver atitudes voluntárias, tais como a apresentação dos membros anteriores para a realização de colheita de sangue mediante o oferecimento de algo que o animal goste, como por exemplo, determinados alimentos. Essa é uma prática bastante utilizada no condicionamento de primatas superiores (Laule, 2003).

Chama-se condicionamento operante o comportamento associado às suas consequências. O condicionamento operante é composto por um estímulo seguido de uma reação, se esse comportamento for seguido de resultados agradáveis, será realizado

com maior frequência, mas se for seguido de consequências desagradáveis, o comportamento tende a ser repetido menos vezes (Moura, 2007).

A cooperação voluntária do animal diminui sensações como o medo e ansiedade, que surgem normalmente na realização de procedimentos invasivos, o que contribui para a diminuição do estresse (Coe, 2003). O condicionamento com reforço positivo é normalmente realizado por meio da administração de recompensas ao animal que apresente uma resposta comportamental desejável. O condicionamento instrumental ou operante depende da resposta do animal frente ao que foi ensinado. Neste tipo de treinamento, utiliza-se um “clicker” ou algum instrumento sonoro, que é acionado cada vez que o animal desempenha corretamente o comportamento pedido, funcionando como uma ponte entre este momento e a entrega da recompensa (Cipreste & Costa 2002).

Os benefícios do condicionamento incluem a diminuição do estresse, uma maior flexibilidade e confiabilidade na coleta de dados e redução no uso de agentes anestésicos. O treinamento também fornece meios para reduzir comportamentos agonísticos, melhorar os programas de enriquecimento, e aumentar a segurança das pessoas que estão envolvidas nos cuidados destes animais (Laule, 2003). Além disso, também reduz a necessidade do uso de contenção física e/ou química para a realização de pequenas intervenções e permite a dessensibilização dos animais a uma ampla variedade de fatores estressantes, tais como procedimentos veterinários e trocas de recintos.

A ciência de animais de laboratório considera o bem-estar animal como um dos principais fatores que podem influenciar o resultado de um experimento, valorizando o uso ético dos animais e retomando o princípio dos três R's: refinamento, redução e substituição (Russel & Burch, 1959). Treinar animais utilizando técnicas de reforço

positivo reduz significativamente o impacto adverso de procedimentos invasivos sendo, portanto considerado um refinamento.

Manuseados com frequência e submetidos a uma ampla gama de procedimentos invasivos, primatas não humanos em um ambiente de laboratório têm necessidades específicas. Neste sentido para que sejam obtidos resultados fidedignos em pesquisas e para proteger e melhorar o bem-estar dos animais é imprescindível que estes procedimentos sejam executados da maneira menos estressante possível.

O fato de a saliva poder ser facilmente coletada quando comparada à coleta de sangue, tem despertado especial interesse nos pesquisadores. (Dawes 1993, Moura 2007). Experimentos envolvendo animais selvagens utilizando a saliva para a determinação de hormônios estão sendo cada vez mais utilizados por ser um método não invasivo, reduzindo assim os impactos ocasionados por situações de estresse (Cross & Rogers, 2004).

O reconhecimento individual e a observação atenta do comportamento do indivíduo ajuda a desenvolver um relacionamento com cada animal, que pode ser benéfico para seu bem-estar, por exemplo, através da redução da ocorrência de comportamento agonístico e medo dos seres humanos. Apesar disso, a literatura científica sobre o tema é escassa e o condicionamento não é usado tão amplamente quanto poderia ser. Isto pode ser devido à escassez de informações sobre a forma de como condicionar os animais, falta de uma avaliação sobre as vantagens potenciais do treinamento aliado a falta de confiança na capacidade de treiná-los e a superestimação do tempo necessário (Reinhardt, 1997).

Um questionário foi aplicado em 13 estabelecimentos do Reino Unido que trabalhavam com reprodução de primatas não humanos sobre a utilização do treinamento. A pesquisa demonstrou que existe uma consciência generalizada dos

benefícios do condicionamento, no entanto o treinamento não é utilizado tão amplamente quanto poderia ser. De acordo com o questionário realizado, isso ocorre principalmente devido às limitações reais, como por exemplo, falta de pessoal e de tempo (Prescott & Buchanan-Smith, 2007).

Por outro lado com o aumento do interesse no bem-estar psicológico de primatas não humanos, muitos centros de pesquisa estão usando técnicas de condicionamento, treinando os animais a participarem voluntariamente nos procedimentos com fins científicos, como a coleta de sangue e administração de injeções. O condicionamento está se tornando um componente importante nos programas de manejo de primatas não humanos mantidos em laboratório (Prescott & Buchanan-Smith, 2007).

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi proceder os condicionamentos instrumental e clássico com reforço positivo para 24 primatas da espécie *Callithrix jacchus*, com a finalidade de coleta de saliva e pesagem para fins científicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, campus de Botucatu – SP – Brasil 22°53`09” latitude sul e 48°26`42” longitude oeste com temperatura media anual de 22°C.

Foram utilizados 24 animais adultos da espécie *Callithrix jacchus*, sendo 12 machos e 12 fêmeas. Os animais foram alojados em gaiolas medindo 60cm de altura x

120 cm de largura x 60cm de profundidade sob condições naturais de clima e ciclo claro-escuro. Foram oferecidas aos animais refeições diárias composta de frutas e ovos pela manhã e uma papa protéica à tarde, oferecendo-se como complemento, larvas de tenébríos (*Tenebrio molitor*), uma vez por semana.

O grupo de animais utilizados nesse estudo era heterogêneo, oriundos de lugares diferentes, sendo assim em uma primeira fase experimental, com duração de dois meses, foram oferecidos diversos tipos de alimentos a fim de que fosse escolhido um preferido por todos os animais, como por exemplo: papinhas industrializadas para bebê de vários sabores, queijo petit suisse (danoninho[®]) e papinhas artesanais feitas com diversas frutas amassadas acrescidas de mel. O único alimento que teve a preferência de todos do grupo foi o queijo petit suisse (danoninho[®]) sendo este posteriormente oferecido como recompensa.

Na segunda fase experimental os animais foram condicionados duas vezes por semana durante quatro meses. Para o condicionamento instrumental para a coleta de saliva utilizamos “swabs” que foram mergulhados no queijo petit suisse para facilitar a aprendizagem. No momento em que os animais sorviam o “swab” utilizávamos o “clicker” (Figura 1) como reforço instrumental e em seguida oferecíamos a recompensa.

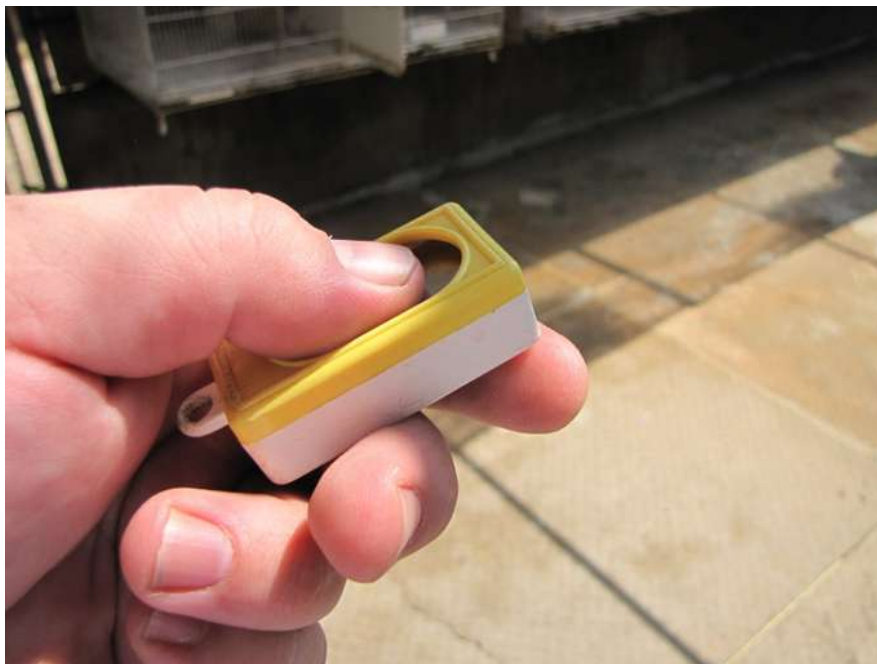


Figura 1: “Clicker” utilizado para o condicionamento instrumental para coleta de saliva em *Callithrix jacchus*.

O condicionamento clássico para a pesagem foi realizado com o auxílio de uma gaiola experimental menor que era acoplada na gaiola onde os animais estavam alojados (Figura 2). No início do condicionamento, os indivíduos foram atraídos para a gaiola experimental com o auxílio de uma colher contendo a recompensa (Danoninho[®]) colocada na parte interna da gaiola experimental. Quando os animais desenvolviam o comportamento desejado (Figura 2) a colher era retirada do interior da gaiola e os animais conduzidos até a balança onde foram realizadas as pesagens (Figura 3). Após as pesagens os indivíduos eram conduzidos de volta a sua gaiola de origem e recebiam a recompensa (Figuras 4 e 5). Nas situações em que um animal se recusava a executar as manobras, o tempo máximo que permanecíamos persistindo não ultrapassou dez minutos pois caso fosse prolongado, poderia causar estresse ao indivíduo, o levando a associar a presença dos pesquisadores a uma situação negativa.



Figura 2: Sagui comum (*Callithrix jacchus*) entrando na gaiola experimental após condicionamento.



Figura 3: Mensuração do peso de *Callithrix jacchus* após condicionamento



Figura 4: Sagui comum retornando à gaiola de origem.



Figura 5: *Callithrix jacchus* recebendo recompensa (Danoninho[®])

NOTA ÉTICA

O experimento realizado teve a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho-Botucatu-SP-Brasil, autorização número 126/2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo as condições desse experimento após quatro meses todos os animais foram condicionados de forma satisfatória, sorvendo o “swab” sem a necessidade de mergulhá-lo anteriormente no queijo petit suisse (danoninho[®]), depositando a saliva naturalmente no “swab” sem a necessidade de contenção física ou química para tal procedimento (Figura 6). Antes do treinamento o tempo gasto para a coleta da saliva dos 24 animais era de aproximadamente 5 horas, após o treinamento o tempo gasto foi de 1 hora e trinta minutos.

Em relação ao condicionamento para a pesagem no início do treinamento o tempo utilizado para pesar os 24 saguis era longo, cerca de 8 horas. Após o condicionamento as pesagens foram realizadas em apenas duas horas, facilitando dessa maneira o trabalho da equipe de pesquisa além de ter contribuído para a melhora do bem estar dos animais, já que não houve a necessidade de conter os indivíduos.



Figura 6: Coleta de saliva em *Callithrix jacchus* realizada através de condicionamento instrumental.

Segundo McKinley e colaboradores em 2003 no condicionamento de 12 saguis comuns (*Callithrix jacchus*) mantidos em laboratório realizado para pesagem e obtenção de amostras de urina, os resultados sugeriram que os animais condicionados adquiriram confiança nos pesquisadores e que a coleta de dados utilizando animais treinados foi consideravelmente mais rápida que a coleta utilizando técnicas de manejo invasivas. As sessões de treinamento tiveram a duração de dez minutos com a finalidade do estabelecimento do comportamento desejado. Sendo assim o treinamento com reforço positivo foi uma opção prática para a manipulação de saguis comuns (*Callithrix jacchus*) utilizados para fins científicos.

Os resultados de McKinley et. al., 2003 corroboram com os obtidos neste estudo onde os animais também adquiriram confiança nos pesquisadores e o tempo gasto para os procedimentos após os condicionamentos foi mais curto.

Após o condicionamento operante de 17 espécies de primatas do Novo Mundo realizado no Jardim Zoológico do Bronx, na cidade de Nova Iorque (EUA), ocorreram mudanças marcantes no comportamento dos indivíduos como o desaparecimento de ameaças agressiva direcionadas à equipe do zoológico, indicando uma redução de estresse e consequentemente melhora do bem-estar dos animais. Neste estudo foram utilizados 86 espécies entre calitriquídeos e cebídeos alojados em 26 grupos sociais a fim de que fossem aplicadas técnicas menos invasivas aos protocolos de manejo. Segundo estes autores as respostas individuais ao treinamento variaram muito, no entanto os saguis, em comparação a maioria dos micos, tiveram uma maior atenção ao treinamento (Savastano et al. 2003).

Em relação ao observado no presente estudo a atenção dos indivíduos também foi variável. Monteiro et al., (2011) em seu estudo sobre a atividade reprodutiva de primatas da espécie *Aotus azarai infulatus* (macaco da noite) condicionaram os animais oferecendo frutas após a realização dos exames ultrassonográficos, segundo os autores a cooperação dos animais durante a manipulação foi obtida de maneira simples, facilitando a contenção dos animais. Os resultados do estudo sugeriram que o condicionamento foi uma ferramenta importante na viabilização dos exames ginecológicos e obstétricos.

CONCLUSÕES

Os condicionamentos clássico e instrumental com a utilização de reforço positivo, aplicados aos animais da espécie *Callithrix jacchus*, foi efetuado com praticidade e sucesso. Sendo de grande importância na execução do trabalho científico realizado após o treinamento por facilitar o manejo, aumentar a confiabilidade dos animais em relação ao grupo de pesquisa e principalmente por melhorar o bem estar dos saguis utilizados neste estudo como modelos biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cipreste CF, Costa, MELT. (2002). Treinamento do Gorila (*gorilla gorilla*) Através de Técnicas de Condicionamento Operante no Jardim Zoológico da Fundação Zoológica de Belo Horizonte. In: Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte-MG. Apostila de treinamento, Belo Horizonte, 1-22.

Coe JC. (2003). Steering the ark toward Eden: design for animal well-being. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223: 977-980.

Costa MJRP, Pinto AA. (2003). Princípios de etologia aplicada ao bem-estar animal. In: K. Del-Claro & F. Prezoto (Eds.), *As distintas faces do comportamento animal* (pp. 211-223), Jundiaí, SP: SBET.

Cross N, Rogers LJ. (2004). Diurnal Cycle in salivary cortisol levels in common marmosets. *Developmental Psychobiology* 45: 134-139.

Dawes C. (1993). Considerations in the development of diagnostic tests on saliva. *Annals New York Academic Sciese* (pp. 265-269). New York: New York Academic Sciese.

Laule GE. (2003). Positive reinforcement training and environmental enrichment: enhancing animal wellbeing. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223: 969-972.

Mckinley J, Buchanan SHM, Basset L, Morris K. (2003). Training Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) to Cooperate During Routine Laboratory Procedures: Ease of Training and Time Investment. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6: 209–220.

Monteiro FOB, Coutinho LN, Cicalise RST. et al. (2011). A protocol for gynecological and obstetric examination of owl monkeys using ultrasound. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 54: 5-11.

Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Filho SAO. (2007). Valor do Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e clinica Integrada* 7: 187-194.

Pachaly JR, Werner PR, Schimanski JC, Ciffoni EMG. (1993). Estresse por captura e contenção em animais selvagens. *A Hora Veterinária* 13: 47-52.

Prescott MJ, Buchanan S. (2007). Training laboratory-housed non-human primates, part 1: a UK survey. *Animal Welfare* 16: 21-36.

Reinhardt V. (1997). Training nonhuman primates to cooperate during blood collection. *Lababoratory Primates* 36: 1-5.

Russel WMS, Burch RL. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London: METHUEN.

Savastano G, Hanso A, Mccann C. (2003). The Development of an Operant Conditioning Training Program for New World Primates at the Bronx Zoo. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6: 247–261.

CAPÍTULO 3

**MENSURAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A SALIVAR EM PRIMATAS DA
ESPÉCIE *Callithrix jacchus* MANTIDOS EM CATIVEIRO**

**MEASUREMENT OF IMMUNOGLOBULIN A SALIVARY IN PRIMATES
Callithrix jacchus IN CAPTIVITY**

Running head: IMMUNOGLOBULIN SALIVARY IN MARMOSET

Myrna Campos Ferraz¹, André Vicente Ruiz de Matos², João Carlos Pinheiro
Ferreira³; Eunice Oba⁴

1)-Myrna Campos Ferraz-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP –
Brasil. E-mail: [dra_myrnacampos@yahoo.com.br/](mailto:dra_myrnacampos@yahoo.com.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119;
2)-André Vicente Ruiz de Matos-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -
FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu -
SP – Brasil. E-mail: [parmeso_xl@yahoo.com.br/](mailto:parmeso_xl@yahoo.com.br) Fone: (5514) 3880-2110 /Fax: (5514)
3880-2042; 3)- João Carlos Pinheiro Ferreira- Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP
- Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [jcferreira@fmvz.unesp.br/](mailto:jcferreira@fmvz.unesp.br) Fone/Fax: (5514) (14)
3880-2119; 4)- Eunice Oba- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [euniceoba@fmvz.unesp.br/](mailto:euniceoba@fmvz.unesp.br) Fone/Fax: (5514)
(14) 3880-2119.

*** Trabalho a ser enviado para a Revista Animal Science Journal.**

RESUMO: O principal anticorpo presente nas mucosas e glândulas exócrinas é uma IgA polimétrica denominada sIgA. Esta imunoglobulina vem sendo utilizada como indicadora de estresse em diversos animais incluindo primatas não humanos, podendo também ser utilizada para o monitoramento da atividade imunológica. O objetivo do presente estudo foi proceder a mensuração dos níveis de IgA salivar em primatas *Callithrix jacchus* (sagui de tufo branco) pela técnica de ELISA. Foram utilizados 12 casais de animais, condicionados previamente por técnica de condicionamento operante com reforço positivo à coleta de saliva. As coletas foram realizadas uma vez por semana durante seis meses. Nas condições deste experimento as concentrações da IgA salivar na espécie de primatas *Callithrix jacchus* foram muito baixas. Sugerimos novos estudos utilizando outras técnicas para a quantificação da IgA presente na saliva desses animais.

Palavras-Chaves: Imunoglobulina A; *Callithrix jacchus*; mensuração

ABSTRACT: The primary antibody present in the mucous membranes and exocrine glands is called IgA polymetric sIgA. This immunoglobulin has been used as an indicator of stress in various animals including nonhuman primates, can also be used for monitoring of immune activity. The aim of this study was to carry out the measurement of salivary IgA levels in primates *Callithrix jacchus* (marmoset white - tuff) by ELISA. We used 12 pairs of animals, previously conditioned by technique of operant conditioning with positive reinforcement to saliva collection. Samples were collected once a week for six months. In this experiment the concentrations of salivary IgA in primate species *Callithrix jacchus* were very low. We suggest new studies using other techniques for quantifying the present IgA in saliva of these animals.

Key-Words: Imunoglobulin A, *Callithrix jacchus*, measurement.

1.0 – INTRODUÇÃO

Os Calitriquídeos são utilizados em pesquisas que avaliam aspectos relacionados ao desenvolvimento de doenças e aos parâmetros fisiológicos (Clarke, 1994) além de serem modelos experimentais também nas áreas de nutrição, farmacologia, toxicologia e na área de estresse (Abbot et al., 2003). Jhonson et al. (1996), utilizando saguis de tufo branco (*Callithrix jacchus*) em seu estudo, demonstraram que essa espécie apresenta diversas características que a tornaram um modelo para estudo de estresse social, dentre elas, a proximidade filogenética aos seres humanos e ao fato desta espécie exibir resposta fisiológica e comportamental semelhante aos humanos, em situações que induzem ansiedade (Barros & Tomaz, 2002).

A imunoglobulina A (IgA) foi identificada pela primeira vez em 1959 por Heremans, e está presente no soro e líquidos orgânicos de todos os mamíferos (Heremans et al., 1959). Representa 15 a 20% das imunoglobulinas e é dividida em subclasses, IgA 1 (90%) e IgA 2 (10%).

A Imunoglobulina A desempenha papel importante na neutralização e eliminação de antígenos locais (Stokes, et al., 1975) e na modulação de fatores imunológicos, além de ser estudada como indicadora de estresse em vários animais, incluindo frangos e primatas(Person,1998; Florence et al.,1999; Carver & Hau,2000). A principal função biológica da IgA é a proteção contra microrganismos invasores como vírus e bactérias nas superfícies das mucosas, inibindo o mecanismo de aderência desses às células epiteliais (Turner, 1991).

A IgA não fixa complemento, por isso pode atuar contra microrganismos sem desencadear a cascata do processo inflamatório que danifica as superfícies epiteliais. Além disso, promove diminuição da absorção de uma variedade de antígenos ou agentes

alergênicos, inalados ou ingeridos, que podem desencadear respostas imunes (Schafer et al., 1996).

A imunoglobulina A secretora (SIgA) é a IgA na forma dimérica, ligada a outra proteína denominada peça secretora, que é produzida por células epiteliais. Este componente facilita o transporte e impede a ação proteolítica sobre a IgA, tornando-a um importante mecanismo de defesa em mucosas. A SIgA é encontrada predominantemente em secreções seromucosas como saliva, lágrima, colostro, leite, liquor, além de secreções traqueobrônquicas, intestinais e genitourinárias (Turner, 1991; Schafer et al., 1996).

2.0 - OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi proceder a mensuração dos níveis de IgA salivar em primatas *Callithrix jacchus* através da técnica de ELISA.

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo foi conduzido no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, campus de Botucatu – SP - Brasil, 22°53'09" latitude sul e 48°26'42" longitude oeste com temperatura média anual de 22°C.

3.2 - ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 12 casais adultos da espécie *Callithrix jacchus*. Os animais foram alojados em gaiolas medindo 60 cm de altura x 120 cm de largura x 60 cm de profundidade, mantidos em condições naturais de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro. Foram oferecidas aos saguis duas refeições diárias composta de frutas, legumes e ovos pela manhã e uma papa protéica à tarde (ração triturada da marca Alcon[®] acrescida de banana, mel e sustagem[®]). Como complemento foram oferecidas larvas de tenébrios (*Tenebrio molitor*) uma vez por semana.

3.3 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram condicionados com a utilização do condicionamento instrumental com reforço positivo à colheita de saliva antes do início do experimento (Figura 1).



Figura 1: Colheita de saliva em *Callithrix jacchus* após condicionamento.

As colheitas de saliva foram realizadas uma vez por semana sempre no período da tarde durante seis meses. Após as colheitas o "swab" utilizado para colher a saliva foi acondicionado em tubos eppendorf[®] e mantidos em freezer a -20°C até o momento das dosagens.

3.4 - DOSAGEM DA IgA SALIVAR

As mensurações da Imunoglobulina A salivar foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Proteínas de Fase Aguda e Monitoramento Não Invasivo da Reprodução e do Bem-Estar Animal.

Antes de serem dosadas, as 350 amostras foram centrifugadas a 2.500 G durante 10 minutos para que a saliva se concentrasse no fundo do eppendorff[®].

As amostras foram mensuradas em duplicata. A mensuração da imunoglobulina A foi realizada por técnica imunoenzimática (ELISA) da Alpha Diagnostic International, Texas, USA, para a detecção da Imunoglobulina A de primatas não humanos. Este kit baseia-se na ligação dos anticorpos de IgA com duas amostras, uma imobilizada na microtitulação, e os conjugados horseradish peroxidase (HRP). Após uma etapa de lavagem foi adicionado o substrato cromogênico e a cor foi evidenciada pela reação enzimática HRP sobre o substrato, que é diretamente proporcional à quantidade de IgA presente nas amostras. A reação de absorvância foi medida utilizando-se o leitor de microtitulação ELISA com filtro de 450nm. A concentração de IgA nas amostras e nos controles foi calculada a partir de uma curva padrão contendo concentrações conhecidas da imunoglobulina.

As primeiras dosagens revelaram valores muito baixos, sendo necessária portanto a adequação da curva (diluição dos padrões 50 x). Os valores originais e ajustados estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Concentrações dos padrões das curvas (originais e ajustados) dadas em ng/mL

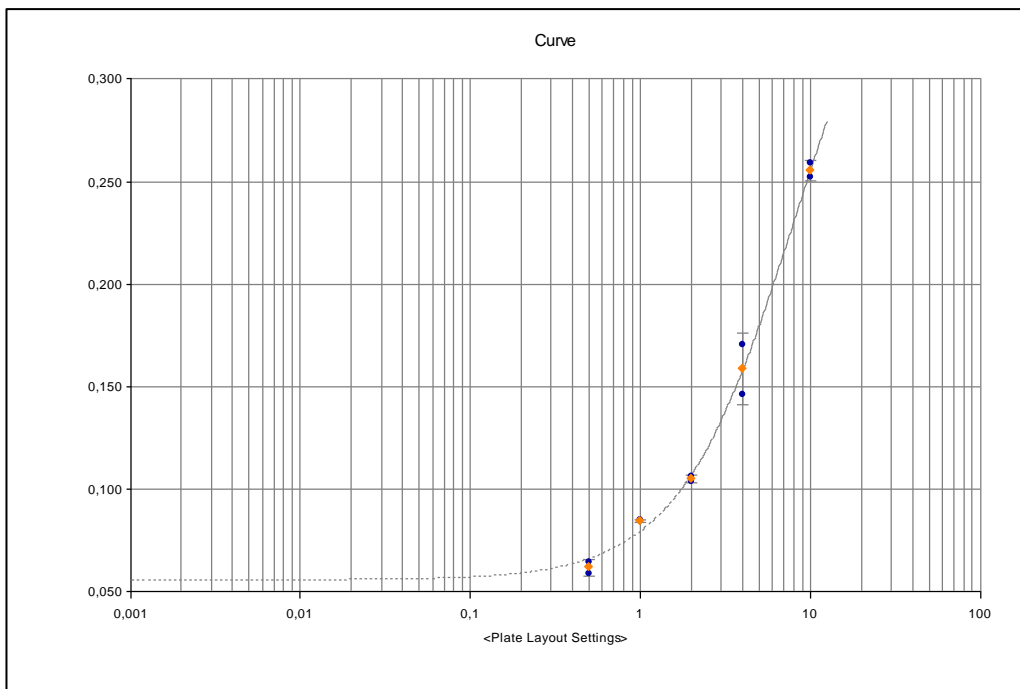
Concentrações Originais		25	50	100	200	500
Concentrações Ajustadas	0	0.5	1	2	4	10

Foram utilizados 10µl de cada amostra e a diluição utilizada foi a de 1:10. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Alpha Diagnostic International, Texas, USA).

4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Kit comercial utilizado, nas condições desse estudo, não se mostrou eficaz para a mensuração da IgA presente na saliva de primatas não humanos da espécie *Callithrix jacchus*.

As concentrações mensuradas nas amostras foram baixas, ficando em sua maior parte fora da curva (Figura 2). Mesmo após o ajuste realizado, das 350 amostras dosadas somente 52 estavam dentro da curva (Gráfico 1).



Curve Name	Curve Formula	A	B	C	D	R2
Curve	$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$	0.0561	1.25	8.32	0.414	0.998

Figura 2: Curva ajustada obtida no ensaio para a mensuração da IgA salivar de *Callithrix jacchus*.

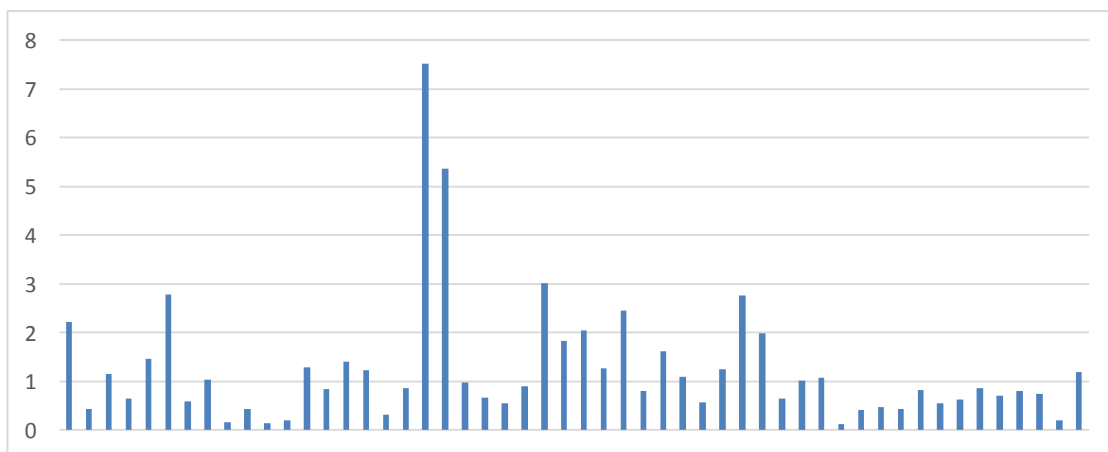


Gráfico 1: Concentrações da IgA salivar (em ng/mL) de saguis comuns das 52 amostras que permaneceram dentro da curva.

As concentrações dadas pelo conjunto comercial em espécies de primatas não humanos do Velho mundo em diluições diferentes (1:60K e 1:240K) variaram de 432ng/mL a 50ng/mL (Tabela 3). Neste estudo as concentrações da IgA variaram de 0,13 a 7,52 ng/mL; ou seja muito mais baixas do que as reportadas em outras espécies. Esse fato pode estar ligado ao baixo volume salivar obtido nas amostras, esse baixo volume salivar pode estar relacionado ao tamanho reduzido dos indivíduos da espécie ou ao fato da estrutura da proteína ser diferente entre as espécies.

Em ensaios clínicos e ou laboratoriais, a quantificação da sIgA secretada na saliva pode ser determinada através da concentração ou da taxa de secreção desta imunoglobulina. Porém a concentração é relativa ao solvente e a quantidade de saliva produzida, ou fluxo salivar, influenciando diretamente na concentração de sIgA, podendo haver até mesmo uma correlação negativa entre esses valores (Ganhao et al., 1984), o que cria dúvidas sobre a interpretação de resultados que utilizam a concentração como parâmetro (Herbert & Cohen, 1993). Segundo Krzysztof et al., (2010) a estrutura de proteínas como a haptoglobulina varia entre as espécies mesmo entre espécies próximas provavelmente devido a evolução. Essa diferença estrutural entre as moléculas poderia explicar a baixa afinidade da IgA salivar destes primatas com os anticorpos presentes no Kit utilizado.

Outro fator que poderia ser responsável pelas baixas leituras no ensaio utilizado seria o fato das concentrações da Imunoglobulina A presente na saliva da espécie em estudo serem de fato mais baixas do que as encontradas em primatas do velho mundo. Diniz e Costa (1995), em seu estudo utilizando dados clínicos e laboratoriais em 265 *Callithrix jacchus* de cativeiro, sugeriram que um dos maiores problemas encontrados nestes animais são as pneumonias. Existe uma relação entre o estresse e infecções do trato respiratório (Cohen et al.,1993). Mais de 95% das infecções tem início na

superfície mucosa (Bosch et al., 2002). Estas superfícies são protegidas pelas imunoglobulinas, principalmente a IgA (Garret& Kidd, 1976). Sendo assim a baixa concentração da imunoglobulina A na saliva poderia justificar o alto índice de pneumonias em colônias de *Callithrix jacchus* mantidos em cativeiro; além disso, animais mantidos em zoológicos e centros de conservação e pesquisa são frequentemente submetidos a situações de desafios o que também poderia justificar os baixos níveis encontrados nesse estudo. Segundo Garret e Kidd (1976) o estresse psicológico poderia ocasionar a redução das concentrações da IgA presentes na saliva, aumentando a suscetibilidade à infecções.

5.0 - CONCLUSÕES

Neste estudo as concentrações da IgA salivar na espécie de primatas *Callithrix jacchus* foram muito baixas. Sendo essa espécie utilizada como modelo biológico em diversos estudos e sendo a imunoglobulina IgA importante na verificação do status imunológico e como indicadora para medir o estresse em vários animais incluindo primatas não humanos, sugerimos novos estudos utilizando outras técnicas para a quantificação da IgA presente na saliva desses animais.

6.0 - AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro dado a este trabalho (2009/52654-9; 2010/51926-2).

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbot DH, Barnett DK, Colman, R J, Yamamoto M E, Schultz – Darken NJ. 2003. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comparative Medicine* **53**, 339-350.

Barros M, Tomaz C. 2002. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neuroscience, Biobehavior Review* **26**,187-201.

Bosch JA, Ring C, Geus EJ, Veerman EC, Amerogen AV. 2002. Stress and secretory immunity. *International Review of Neurobiology* **52**, 213-253.

Carver JFA, Hau J. 2000. Development of a saliva sampling method and a rocket immunoelectrophoretic assay for quantification of salivary IgA in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *In vivo* **14**, 735-739.

Clarke JM.1994. The common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Anzccart News* **7**,1-8.

Cohen S, Tyrell DAJ, Smith AP. 1993. Negative life events, perceived stress, negative affect, and susceptibility to the common cold. *Journal of Personality and Social Psychology* **64**, 131-140.

Diniz LSM, Costa EO. 1995. Health problems of *Callithrix jacchus* in captivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **28**, 61-64.

Florence BD, Svendsen L, Stodulski G, Crowley A, Hau J. 1999. Assessment of lacrimal IgA Potential parameter for measurement of long term stress in poultry. *In Vivo* **9**, 19-26.

Ganhao MF, Hattingh J, Preston CB. 1984. Effects of orthodontic treatment on plasma and salivary immunoglobulin concentration. *The Journal of the Dental Association of South Africa* **11**,751-754.

Garret JR, Kidd A. 1976. Effects of autonomic nerve stimulation on submandibular acini and saliva in cats (proceedings). *Journal of Physiology and Pharmacology* **263**, 198-199.

Herbert TB, Cohen S. 1993. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosomatic Medicine* **55**, 364-79.

Heremans JF, Heremans MT, Schultze HE. 1959. Isolation and description of a few properties of the A Globulin of human serum. *Clinica Chimica Acta* **4**, 96.

Johnson EO, Kamilaris TC, Carter CS, Calogero AE, Gold PW, Chrousos GP. 1996. The biobehavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). *Society of biological Pshychosomatic* **40**, 317-337.

Krzystof BW, Fries E. 2010. Evolutionary aspects of hemoglobin scavengers. *Antioxidants & Redox signaling* **12**, 249-259.

Pearson E. 1998. Influence of stress on secretory IgA: is it a possible stress marker in animals? *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* **25**, 19-24.

Schaffer FM, Monteiro RC, Volanicis JE, Cooper MD. 1996. *IgA deficiency*. 1nd edn. Harwood Academic Publishers, New York-USA.

Stokes CR, Soothill JF, Turner MW.1975. Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* **6**, 255-745.

Turner M. 1991. Moléculas que reconhecem antígenos. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds), *Imunologia* Vol. 5, pp. 5-12. Ed.Manoele, Rio de Janeiro.

CAPÍTULO 4

**VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA DE METABÓLITOS DE GLICOCORTICÓIDES
FECAIS PARA PRIMATAS DA ESPÉCIE *Callithrix jacchus***

**PHYSIOLOGICAL VALIDATION OF FECAL GLUCOCORTICOID FOR
PRIMATE SPECIES *Callithrix jacchus***

Running head: VALIDATION OF GLUCOCORTICOID FOR MARMOSET

Myrna Campos Ferraz¹, Rupert Palme²; Carla Martins de Queiroz³ André Vicente Ruiz de Matos⁴, João Carlos Pinheiro Ferreira⁵; Lygia Carla Francelino⁶; Eunice Oba⁷

- 1)-Myrna Campos Ferraz-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [dra_myrnacampos@yahoo.com.br/](mailto:dra_myrnacampos@yahoo.com.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119;
- 2)- Rupert Palme- Institute of Medical Biochemistry Department of Biomedical Sciences University of Veterinary Medicine Veterinärplatz 1210 Vienna, Austria. Fone/Fax:+43-1-25077-4103/43-1-25077-4190; Rupert.Palme@vetmeduni.ac.at; 3)- Carla Martins de Queiroz- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: mvcarlaqueiroz@gmail.com/ Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 4) André Vicente Ruiz de Matos-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: parmeso_xl@yahoo.com.br/ Fone: (5514) 3880-2110 /Fax: (5514) 3880-2042; 5)- João Carlos Pinheiro Ferreira-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: jcferreira@fmvz.unesp.br/ Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 6)-Lygia Carla Francelino- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: lygia.francelino@hotmail.com/ Fone/Fax (5514) (14) 3880-2119; 7)-Eunice Oba- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: euniceoba@fmvz.unesp.br/ Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119.

*** Trabalho a ser enviado para a Revista Animal Science Journal.**

RESUMO: As técnicas de monitoramento da atividade adrenal realizadas através métodos não invasivo estão cada vez mais sendo utilizadas. No entanto para que haja confiabilidade nos dados obtidos é necessário proceder a validação dessas técnicas. Animais selvagens mantidos em cativeiro são constantemente submetidos à situações de estresse. O estresse crônico pode interferir negativamente nas respostas fisiológicas dos indivíduos. O objetivo do presente estudo foi proceder à validação fisiológica para metabólitos de glicocorticóides fecais para a espécie de primatas não humanos (*Callithrix jacchus*). Foram utilizados 12 animais adultos (sete machos e cinco fêmeas). Durante o período experimental os indivíduos foram mantidos em uma sala fechada sob condições artificiais de luz e temperatura. Para a validação fisiológica foi utilizado o desafio de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) sintético. Possivelmente devido ao alto grau de estresse imposto aos animais e à variação individual não foi possível validar a técnica.

Palavras chaves: estresse, validação fisiológica, cortisol fecal

ABSTRACT: Techniques for monitoring adrenal activity conducted through non-invasive methods are increasingly being used. However there is reliability for the data obtained it is necessary to validate these techniques. Wild animals kept in captivity are constantly subjected to stressful situations. Chronic stress can adversely affect the physiological responses of individuals. The aim of this study was to carry out physiological validation for fecal glucocorticoid metabolites for the kind of non-human primates (*Callithrix jacchus*). We used 12 adult animals (seven males and five females). During the experimental period, the subjects were kept in a closed room under artificial light and temperature. For validation we used the physiological challenge of ACTH (adrenocorticotrophic hormone) synthetic. Possibly due to the high degree of stress on the animals and the individual variation was not possible to validate the technique.

Key Words: stress; physiological validation; cortisol fecal.

1.0 - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos avanços foram obtidos no aperfeiçoamento de métodos de quantificação de metabólicos urinários e fecais de esteróides, a ponto dos mesmos serem correntemente empregados na investigação das relações endócrino-comportamentais em inúmeras espécies domésticas e selvagens (Wasser et al., 2000; Palme et al., 2005).

Embora não haja definição precisa do termo estresse, esta geralmente se refere a uma variedade de respostas aos estímulos estressores, que podem ser de origem interna ou externa e que podem alterar a homeostase do organismo. Estes estímulos podem ser físicos, comportamentais ou psicológicos (Dantzenzer & Mormede, 1983; Stratakin & Chrousos, 1995). A duração do estímulo e a sua intensidade é o que diferencia seu impacto no organismo. Se o estímulo for prolongado geralmente é considerado negativo (estresse crônico); quando a duração for breve pode ser considerado positivo (estresse agudo) (Moodie & Chamove, 1990; Wingfield & Ramenofsky, 1999).

Uma vez que ocorre uma reação a um estressor, ocorre um aumento acentuado na liberação de glicocorticóides a partir do córtex supra-renal e então os níveis de glicocorticóides também são aumentados no plasma e na urina (Smith & French, 1997; Johnson, 1996; Brown et al, 1995; Morton et al, 1995; Crockett et al., 1993).

Nos últimos anos, as técnicas alternativas para mensuração de metabólitos de glicocorticóides fecais, vêm sendo cada vez mais utilizadas principalmente por serem adequadas para monitorar a atividade da supra-renal em um grande número de vertebrados incluindo primatas (Touma & Palme, 2005; Weingrill et al, 2004 Lynch et al, 2002; Möstl e Palme, 2002; Whitten et al., 1998).

A utilização dos ensaios para monitorar a função endócrina adrenal através da mensuração de metabólitos de glicocorticóides fecais pode não ser fidedigna, por isso é necessário proceder a validação fisiológica e laboratorial destas técnicas (Palme et al., 2005; Touma & Palme, 2005; Heistermann et al., 2004).

2.0 – OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi realizar a validação fisiológica da técnica de Enzimoimunoensaio direto (EIA) para mensurar metabólitos de cortisol fecal em sagui comum (*Callithrix jacchus*) por meio da administração de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH).

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Campus de Botucatu – SP - Brasil, 22°53'09” latitude sul e 48°26'42” longitude oeste com temperatura média anual de 22°C.

3.2 - ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 12 animais adultos da espécie *Callithrix jacchus* (sete machos e cinco fêmeas). Antes do início do experimento os animais foram alojados em gaiolas medindo 60 cm de altura x 120 cm de largura x 60 cm de profundidade e mantidos no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS) da Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu sob condições naturais de temperatura e de ciclo claro-escuro. Antes do período experimental a estrutura oferecida aos animais era precária. Permitindo que os saguis tivessem contato visual e olfativo com diversos animais, incluindo predadores alojados no recinto ao lado. Os saguis também ficaram expostos a sons diversos assim como a visitas de pessoas estranhas.

Durante o período experimental os saguis foram mantidos em uma sala fechada sob condições artificiais de luz e temperatura. Os animais foram alojados neste recinto dois meses antes do experimento para adaptação ao local. Somente pessoas habituadas ao manejo com os animais foram autorizadas a entrarem no local, essa precaução foi tomada para que não houvesse interferências externas, que poderiam alterar os resultados desse estudo.

3.3 - ALIMENTAÇÃO OFERECIDA

Foram oferecidas duas refeições diárias composta de frutas, legumes e ovos pela manhã e uma papa protéica à tarde, (ração triturada ALCON[®] acrescida de banana, mel e sustagem[®]); oferecendo-se como complemento larvas de tenébrios (*Tenebrio molitor*) uma vez por semana.

3.4 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais sendo o primeiro Grupo controle GC (Sem aplicação de ACTH) e o segundo o grupo tratamento GT (injeção de ACTH).

Para a validação fisiológica foi administrada 0,33mL da solução de Synacthen Depot[®]/kg/animal por via intramuscular aos animais do Grupo Tratamento 33mL (Heistermann, 2006). As injeções foram aplicadas entre 6:00 e 6:30 da manhã.

O Synacthen Depot[®] (tetracosactrin) (Figura 1) hormônio adrenocorticotrófico sintético (ACTH) é a primeira preparação de corticotrofina a ser produzida inteiramente por síntese, e exibe todas as propriedades farmacológicas do ACTH endógeno sendo adquirido da empresa Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.



Figura 1: Embalagem Synacthen Depot[®]

As fezes foram colhidas em tubos eppendorf[®] com auxílio de uma espátula, homogeneizadas e armazenadas em freezer à -20°C até o momento da extração. Foram colhidas todas as fezes produzidas, de hora em hora, entre 6:00 e 18:00 horas durante

três dias antes da aplicação do ACTH, durante o dia da aplicação e três dias após a injeção para que não houvesse a possibilidade de perder o pico do cortisol. Após cada colheita o forro de papel colocado na bandeja era trocado para evitar possíveis contaminações das amostras seguintes.

Foi realizado rodízio entre os grupos, ou seja, os animais que participaram do grupo controle após 30 dias participaram do grupo tratamento e vice versa de modo que todos os animais passaram pelos dois grupos.

3.5 - EXTRAÇÃO

A extração hormonal das amostras fecais foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Proteínas de Fase Aguda e Monitoramento Não Invasivo da Reprodução e do Bem-Estar Animal localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu – SP - Brasil.

A metodologia utilizada foi descrita em Palme (2005). Foram pesadas e homogeneizadas uma alíquota de 0,25g de fezes úmidas em tubos de poliestileno com tampa. Após a pesagem, as fezes foram diluídas em 2,5mL de metanol à 80% e levadas ao agitador vórtex por 30 minutos. A seguir o extrato foi centrifugado à 500 G por 20 minutos. Após essa etapa foi retirado 500µL do sobrenadante, que foi transferido para tubos eppendorf® previamente identificados. Os tubos eppendorf® foram levados à estufa por uma noite para secagem.

3.6 - ENZIMOIMUNOENSAIO (EIA)

O extrato seco foi levado em tubos eppendorf[®] armazenados em caixa apropriadas para a Universidade de Medicina Veterinária de Viena (Áustria). As amostras foram então ressuspensas. As dosagens de metabólitos fecais de cortisol foram realizadas sob a supervisão do Prof. Dr. Rupert Palme, segundo o protocolo desenvolvido por Palme e Möstl (1977).

3.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o teste T de Student para a comparação de dois grupos.

3.8 - NOTA ÉTICA

O experimento realizado teve a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho – Botucatu – SP - Brasil, autorização número 126/2010.

4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento sugerem que alguns animais que receberam a injeção de ACTH não refletiram a resposta fisiológica esperada nas fezes,

ou seja, não ocorreram aumentos significativos nas concentrações de metabólitos fecais de cortisol após a aplicação do ACTH.

Possivelmente devido ao alto grau de estresse imposto aos animais durante o tempo em que foram mantidos no CEMPAS incluindo frio intenso, presença de predadores no recinto ao lado, presença de sons e pessoas estranhas, os animais passaram a desenvolver quadros de diarreia intermitente sugerindo uma possível degradação dos metabólitos durante o processo de excreção, provavelmente ocasionada pela modificação da microbiota intestinal (Tabela 1).

Tabela 1: Médias das concentrações de metabólitos fecais de cortisol (ng/g) dois dias antes da aplicação do ACTH, no dia da aplicação e dois dias depois

	dia -2	dia -1	dia 0	dia +1	dia +2
média c	80 ± 177 A	230 ± 634 B	81 ± 177 C	40 ± 41 D	33 ± 21 E
média t	47 ± 114 A	41 ± 80 B	216 ± 376 C	41 ± 63 D	81 ± 133 E

(Letras Maiúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença estatística).

O cortisol e a corticosterona são catabolizadas pelo fígado e sofrem ação das bactérias intestinais antes de serem excretados nas fezes, resultando em um elevado número de metabólitos com poucos hormônios em estado nativo presentes (Palme et al, 2005; Möstl et al., 2002; Bahr et al, 2000; Wasser et al., 2000). Segundo Vylivová et al., (1998) as diferenças de metabólitos fecais devem-se às particularidades da microbiota intestinal.

A maior parte dos metabólitos fecais é eliminada sob a forma não-conjugada, também chamada de forma livre. Isto se dá devido à ação enzimática nas fezes e de

bactérias fecais sobre os metabólitos que foram conjugados no fígado e eliminados no duodeno através da bile (Heisterman,1993).

Segundo Mathai (2002) um desequilíbrio na microbiota intestinal que produz efeitos prejudiciais é chamado de disbiose, que interfere na integridade do intestino.

Agentes tóxicos são bioativados por sistemas de enzimas das bactérias intestinais, sendo este processo promovido numa velocidade maior no sistema intestinal com populações de microrganismos desequilibradas. O estresse é um dos fatores que possivelmente pode ser atribuído às causas da alteração da microbiota intestinal (Silva, 2001).

Além disso, existem muitas doenças e síndromes que causam perdas significativas de *Callithrix. jacchus* em colônias de criação. Dentre estas, a Síndrome do Emagrecimento Progressivo (SEP) ocupa lugar de destaque. Segundo Ialeggio e Baker (1995) entre as características predominantemente observadas como sendo indicativas da SEP estão as colites e os episódios frequentes de diarréias. A SEP é considerada uma síndrome de causas multifatoriais e pode estar associada ao estresse.

No período de chegada dos animais ao CEMPAS nenhum dos saguis apresentava quadros de diarréia. Os quadros tiveram início após quatro meses da permanência dos animais. Na época não havia possibilidade de mudança de recinto ou de melhorar a estrutura do local para diminuir o estresse. Sendo assim durante a permanência dos animais no local, dois saguis vieram a óbito com suspeita de SEP e apesar das ações preventivas realizadas para a validação, como a mudança de ambiente e vermifugações, a diarréia persistiu mesmo que de forma menos severa.

Foram observadas também diversas variações individuais nas concentrações de metabólitos de cortisol. Este fato pode estar associado à heterogenicidade do grupo

utilizado, alguns animais foram oriundos de apreensões e poderiam estar habituados a uma variedade de agentes tidos como estressores enquanto outros não (Gráfico 1).

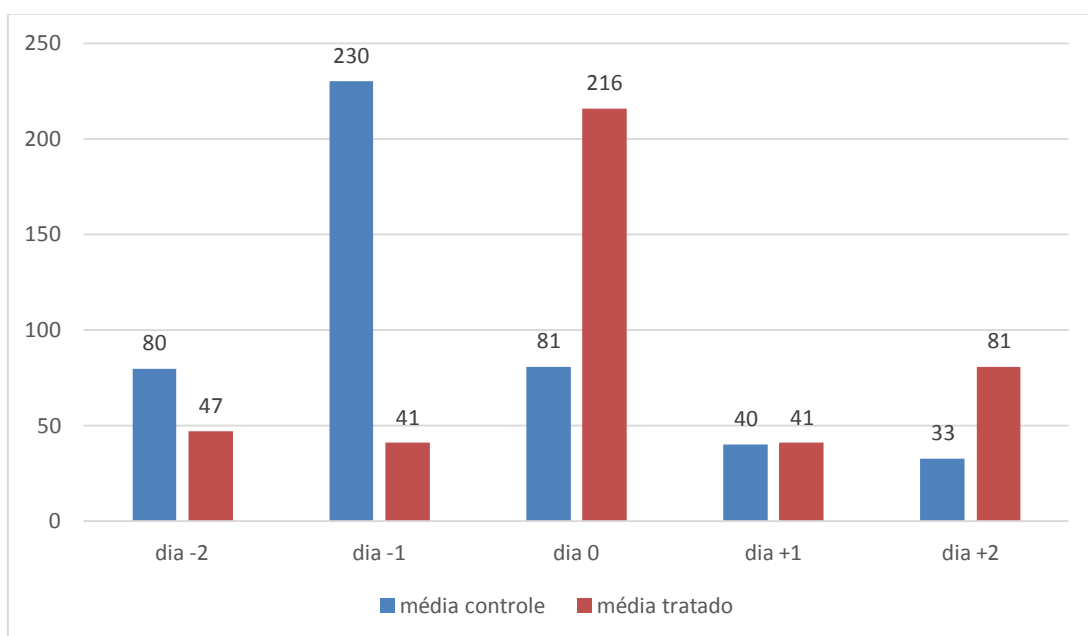


Gráfico 1: Representação das médias das leituras (ng/g) dois dias antes da aplicação do ACTH, no dia da aplicação e dois dias depois.

Segundo as condições desse estudo observamos que diferentes populações de uma espécie podem apresentar diferentes concentrações de metabólitos de glicocorticóides se submetidas a diferentes graus de estresse ou manejo, sendo importante saber a experiência vivida pelos indivíduos. Romero em 2004 escreveu uma revisão sobre os cinco mecanismos fisiológicos que regulam a liberação de glicocorticóides durante o estresse. Segundo o autor mecanismos como experiências prévias, aclimação fisiológica e facilitação ao estresse devem ser levados em consideração ao se planejar e

analisar os dados de uma pesquisa com mensurações de glicocorticóides uma vez que esses fatores modulam a resposta fisiológica, podendo produzir resultados inesperados.

Segundo Mc Dougall et al. (2006) os animais apresentam traços de temperamento individuais e respondem ao estresse de cativeiro de forma diferente. Existem evidências em diversas áreas que indicam que indivíduos ou mesmo populações inteiras diferem em seus comportamentos de forma consistente (Bell & Johnson, 2004). Essas diferenças comportamentais resultam de variações em traços de temperamento e podem afetar de forma significativa a forma como os indivíduos interagem com o ambiente (Dingemans et al., 2004).

A literatura descreve o sagui comum (*Callithrix jacchus*) como sendo uma espécie adaptável em cativeiro. No entanto, devido aos resultados obtidos nesse estudo, observamos que alguns indivíduos são menos adaptáveis quando o estresse é intenso. As condições e as características do ambiente de cativeiro podem influenciar de forma intensa os níveis de estresse dos animais (Carlstead et al., 1999).

5.0 - CONCLUSÕES

Possivelmente devido às condições estruturais e ao desconhecimento do histórico dos animais, não foi possível concluir a validação fisiológica para os metabolitos fecais de glicocorticóides na espécie em estudo.

Sendo assim para obter resultados fidedignos em pesquisas utilizando estes animais como modelo experimental, se faz necessário possuir estrutura contra frio e calor intenso, assim como manter os animais em local protegido de visitantes, sons e

outros animais. Além disso, existe a necessidade do conhecimento do histórico dos animais e da utilização de uma colônia coesa com linhagem conhecida.

6.0 - AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro dado a este trabalho (2009/52654-9; 2010/51926-2).

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bahr NI, Palme R, Möhle U, Hodges JK, Heistermann M. 2000. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. *General and Comparative Endocrinology* **117**, 427–438.

Bell AM, Johnson JC. 2004. Behavioral syndromes: an integrative overview. *Revista de Biologia* **79**, 241-77.

Brown JL, Wemmer CM, Lehnhardt J. 1995. Urinary cortisol analysis for monitoring adrenal activity in elephants. *Zoo Biology* **14**, 533–542.

Carlstead K, Fraser J, Bennett C, Kleiman DG. 1999. Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in US zoos: Behavior, breeding success, and mortality in relation to housing facilities. *Zoo Biology* **18**, 35-52.

Cavigelli, S.A. 1999. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in freeranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Animal Behaviour* **57**, 935–944.

Crockett CM, Bowers CL, Sackett GP, Bowden DM. 1993. Urinary cortisol responses of longtailed macaques to five cage sizes, tethering, sedation, and room change. *American Journal of Primatology* **30**,55–74.

Dantzenzer R, Mormede P. 1983. Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal Animal Science* **57**, 6-18.

Dingemanse NJ, Both C, Drent P, Tinbergen JM. 2004. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Biological Sciences* **271**, 847-852.

Goymann W, Möstl E, Vantho T, East ML, Hofer H. 1999. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *General and Comparative Endocrinology* **114**, 340–348.

Heistermann M, Palme R, Ganswindt A. 2006. Comparison of Different Enzymeimmunoassays for Assessment of Adrenocortical Activity in Primates Based on Fecal Analysis. *American Journal of Primatology* **68**, 257–273.

Heistermann M, Ademmer CHR, Kaumanns W. 2004. Ovarian cycle and effect of social changes on adrenal and ovarian function in *Pygotherix nemaeus*. *International Journal Primatology* **25**, 689–708.

Johnson EO, Kamilaris TC, Carter CS, Calogero AE, Gold PW, Chrousos G.P. 1996. The biobehavioural consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). *Biology Psychiatry* **40**, 317–337.

Lynch JW, Ziegler T, Strier KB. 2002. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus allella nigrurus*. *Hormones and Behavior* **41**, 275–287.

McDougall PT, Réale D, Sol D, Reader SM. 2006. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Animal Conservation* **9**, 39-48.

Mathai K. Nutrição na idade adulta. 2002. Alimentos, nutrição e dietoterapia. In: Mahan LK (eds), pp.261-75. São Paulo.

Möstl E, PALME R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* **23**, 67–74.

Moodie EM, Chamove AS. 1990. Brief threatening events beneficial for captive tamarins? *Zoo Biology* **9**, 275-286.

Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran, EP. 1995. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Veterinary Record* **136**, 60–63.

Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Möstl E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples *Academic Science* **1040**, 162–171.

Romero, LM. (2004). Seasonal Changes in Plasma Glucocorticoid Concentrations in Free-living Vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, **128**, 1-24.

Silva LFG. 2001. Disbiose intestinal: conheça as causas e os tratamentos. 2001. (Homepage on the internet). Urologia (cited junho 2013). Available from URL: http://www.webmedicos.com.br/detalhe_artigo.asp.

Smith T, French JA. 1997. Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhli*). *Physiology Behaviour* **62**, 225–232.

Stratakin CA, Chrousos GP. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. In Stress, basic mechanism and clinical implications. *Academic Science* **771**, 1-18.

Terio KA, Citino SB, Brown JL. 1999. Fecal cortisol metabolite analysis for non-invasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **30**, 484–491.

Touma C, Palme R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Academic Science* **1046**, 54–74.

Vylitová M, Miksik I, Pácha J. 1998. Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. *General and Comparative Endocrinology* **109**, 315-324.

Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett M, Bechert UA. 2000. Generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Endocrinology* **120**, 260-275.

Weingrill T, Gray DA, Barret DA, Heinz SP. 2004. Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. *Hormonio Behaviour* **45**, 259–269.

Whitten PL, Stavisky R, Aureli F, Russel E. 1998. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal Primatology* **44**, 57–69.

Wingfield JC, Ramenofsky M. 1999. Hormones and the behavioral ecology of stress. In: Balm PHM, editor. *Stress physiology in animals*. England Sheffi eld Academic Press-CRC Press, 1-41.

CAPÍTULO 5

**VALIDAÇÃO BIOLÓGICA E LABORATORIAL DE METABÓLITOS FECAIS
DE PROGESTERONA E DE ESTRADIOL: AVALIAÇÃO HORMONAL DA
ATIVIDADE REPRODUTIVA DE SAGUIS COMUNS *Callithrix jacchus***

**VALIDATION BIOLOGICAL AND LABORATORY OF METABOLITES
FAECAL OF PROGESTERONE AND ESTRADIOL: HORMONAL
EVALUATION OF REPRODUCTIVE ACTIVITY OF COMMON MARMOSET
*Callithrix jacchus***

Myrna Campos Ferraz¹, André Vicente Ruiz de Matos², João Carlos Pinheiro
Ferreira³, Carla Martins de Queiroz⁴, Eunice Oba⁵

1)-Myrna Campos Ferraz-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [dra_myrnacampos@yahoo.com.br/](mailto:dra_myrnacampos@yahoo.com.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 2)-André Vicente Ruiz de Matos-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [Parmeso_xl@yahoo.com.br/](mailto:Parmeso_xl@yahoo.com.br) Fone: (5514) 3880-2110 /Fax: (5514) 3880-2042; 3)- João Carlos Pinheiro Ferreira- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [jcferreira@fmvz.unesp.br/](mailto:jcferreira@fmvz.unesp.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 4)-Carla Martins de Queiroz- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [mvcarlaqueiroz@gmail.com/](mailto:mvcarlaqueiroz@gmail.com) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 5)-Eunice Oba- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: [euniceoba@fmvz.unesp.br/](mailto:euniceoba@fmvz.unesp.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119.

*** Trabalho a ser enviado para a Revista Primates.**

RESUMO: Os métodos de monitoramento hormonais não invasivos para animais silvestres estão sendo cada vez mais utilizados. As metodologias não invasivas empregadas nestes estudos são cada vez mais necessárias por não promoverem respostas do tipo estresse, aumentando dessa forma a confiabilidade nos dados obtidos em pesquisas, e por promoverem uma melhora no bem-estar de animais utilizados como modelos biológicos. Os objetivos do presente trabalho foram proceder a validação fisiológica e laboratorial para metabólitos fecais de estradiol nos machos e de progesterona nas fêmeas da espécie *Callithrix jacchus*, correlacionar os níveis dos metabólitos fecais de estradiol nos períodos antes, durante e após as gestações das fêmeas além de proceder a avaliação hormonal da atividade cíclica ovariana nas fêmeas e avaliar as concentrações de progesterona durante as fases gestacionais. Para tal foram utilizados 12 casais adultos, duas fêmeas e dois machos pré-puberes. As coletas foram realizadas antes da fase gestacional e durante o período das gestações. As mensurações foram realizadas por técnica enzimoimunoenzimática. Neste estudo foi possível realizar as validações laboratorial e fisiológica, avaliar a atividade ovariana cíclica e as concentrações dos metabólitos fecais de progesterona durante as fases gestacionais; além de ter sido possível correlacionar os níveis dos metabólitos fecais de estradiol nos períodos antes, durante e após as gestações das fêmeas.

PALAVRAS-CHAVES: *Callithrix jacchus*; validação; estradiol; progesterona; gestação.

ABSTRACT: The methods of non-invasive hormone monitoring for wild animals are being increasingly used. The non-invasive methodology employed in these studies is increasingly necessary for promoting answers like stress, thereby increasing the reliability of the data obtained in research and by promoting an improvement in the welfare of animals used as biological models. The objectives of this study were to conduct validation physiological and laboratory for fecal metabolites of estradiol in males and progesterone in females *Callithrix jacchus*, correlate the levels of fecal metabolites of estradiol in the periods before, during and after pregnancy of females plus undertake hormonal evaluation of cyclic ovarian activity in females and evaluate the concentrations of progesterone during the stages of pregnancy. We used 12 adults and two female and two male pre-pubertal of *Callithrix jacchus*. Samples were collected before the gestational phase and during the period of pregnancy. The measurements were performed by technical enzyme immunoassay. Laboratory and physiological validations were performed and has been possible to monitor the cyclic ovarian activity and concentrations of fecal metabolites of progesterone during gestation females and compare the levels of fecal metabolites of estradiol in the periods before, during and after pregnancy

KEY-WORDS: *Callithrix jacchus*; validation; estradiol; progesterone; gestation.

INTRODUÇÃO

Os animais da espécie *Callithrix jacchus* conhecido vulgarmente como sagui comum são primatas Neotropicais que ocorrem naturalmente no nordeste do Brasil, do Maranhão à Bahia (ÁVILA-PIRES, 1969), e recentemente foram introduzidos no sul e sudeste do País (CERQUEIRA et al, 1998). habitando uma grande variedade de tipos florestais (DIGBY e BARRETO, 1993).

O sagui comum vive em grupos sociais e a monogamia é o principal sistema de acasalamento. As fêmeas produzem geralmente prole gemelar, duas vezes ao ano em média. Por esse motivo a reprodução demanda mais energia para as fêmeas (DIGBY e BARRETO, 1993). Os custos energéticos são então distribuídos entre os membros da família que exibem um sistema cooperativo de cuidado à prole (YAMAMOTO et al., 1996).

O comportamento reprodutivo de *Callithrix jacchus* está centrado na relação entre o macho e a fêmea reprodutora do grupo social, pois somente através dessa interação ocorre sucesso reprodutivo. O posto de animal reprodutor é disputado dentro de mecanismos de natureza comportamental e fisiológica relacionados à hierarquia de dominância. O comportamento dos machos inclui interações afiliativas e sexuais entre o par reprodutor.

O cuidado paterno é parte do comportamento reprodutivo e corresponde a um investimento parental provido somente pelo pai biológico (SNOWDON e SUOMI, 1982). No período após o nascimento dos filhotes, há um aumento de andrógenos em sagui comum (BARBOSA, 2003). Esses hormônios atuam na área pré-óptica e amígdala medial, podendo ser convertidos em estradiol no interior dos neurônios, promovendo o comportamento de cuidado com os infantes (TRAINOR e MARLER, 2002). A conversão de testosterona a estradiol

no sistema nervoso central é importante regulador do comportamento sexual de primatas não humanos machos (ZUMPE et al., 1993).

As alterações hormonais relacionadas à reprodução de *Callithrix jacchus*, têm despertado o interesse de muitos pesquisadores. São comuns nessa área, estudos sobre as alterações hormonais que ocorrem durante a gravidez e pós-parto, bem como em contextos de disputa entre as fêmeas. Os eventos fisiológicos, endócrinos e comportamentais relacionados à reprodução durante o ciclo ovulatório, gravidez e lactação na espécie já foram estudados por diversos pesquisadores (HEARN, 1983; DIXSON e LUNN, 1987).

A duração do ciclo ovulatório do *Callithrix jacchus* foi descrita por Hearn e Lunn (1975) como tendo duração média de 16,4 dias. Harding et al.(1982) observaram um ciclo ovariano de 30,4 dias. Por mais que os relatos sejam oriundos de uma mesma colônia, os saguis utilizados no primeiro estudo foram capturados da natureza e haviam sido introduzidos na colônia pouco tempo. No segundo estudo, os animais utilizados eram nascidos na colônia. Anos depois Hearn (1983) relatou um ciclo ovariano de $28,6 \pm 10$ dias.

O ciclo pode ser dividido em uma fase folicular de $8,3 \pm 0,3$ dias e uma fase lútea de $19,2 \pm 0,6$ dias (Hearn, 1983). Em *Callithrix jacchus* a fase lútea detectada no plasma foi definida a partir do aumento sustentável de progesterona acima de 10ng/ml, até sua redução a níveis basais.

A espécie apresenta características reprodutivas singulares que a tornam um interessante modelo biológico para o estudo da foliculogênese. As fêmeas desta espécie apresentam ciclos ovulatórios contínuos durante todo o ano, não havendo sazonalidade reprodutiva e os estros pós parto podem ser observado após o nascimento dos filhotes (CHAMBERS e HEARN, 1979).

Entretanto, segundo Hall e Hodgen (1979) os procedimentos para monitoramento dos ciclos ovulatórios requerem uma manipulação frequente dos primatas. Sendo assim métodos não invasivos como as dosagens hormonais de metabólitos excretados em urina e fezes são alternativas potencialmente atrativas (BROWN, 2006). No entanto os metabólitos excretados, sua forma, o intervalo de tempo entre uma alteração sérica dos níveis de esteróides e a sua correspondente excreção nas fezes ou urina, podem variar consideravelmente entre as espécies (GRAHAM et al., 2001). Dessa forma a validação de métodos não invasivos torna-se imprescindível para cada espécie antes da sua aplicação (PALME, 2005).

Durante a última década, a monitoração dos metabólitos de esteróides sexuais excretado nas fezes promoveu caracterização efetiva do ciclo estral, prenhes e padrões sazonais de várias espécies de primatas, ungulados e equídeos (WASSER et al., 1988 BAMBERG et al., 1991; HEISTERMANN et al., 1993).

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram proceder a validação fisiológica e laboratorial para metabólitos fecais de estradiol nos machos e de progesterona nas fêmeas da espécie *Callithrix jacchus*, correlacionar os níveis dos metabólitos fecais de estradiol nos períodos antes, durante e após as gestações das fêmeas além de proceder a avaliação hormonal da atividade cíclica ovariana nas fêmeas e avaliar as concentrações de progesterona durante as gestações.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu – SP-Brasil, 22°53`09” latitude sul e 48°26`42” longitude oeste com temperatura média anual de 22°C.

Foram utilizados doze casais adultos, duas fêmeas e dois machos pré-púberes com quatro meses de idade de primatas da espécie *Callithrix jacchus*, totalizando 28 animais. Os animais eram provenientes de dois locais distintos. Seis machos e seis fêmeas foram oriundos de apreensões do Parque Ecológico do Tietê, localizado na várzea do rio Tietê, na divisa dos municípios de São Paulo e Guarulhos, Estado de São Paulo. Os outros seis machos e seis fêmeas foram provenientes do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba - São Paulo.

As fêmeas e machos pré-púberes nasceram no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, campus de Botucatu – SP - Brasil.

Os animais foram alojados em gaiolas medindo 60cm de altura x 120 cm de largura x 60cm de profundidade. Mantidos em condições naturais de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro. Foi oferecida aos saguis duas refeições diárias composta de frutas, legumes e ovos pela manhã e uma papa protéica à tarde, ração triturada (ALCON[®]) acrescida de banana, mel e

sustagem[®]; oferecendo-se como complemento larvas de tenébrios (*Tenebrio molitor*) uma vez por semana.

O experimento foi dividido em dois momentos distintos:

Em um primeiro momento os casais foram mantidos separados por uma chapa cega colocada no meio das gaiolas. Não havia possibilidade de cópula, no entanto a aproximação possibilitou o contato olfativo, auditivo e até mesmo visual através de uma fresta localizada na parte inferior da chapa cega. Desta forma foi possível coletar as fezes das fêmeas e dos machos separadamente e observar se existiriam comportamentos agonísticos entre o casal, como agressividade, que poderia colocar em risco a saúde e a vida dos animais quando fossem agrupados para reprodução. Esta fase experimental teve duração de quatro meses.

As colheitas de fezes para as futuras mensurações de metabólitos de progesterona e estradiol foram realizadas três vezes por semana sempre no período da manhã durante todo o primeiro momento experimental.

Em um segundo momento os casais foram agrupados para a reprodução. Nesta etapa do experimento as colheitas de fezes foram realizadas uma vez por semana, no período da manhã até o momento dos partos (durante cinco meses) e durante dois meses após os partos.

Para que não houvesse a possibilidade de colher erroneamente as fezes, confundindo as dos machos com as das fêmeas e vice versa e evitar contaminações nas amostras, as bandejas eram limpas antes das colheitas, e após a limpeza os animais eram separados por alguns instantes com o auxílio da mesma chapa cega utilizada no primeiro momento experimental (Figura 1).

Após a produção do bolo fecal e das colheitas efetuadas, as chapas cegas eram retiradas.



Figura 1: Chapa cega utilizada para separar o casal de *Callithrix jacchus*

As colheitas de amostras das fêmeas e dos machos pré-púberes foram realizadas três vezes por semana no período da manhã durante três meses.

As amostras foram previamente identificadas, acondicionadas em eppendorf® e armazenadas em freezer -20°C até o momento das extrações e mensurações.

EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS HORMONAIS

A extração e as dosagens hormonais das amostras fecais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Proteínas de Fase Aguda e Monitoramento Não Invasivo da Reprodução e do Bem-Estar Animal.

A metodologia seguida foi descrita por Grahan et al. (2001) modificada.

Foram pesadas e homogeneizadas uma alíquota de 0,25g de fezes úmidas em tubos plásticos com tampa. Após a pesagem as fezes foram diluídas em 2,5mL de metanol a 80% e levadas ao agitador vórtex por 30 minutos. A seguir o extrato foi centrifugado à 500 G por 20 minutos. Após essa etapa foi retirado 500µL do sobrenadante, que foi transferido para tubos eppendorf® previamente identificados. Os tubos foram então acondicionados em freezer (-20°C) até o momento das dosagens.

DOSAGENS DE METABÓLITOS FECAIS DE ESTRADIOL E PROGESTERONA

Foram dosadas em duplicata 1100 amostras, sendo 740 para progesterona e 360 para estradiol. As dosagens dos metabólitos fecais foram realizadas pela técnica de enzimoimunoensaio com a utilização de conjuntos diagnósticos comerciais da Cayman Chemical Company® com limite de detecção: 80% B/B0: 10 pg/mL · Sensibilidade: 50% B/B0: 70 pg/mL para dosagem de progesterona sérica em humanos e com limite de detecção: 80% B/B0: 19 pg/mL, Sensibilidade: 50% B/B0: 129 pg/mL para dosagem de estradiol sérico em humanos. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA

A validação fisiológica para os metabólitos de progesterona foi realizada através da comparação entre as médias das concentrações dos metabolitos de

progesterona medidas em momentos fisiológicos distintos (antes e após a puberdade) (Kugelmeier, 2005), e pela presença de atividade cíclica nas fêmeas em estudo.

A validação para os metabólitos de estradiol foi realizada através da comparação entre as médias das concentrações dos metabólitos de estradiol medidas em momentos fisiológicos distintos (antes e após a puberdade) (Kugelmeier, 2005).

VALIDAÇÃO LABORATORIAL

A validação laboratorial dos conjuntos comerciais adquiridos da Cayman Chemical[®] para mensuração de progesterona e de estradiol no plasma utilizados neste experimento para o uso em determinação de metabólitos de estradiol e progestinas fecais de sagui comum (*Callithrix jacchus*) foi realizada através da comparação entre a curva formada pelas concentrações obtidas a partir de diluições sucessivas da concentração inicial do hormônio marcado adicionado de amostras fecais e a curva padrão do kit utilizado.

Este método indica se os metabólitos hormonais da espécie estudada interagem com o anticorpo do kit de forma similar ao hormônio utilizado como padrão. Para tanto, foram utilizadas amostras com concentrações hormonais muito baixas (matrizes). A essas matrizes foram adicionadas quantidades conhecidas do hormônio marcado em diluições tais que as concentrações finais deveriam se aproximar dos pontos da curva padrão do kit utilizado.

Os valores das curvas obtidas foram correlacionados com os valores das curvas padrão do conjunto diagnóstico. A comparação foi realizada pelo coeficiente de regressão linear, expresso em qui-quadrado ($r=R^2$) para expressão apenas de valores positivos e do coeficiente de correlação de Pearson. Os ensaios foram validados quando os coeficientes de correlação foram próximos de 1 ou 100%. Desta forma obtivemos as curvas dose - resposta.

Para obtenção das curvas de paralelismo utilizadas para saber se as dosagens das amostras seguiam as curvas padrão na mesma proporção, foi retirado 50 μ L de duas amostras com altas concentrações hormonais obtendo-se um pool de 100 μ L. Empregando-se a solução tampão EIA foram realizadas diluições $\frac{1}{2}$ sucessivas de modo a se obter amostras até a diluição 1:512. Com estes resultados foram construídas as curvas, a partir da regressão simples entre os valores de metabólitos mensurados (ng/g) no extrato fecal em diluições seriadas, e em solução estoque diluída na mesma proporção que o extrato fecal para se verificar o paralelismo entre elas.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram realizadas análises descritivas, com o cálculo de média e desvios-padrões para as concentrações dos metabólitos de progesterona nas fases foliculares e lúteas. As concentrações médias dos metabólitos foram comparadas entre as duas fases utilizando o teste T pareado ($p < 0,005$).

Para comparação entre os níveis de metabólitos fecais de progesterona e estradiol em momentos fisiológicos distintos, antes e após a puberdade, foi utilizado o teste T ($p \leq 0,005$).

Para a comparação entre as média do terço médio e final das gestações e também pra a comparação das médias antes, durante e após as gestações das concentrações dos metabólitos fecais de estradiol nos machos foi utilizado o teste T pareado ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

VALIDAÇÃO LABORATORIAL (METABÓLITOS FECAIS DE PROGESTERONA)

Curva Dose-Resposta

A curva dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de progesterona em amostras fecais, adicionada de quantidades conhecidas do hormônio está representada pelas equação $y = 1,32x - 99,9$ ($R^2 = 0,9496$).

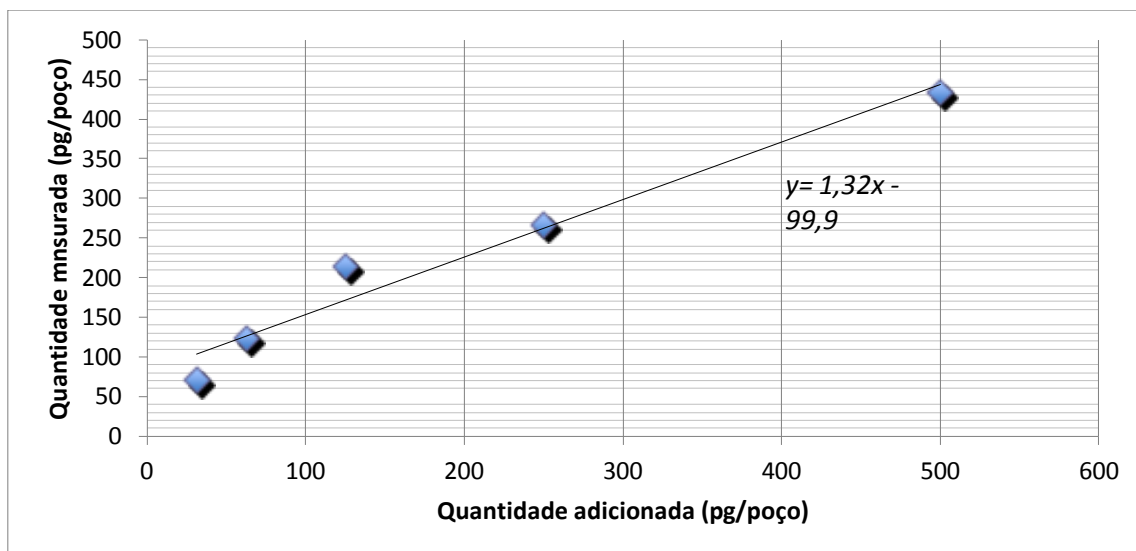


Figura 2: Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de progesterona em amostras fecais de sagui comum (*Callithrix jacchus*) adicionada de quantidade conhecida de progesterona.

Curva de Paralelismo

As curvas padrão e diluição (Série 1) obtidas no ensaio de paralelismo realizado para a validação laboratorial da dosagem fecal de metabólitos de progesterona estão demonstradas na Figura 3.

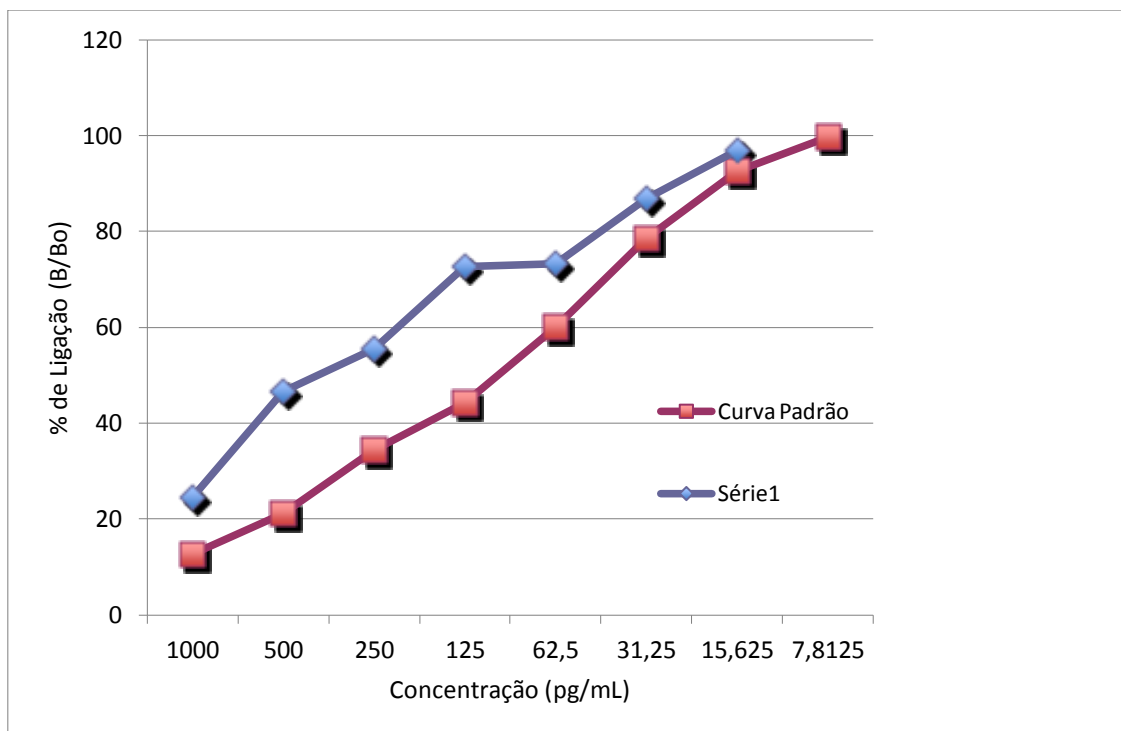


Figura 3: Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de progesterona em amostras fecais de sagui comum (*Callithrix jacchus*) pela técnica de EIA.

Controle de qualidade

O controle de qualidade do ensaio foi realizado segundo as orientações do Kit comercial utilizado. Todas as amostras utilizadas respeitavam o padrão da relação B/B₀, ou seja, somente foram utilizadas as amostras que estavam acima de 20 e abaixo de 80% como representado pela curva adquirida no próprio conjunto comercial (Figura 04).

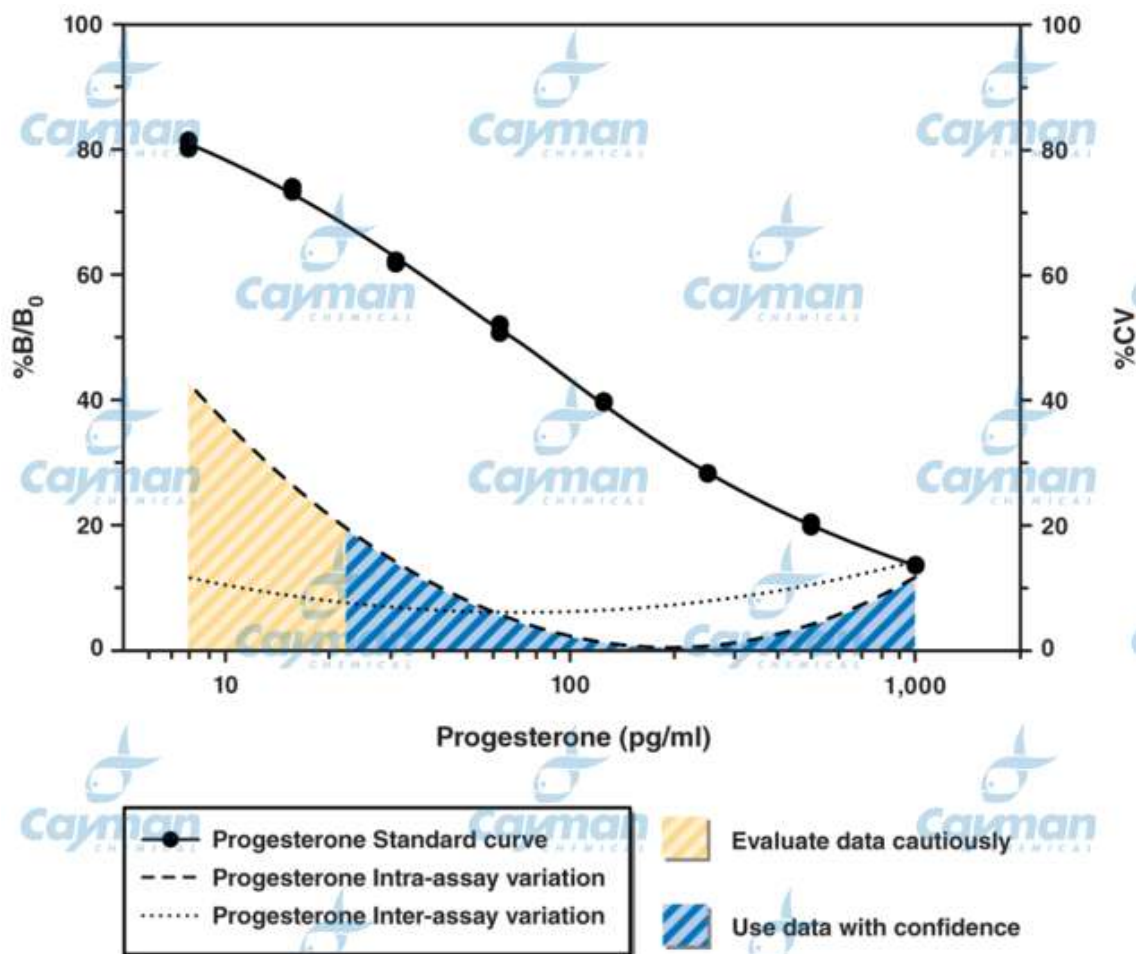


Figura 4: Curva Standart própria do conjunto diagnóstico comercial da Cayman Chemical Company[®] para dosagem de progesterona no plasma sanguíneo com limite de detecção: 80% B/B₀: 10 pg/mL · Sensibilidade: 50% B/B₀: 70 pg/mL.

VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA E CICLICIDADE OVARIANA

A validação fisiológica foi obtida pela caracterização hormonal da existência de ciclicidade ovariana, demonstrada pelos perfis dos metabólitos fecais de progesterona assim como pela comparação entre os níveis de metabólitos de progesterona fecal em momentos fisiológicos distintos, antes e após a puberdade (Tabela 1).

As fêmeas pré-púberes apresentaram níveis basais de metabólitos fecais durante praticamente todo o estudo, as médias e desvios padrões encontrados entre as fêmeas pré-púberes e as adultas foram respectivamente $37,11 \pm 31,69$ e $245,4 \pm 116,10$ (ng/g). As médias apresentaram diferenças estatística significativa ($p \leq 0,05$) (Figura 5).

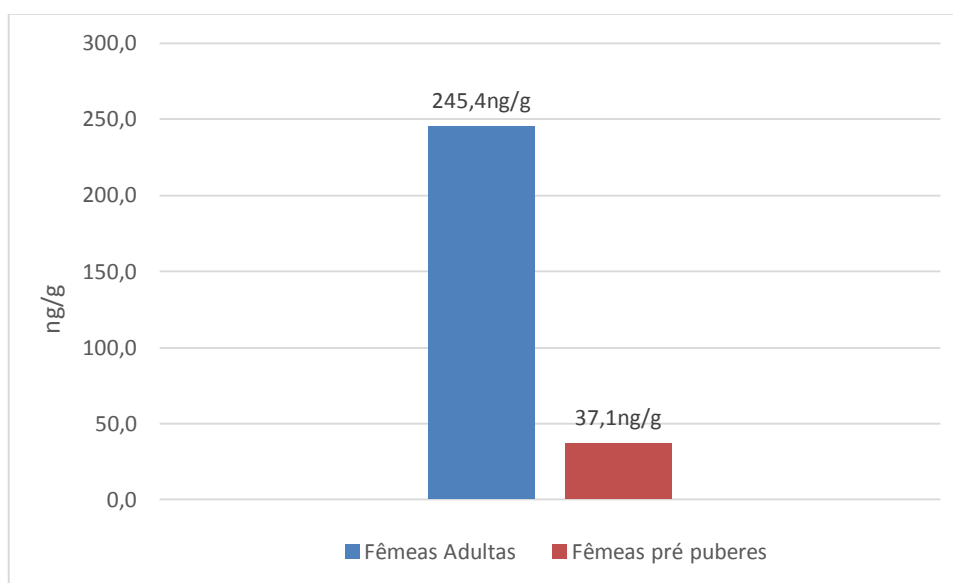


Figura 5: Representação gráfica das diferenças entre as médias (ng/g) das concentrações de metabólitos de progesterona fecal nas fases folicular e lútea medidas em momentos fisiológicos distintos (antes e após a puberdade).

Segundo Hearn (1983) a progesterona aparece primeiramente aumentada no plasma da fêmea em torno de 300 dias de idade, mas o padrão não sugere ovulação normal até 6-12 meses depois. Sendo assim os perfis hormonais apresentados pelas duas fêmeas pré-púberes confirmaram a validade fisiológica do ensaio realizado neste estudo. A presença de metabólitos de progestinas fecais em níveis basais durante quase todo o período correspondeu ao estado fisiológico esperado para a espécie.

Os ensaios realizados para as doze fêmeas adultas utilizadas neste estudo mostraram variações nas concentrações dos metabólitos que refletiram a presença de atividade ovariana cíclica. Os resultados obtidos demonstraram haver uma diferença significativa entre as concentrações médias de metabólitos de progesterona das fases folicular e lútea, embora tenham existido irregularidades marcantes entre as concentrações de progesterona nas fêmeas utilizadas nesse estudo (Tabela 01).

Segundo Harding et al. (1982) animais em fase de adaptação podem apresentar irregularidades no ciclo. Paladine, (2009) descreveu em seu estudo com *Callithrix Penicillata* a mesma irregularidade no ciclo das fêmeas, o que sugere ter existido alguma interferência de relações de dominância e subordinação já que nesse estudo e no trabalho realizado por Paladine, as fêmeas mesmo estando separadas mantiveram entre si contato visual, auditivo e olfativo. A dieta e as condições de manejo também poderiam estar relacionadas a essas irregularidades (PALADINE, 2009).

Essa variação individual em *Callithrix* também foi evidenciada por Eastman et al. (1984) tanto no ciclo estral como nas diversas fases da gestação.

A fêmea nove apresentou durante todo o estudo níveis mais baixos de progesterona (Tabela 01). Esta fêmea veio a óbito antes do término deste estudo apresentando diarreia e emagrecimento progressivo.

Em relação ao ciclo das fêmeas a duração média realizada a partir do dia 0 foi de $24,3 \pm 4,05$ dias. Harding et al.(1982) observaram um ciclo ovariano de 30,4 dias em saguis recém capturados da natureza. Os dados obtidos

nesse estudo aproximam-se dos dados reportados por Hearn (1983) que relatou um ciclo ovariano de $28,6 \pm 10$ dias em saguis já habituados ao cativeiro.

Tabela 1: Médias e Desvios Padrões das concentrações (ng/g) de metabólitos de progesterona nas fases folicular e lútea de fêmeas de *Callithrix jacchus*.

	Fase Folicular		Fase Lútea	
Fêmea 1	21.80 ± 13.31	A	167.35 ± 84.7	B
Fêmea 2	44.03 ± 26.52	A	364.51 ± 189.4	B
Fêmea 3	36.05 ± 34.1	A	339.40 ± 225.7	B
Fêmea 4	64.36 ± 28.9	A	449.33 ± 295.4	B
Fêmea 5	45.95 ± 20.7	A	341.21 ± 174.7	B
Fêmea 6	152.83 ± 53.1	A	382.04 ± 164.3	B
Fêmea 7	136.57 ± 61.7	A	724.03 ± 563.8	B
Fêmea 8	18.56 ± 10.9	A	116.46 ± 96.3	B
Fêmea 9	19.27 ± 10.6	A	91.89 ± 44.6	B
Fêmea 10	170.7 ± 83.9	A	658.29 ± 335.2	B
Fêmea 11	156.99 ± 85.6	A	544.13 ± 135.2	B
Fêmea 12	45.84 ± 31.8	A	384.2 ± 245.2	B

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias ($P \leq 0,05$).

GESTAÇÃO

Os perfis encontrados para as concentrações de metabólitos fecais de progesterona diferiram dos resultados descritos na literatura, onde é reportado que o terço médio da gestação apresenta concentrações maiores de

progesterona do que o terço final em *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* (HEARN, 1978; PALADINE, 2009).

Neste estudo observamos que não houve diferença estatística entre as médias das concentrações de metabólitos fecais de progesterona entre o terço médio $255,89 \pm 231,34$ e final $258,92 \pm 190,20$ ($p=0,49$). Três das sete fêmeas que ficaram prenhes tiveram concentrações menores de progesterona no terço médio em relação ao terço final (Figura 6).

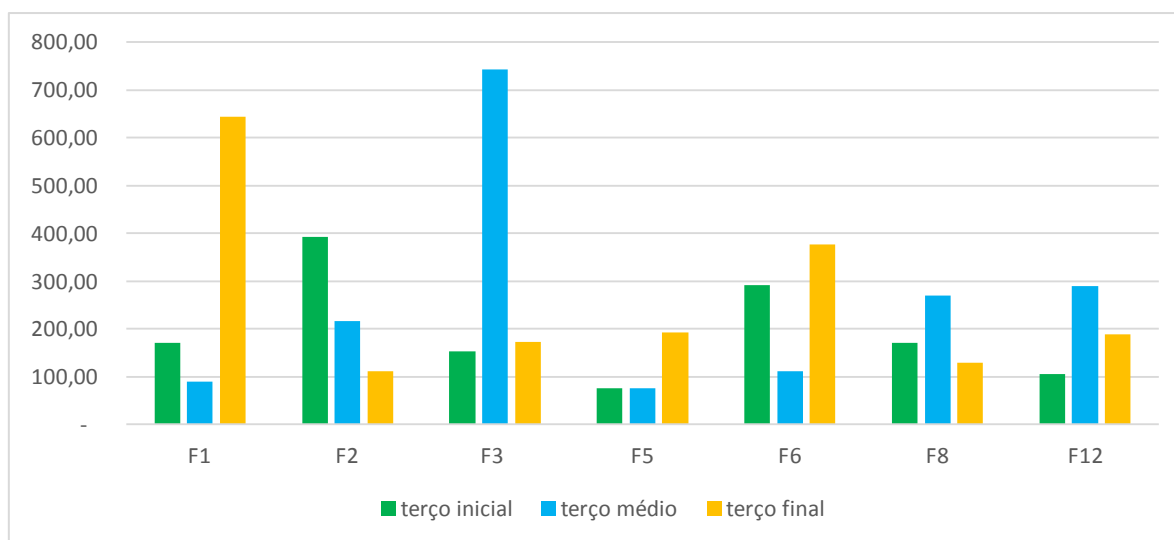


Figura 6: Médias das concentrações de metabólitos de progesterona (ng/g) no terço inicial, médio e final das gestações de fêmeas de *Callithrix jacchus*.

As fêmeas de número quatro, sete, dez e onze não apresentaram prenhes provavelmente devido ao alto grau de estresse imposto aos animais em cativeiro como predadores vizinhos, sons estranhos e frio e calor intensos. Segundo Shepherdson (1994) a reprodução animal pode ser suprimida ou estimulada pelo estresse, dependendo da intensidade, do tempo e da habilidade do animal em interagir com o agente estressor. O impacto fisiológico

e comportamental de um agente estressor é altamente dependente da percepção e do tipo de resposta comportamental do indivíduo.

Outra possibilidade para a não ocorrência de prenhes para estas fêmeas seria a falta de interação entre o casal, no entanto foram observados acasalamentos e comportamentos de interação como catação, nos levando a sugerir que esses indivíduos não possuíam habilidade para lidar com as situações de estresse ocorridas durante a fase experimental.

VALIDAÇÃO LABORATORIAL (METABÓLITOS FECALIS DE ESTRADIOL)

Curva Dose-Resposta

A curva dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de estradiol em amostras fecais está representada pelas equação:

$$Y=0,89x - 30,1 \quad \text{com } R^2 = 0,9850 \text{ (Figura 7).}$$



Figura 7: Curva de dose-resposta obtida na validação laboratorial da dosagem por EIA de metabólitos de estradiol em amostras fecais de sagui comum (*Callithrix jacchus*).

Curva de Paralelismo

As curvas padrão e diluição (série 1) obtidas no ensaio de paralelismo estão demonstradas na Figura 8.

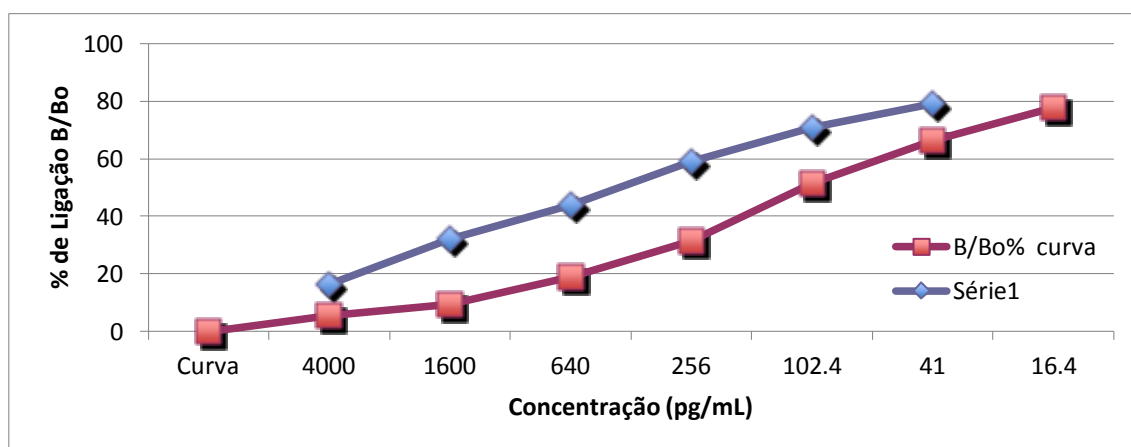


Figura 8: Curva de paralelismo para dosagem de metabólitos de estradiol em amostras fecais de sagui comum (*Callithrix jacchus*) pela técnica de EIA.

Controle de qualidade

O controle de qualidade do ensaio foi realizado segundo as orientações do Kit comercial utilizado. Todas as amostras utilizadas respeitavam o padrão da relação B/B₀, ou seja, somente foram utilizadas as amostras que estavam acima de 20 e abaixo de 80% como representado pela curva adquirida no próprio conjunto comercial (Figura 9).

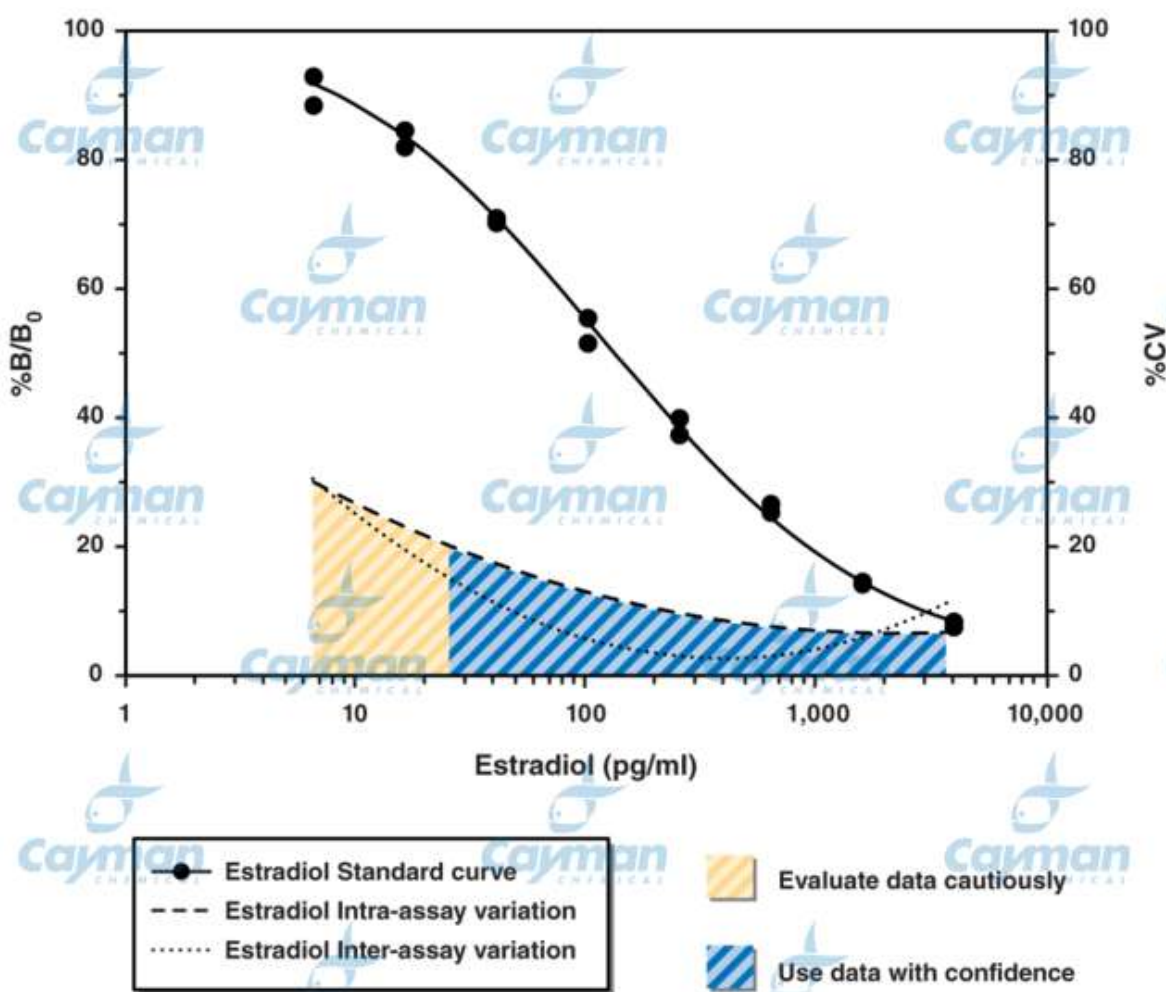


Figura 9: Curva Standart própria do conjunto diagnóstico comercial da Cayman Chemical Company® para dosagem de estradiol no plasma sanguíneo com limite de detecção: 80% B/B₀: 20 pg/mL • Sensibilidade: 50% B/B₀: 125 pg/mL.

VALIDAÇÃO FISIOLÓGICA PARA METABÓLITOS FECALIS DE ESTRADIOL

A validação fisiológica neste estudo foi obtida através da diferença significativa entre as médias de concentrações de estradiol antes e após a puberdade. Os machos pré-púberes apresentaram níveis basais de metabólitos fecais durante praticamente todo o estudo, as médias e desvios padrões encontrados entre os machos pré-púberes e os adultos foram respectivamente $14,4 \pm 13,7$ e $24,7 \pm 12,3$ (ng/g). As médias apresentaram diferença estatística significativa ($P=0,0481$).

CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS FECALIS DE ESTRADIOL ANTES, DURANTE E APÓS O PERÍODO GESTACIONAL

Pelos resultados desse estudo houve aumento nas concentrações de estradiol nos machos durante a fase gestacional das fêmeas em relação ao período que antecedeu as gestações, em alguns animais esse aumento foi significativo, por outro lado ocorreu diminuição dos níveis após os partos mesmo que de forma não significativa (Tabela 2 e Figura 1). Os dados obtidos diferem dos resultados apresentados por Saldanha et al. (2005), que reportaram aumento nas concentrações de estradiol após os partos.

O fato dos animais estarem separados no período que antecedeu às gestações pode justificar o aumento nas concentrações de metabólitos fecais de estradiol nos machos durante a fase gestacional. Este aumento pode estar ligado ao comportamento de guarda ao parceiro e ao comportamento de cópula. Segundo Trainor e Marler (2002) estes tipos de comportamentos são

modulados por andrógenos. Zumpe et al. (1993) sugeriram que a conversão de testosterona a estradiol no Sistema Nervoso Central é importante regulador do comportamento sexual de machos de primatas não humanos.

O macho de número nove (M9) não apresentou aumentos nas concentrações de estradiol durante esse período, seus níveis ficaram durante toda a fase experimental aparentemente basais (Tabela 2, 3 e Figura 10). Este macho fez par com a fêmea nove que não teve gestação confirmada e que veio a óbito antes do término deste trabalho. O fato da fêmea em questão ter apresentado diarreia e emagrecimento progressivo pode justificar os níveis hormonais baixos.

Entretanto, o macho nove (M9) apesar de sadio, também não apresentou níveis de estradiol compatíveis com aqueles encontrados nos outros machos, sugerindo que o aumento nas concentrações de metabólitos de estradiol, em relação ao período antes e durante as gestações, pode estar relacionado não somente ao comportamento sexual e de proteção ao parceiro mas também ao momento fisiológico da gestação da fêmea.

A diminuição dos níveis de estradiol após os partos diverge de alguns resultados encontrados na literatura, tais como Barbosa (2003) que observou em seu estudo aumento nas concentrações de andrógenos em sagui comum após os nascimentos. Por outro lado, Nunes e colaboradores em 2002 encontraram em *Callithrix kuhlli* diminuição dos valores de estradiol três a quatro semanas após ao parto, sugerindo ser necessário este declínio para ocorrer o cuidado parental nesta espécie.

Tabela 2: Comparação entre as médias individuais (ng/g) dos momentos anteriores à gestação com as médias obtidas (ng/g) no período gestacional.

Animal	Antes da gestação	Periodo Gestacional
M 1	14 ± 7.3 A	35.5 ± 27.4 B
M 2	14.5 ± 9.5 A	24.8 ± 16.5 B
M 3	30.6 ± 43.8 A	42.8 ± 46.5 A
M 5	23.2 ± 22.1 A	66.4 ± 53.4 B
M 6	14.4 ± 7.1 A	34.7 ± 40.2 B
M 9	15.2 ± 8.0 A	13.2 ± 11.0 A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ($P \leq 0,05$).

Tabela 3: Comparação entre as médias individuais de estradiol (ng/g) do período gestacional com as médias de estradiol (ng/g) obtidas no período pós parto.

Animal	Periodo Gestacional	Pós Parto
M 1	35.5 ± 27.4 A	12.6 ± 15,0 A
M 2	24.8 ± 16.5 A	19.6 ± 11,5 A
M 3	42.8 ± 46.5 A	26.4 ± 18,4 A
M 5	66.4 ± 53.4 A	30.4 ± 17,5 A
M 6	34.7 ± 40.2 A	36.5 ± 20,6 B
M 9	13.2 ± 11.0	

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ($P \leq 0,05$).

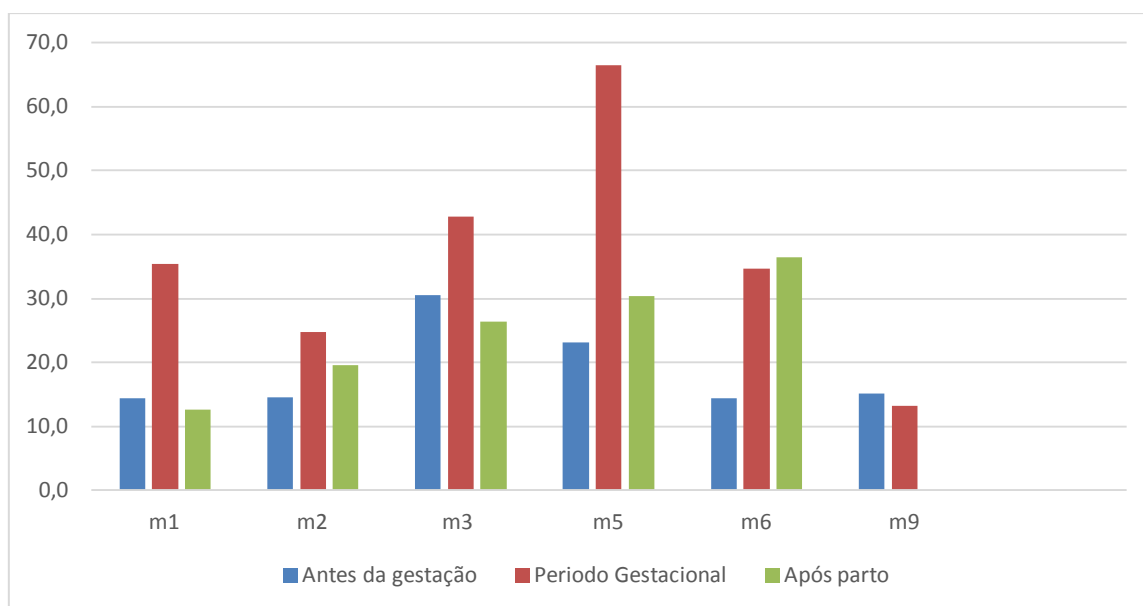


Figura 10: Médias das concentrações de metabólitos de estradiol (ng/g) antes, durante e após as gestações de saguis (*Callithrix jacchus*).

CONCLUSÕES

Os conjuntos comerciais da Cayman Chemical® para a detecção de progesterona e estradiol em plasma humano utilizado nesse estudo para dosagem de metabólitos fecais de progesterona e estradiol em *Callithrix jacchus* foram validados tanto fisiologicamente quanto laboratorialmente, permitindo desta forma detectar aumentos e diminuições nas concentrações da progesterona durante a atividade cíclica ovariana e na fase gestacional como também detectar aumentos e diminuições nas concentrações de estradiol nos períodos antes, durante e após as gestações.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro dado a este trabalho (2009/52654-9; 2010/51926-2).

NOTA ÉTICA

Todo o experimento realizado teve a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho – Botucatu – SP - Brasil, autorização número 126/2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avila-Pires FD (1969) Taxonomia e zoogeografia do gênero *Callitrix* Erxleben, 1777, (Primates, Callitrichidae). Rev. Brasileira de Biologia 29: 49 – 64.

Barbosa MFPP (2003) Níveis de esteróides e comportamentos sócio-sexuais do par reprodutor de *Callithrix jacchus* durante os períodos de gestação e pós-parto. Tese (Doutorado em Psicobiologia) Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 102f.

Brown JL (2006) Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids, Theriogenology 66: 25-36.

Cerqueira R, Marroig G, Pinder L (1998) Marmosets and Lion-tamarins distribution (Callitrichidae, Primates) - Rio de Janeiro, South-eastern Brazil. *Mammalia*, Paris, 62: 213-226.

Chambres PL, Hearn PL (1979) Peripheral plasma levels of progesterone, oestradiol-17 β , oestrone, testosterone, androstenedione and chronic ganadotrophin during pregnancy in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil*, 56: 23-32.

Digby LJ, Barreto CE (1993) Organização social em uma população selvagem de *Callithrix jacchus* : Eu, a concorrência do grupo e dinâmica. *Folia Primatol* 61: 123-34.

Dixon AF, Lunn S F (1987) Postpartum changes in hormones and sexual behavior in captive groups of marmosets (*Callithrix jacchus*). *Physico Behav* 4: 577-583.

Eastman, SA. K, Makawiti DW, Collins WP, Hodges JK (1984). Padrão de excreção de meatabolites esteróides urinários durante o ciclo ovariano e gravidez no macaco sagüi. *J. Endocrinol.* 102: 19-26.

Grahan L, Schwarzenberger F, Möstl E, Galama W, Savage AA (2001) Versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in faces and serum. *Zoo biol* 7: 1071-1075.

Hall RD, Hodgen GD (1979) Pregnancy diagnosis in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*): evaluation of the hemagglutination inhibition test for urinary chorionic gonadotropin. *Lab. Anim Sci* 29: 345-348.

Harding RD, Hulme MS, Lunn SF, Henderson C, Aitken RJ (1982) Plasma progesterone levels throughout the ovarian cycle of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Medi Primato* 11: 43-51.

Hearn JP (1978) The endocrinology of reproduction in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. In: KLEIMAN, D.G. The biology and conservation of marmosets. Washington, D.C.: Smithsonian Institute, 163-171.

Hearn JP, Lunn SF (1975) The reproductive biology of the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*, in *Breeding Simians of Developmental Biology* (eds). (Laboratory Animals Handbook), v. 6, pp 191-202.

Hearn, NJ (1983). The common marmoset (*Callithrix jacchus*) In: *Journal of Zoology. Reproduction in new world primates: new models in medical science.* Lancaster: MTP Press, p.181-215.

Heistermann M, Tari S, Hodges JK (1993) Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. *J. Reprod. Fertil.* 99: 243-251.

Kugelmeier T (2005) Avaliação endocrinológica do ciclo ovariano de macaco bugio (*Alouatta caraya*-Humboldt, 1812) por meio de extração e dosagem de metabólitos de esteroides fecais. Dissertação de mestrado- FMVZ-USP-São Paulo, 120 f.

Nunes S, Brown C, French JA (2002) Variation in Circulation excreted estradiol associated with testicular activity in male marmosets. *Am Jour Primato*, 56:12-27.

Paladine MD (2009). Estudo do ciclo ovariano de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, GEOFROY, 1812) com o uso de métodos não-invasivos: extração e mensuração de metabólitos fecais de estradiol e progesterona. Dissertação de Mestrado-FMVZ-USP-São Paulo, 78f.

Palme R (2005) Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals** New York Academy of Sciences,1046:1-6.

Saldanha DM, Nascimento HG, Pedrosa MFPB, Sousa MBCS (2005) Monitoramento hormonal do par reprodutor de sagui comum (*Callithrix jacchus*) antes e após o nascimento dos filhotes, *PublCa* 1:32-41.

Shepherdson DJ (1994). The role of environmental enrichment in captive breeding and reintroduction of endangered species. In: Mace G, Olney P,

Feistner A. Creative conservation: interactive management of wild and captive animals. London: Chapman and Hall, 1994. p.167-177.

Snowdon C, Suomi SJ (1982) Paternal behavior in Primates. Wisconsin: Department of Psychology, University of Wisconsin, WI 53: 63-108.

Trainor BC, Marler CA (2002) Testosterone promotes paternal behaviour in a monogamous mammal via conversion to oestrogen. The Royal Society, 269: 823-829.

Zumpe D, Bonsall RW, Michael RP (1993) Effects of nonsteroidal aromatase inhibitor, fadrozole on the sexual behavior of male cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). Horm Behav 27: 200-215.

Wasser SK, Risler L, Steiner RA (1988) Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. Biol. Reprod. 39: 862-872.

Yamamoto ME, Box HO, Albuquerque FS, Arruda MF (1996) Carrying behaviour in captive wild marmosets (*Callithrix jacchus*): a comparison between two colonies and a field site. Primates, 37:297-304.

CAPÍTULO 6

1 EFEITO DA PRÓPOLIS BRUTA NA DIETA DE SAGUIS *Callithrix jacchus* MANTIDOS
2 EM CATIVEIRO, ANTES E DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

3
4 EFFECT OF DIETARY PROPOLIS IN THE DIET OF MARMOSET *Callithrix jacchus*
5 KEPT IN CAPTIVITY BEFORE AND DURING THE PERIOD GESTACIONAL

6 Título resumido: Própolis na dieta de sagui comum

7
8 Myrna Campos Ferraz¹, André Vicente Ruiz de Matos², Lygia Carla Francelino³, Carlos
9 Roberto Teixeira⁴, Eunice Oba⁵

10
11 1- Departamento de Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e
12 Zootecnia - FMVZ - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
13 UNESP - Botucatu – SP Brasil. Distrito de Rubião Jr. S/N Cep: 18618-000; e-mail:
14 dra_myrnacampos@yahoo.com.br

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25 * Artigo a ser enviado para a Revista Acta Scientiarum Animal Science.

26 **RESUMO:** A espécie *Callithrix jacchus* vêm sendo utilizada como modelo experimental
27 para vários estudos envolvendo farmacologia, estudos comportamentais e nutricionais.
28 Por ser filogeneticamente próxima ao ser humano, esta espécie exhibe respostas
29 fisiológicas e comportamentais semelhante aos humanos, em situações que induzem
30 ansiedade. Devido ao seu pequeno tamanho e por serem adaptáveis em cativeiro a espécie
31 está sendo cada vez mais utilizada como modelo biológico. Sendo assim, torna-se
32 imprescindível o fornecimento de alimentação adequada para garantir melhor reprodução
33 e bem estar destes animais em centros de conservação e/ou pesquisa. O objetivo do
34 presente estudo foi avaliar o efeito da adição da própolis na alimentação sobre o ganho de
35 peso de saguis (*Callithrix jacchus*) mantidos em cativeiro antes e após o acasalamento. O
36 grupo tratamento recebeu dieta de rotina, acrescida de uma colher medida de queijo petit
37 suisse (Danoninho®) para melhorar a palatabilidade e 2% de própolis bruta em pó, em
38 relação ao consumo diário estimado por indivíduo, ou seja, 0,8 gramas de própolis por
39 animal uma vez por semana. A administração da própolis bruta na alimentação de
40 *Callithrix jacchus* auxiliou no ganho de peso de machos e fêmeas antes da reprodução
41 além de ter colaborado na manutenção do peso do tratado durante o período gestacional.

42

43 **PALAVRAS-CHAVE:** Calitriquídeos; peso; apiterápicos; bem estar.

44

45

46 **ABSTRACT:** The species *Callithrix jacchus* has been used as an experimental model in
47 several research studies involving pharmacology, behaviour and nutrition. Due to its
48 small body size and adaptability to captivity, this species is often used as a biological
49 model. It is therefore indispensable that adequate nutritional support is provided to
50 ensure improved reproduction and well-being of animals in research and/or conservation
51 centers. Propolis has been shown to improve the immune response, digestive disorders
52 and feed conversion in animals. The goal of this study was to evaluate the effect of
53 propolis on the weight maintenance of twelve couples of marmosets (*Callithrix jacchus*)
54 kept in captivity before and after mating. Twelve adult pairs were kept in natural
55 conditions of temperature, humidity and light-dark cycle. There were a pre-experimental
56 period of acclimation and the use of operational conditioning with positive
57 reinforcement for weighing. The control group received only routine diet, and the
58 treatment group received a routine diet added of a measuring spoon of “petit Suisse”
59 cheese (Danoninho®) to improve the palatability, and 2% of brute propolis powder, in

60 relation to the daily consumption estimated by individual once per week. The
61 administration of brute propolis in the feed of *Callithrix jacchus* helped males and
62 females gain weight before reproduction and helped to maintain the weight of the
63 treatment group (compared to control group) during the gestational period of the females.

64 **KEY-WORDS:** Calitriquídeos, weight, apiterapico, welfare

65

66 INTRODUÇÃO

67

68 O uso de *Callithrix jacchus* como modelo experimental na área biomédica iniciou
69 na década de 60, e importantes questões foram respondidas no campo da imunologia
70 (GEOGOZIAN, 1969), teratologia (POSWILLO et al., 1973), comportamento cognitivo e
71 perceptivo, estudos neuroendocrinológicos (TARDIF e JAQUISH, 1997) e
72 sociobiológicos; nesta última área, particularmente relacionados às estratégias
73 reprodutivas de machos e fêmeas desta espécie no ambiente de cativeiro (SOUSA et al,
74 2005; SILVA e SOUSA, 1997; SALTZMAN et al., 1996; ALENCAR et al.,
75 1995; ABBOT, 1984) e campo (ARRUDA et al., 2005). Devido ao seu pequeno porte, que
76 implica em baixo custo de manutenção e por sua alta adaptabilidade em cativeiro esta
77 espécie se tornou modelo experimental em pesquisas que avaliam aspectos relacionados
78 ao desenvolvimento de doenças e aos parâmetros fisiológicos (CLARKE, 1994) além de
79 serem utilizados também nas áreas de nutrição, farmacologia, toxicologia e em estudos
80 envolvendo estresse (ABBOT et al., 2003).

81 Por ser uma espécie frequentemente utilizada como modelo biológico para
82 diversos tipos de pesquisa é imprescindível o oferecimento de uma alimentação
83 balanceada, suprimindo desta forma a necessidade nutricional dos animais, assim
84 possibilitando melhor resposta imunológica e conseqüentemente a obtenção de uma
85 colônia mais saudável.

86 Entretanto, o desconhecimento das necessidades nutricionais dos animais
87 silvestres, seu comportamento alimentar e seletividade dos alimentos em cativeiro, o
88 emprego isolado de informações de hábitos alimentares em vida livre no estabelecimento
89 das dietas e a falta de informações a respeito da composição química e digestibilidade dos
90 alimentos oferecidos são os principais fatores envolvidos com a desnutrição desses
91 animais. Portanto alimentar adequadamente animais silvestres em cativeiro é um desafio
92 para os nutricionistas e pesquisadores (ULLREY et al., 1991).

93 Sabe-se que existe uma relação dinâmica entre doença, nutrição e imunidade. Uma
94 doença primária leva ao aumento do catabolismo e das necessidades nutricionais, estado
95 denominado hipercatabolismo. Esta condição vem, entretanto, frequentemente
96 acompanhada por anorexia (ALLISON, 2000).

97 Segundo ALLISON (2000), a desnutrição de um animal é definida como o estado
98 de deficiência de energia, proteína ou outro nutriente específico, que acarreta em uma
99 alteração mensurável na função corporal e que está associada à piora de doenças, podendo
100 ser revertida com suporte nutricional adequado. Neste sentido, tornam-se necessárias mais
101 pesquisas sobre substâncias que possam ser adicionadas à alimentação em cativeiro a fim
102 de suprir as necessidades nutricionais destes animais.

103 Nas últimas décadas houve um aumento do interesse dos pesquisadores em relação
104 à própolis, fato este devido as suas diversas propriedades biológicas e terapêuticas, como
105 imunomoduladora, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória(SFORCIN, 2007;
106 ORSI et al., 2006).

107 A própolis é produzida e elaborada pelas abelhas a partir de secreções de árvores,
108 flores e folhas e que recebe ainda a adição de substâncias secretadas pelo metabolismo
109 glandular das abelhas (BURDOCK, 1998),atuando principalmente no controle de
110 processo infecciosos, conseqüentemente melhorando a resposta imunológica, as
111 desordens digestivas e a conversão alimentar (COELHO et al.,2010). Sendo assim, este
112 apiterápico poderia ser utilizado proporcionando suporte fisiológico adequado
113 melhorando o bem estar em cativeiro.

114

115 **OBJETIVOS**

116

117 O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição da própolis bruta na
118 dieta de animais da espécie *Callithrix jacchus* mantidos em cativeiro, sobre o ganho de
119 peso antes e durante o período gestacional.

120

121 **MATERIAL E MÉTODOS**

122

123 **LOCAL DE ESTUDO**

124

125 O presente estudo foi conduzido no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais
126 Silvestres (CEMPAS) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da

127 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, campus de Botucatu
128 – SP - Brasil, 22°53`09” latitude sul e 48°26`42” longitude oeste com temperatura media
129 anual de 22°C.

130

131 ANIMAIS UTILIZADOS

132

133 Foram utilizados 12 casais adultos da espécie *Callitrix jacchus*. Os animais
134 foram alojados em gaiolas medindo 60 cm de altura x 120 cm de largura x 60 cm de
135 profundidade. Os animais foram mantidos em condições naturais de temperatura,
136 umidade e ciclo claro-escuro. Foram oferecidas duas refeições diárias compostas de
137 frutas, legumes e ovos pela manhã e uma papa protéica à tarde (ração triturada ALCON[®]
138 acrescida de banana, mel e sustentagem[®])oferecendo-se como complemento larvas de
139 tenébrios (*Tenebrio molitor*) uma vez por semana.

140

141 PRÓPOLIS UTILIZADA

142

143 A Própolis utilizada foi produzida por abelhas *Apis mellifera L.* adquirida em pó
144 da empresa comercial (Natural[®]) e estocada em freezer à -4°C até o momento da
145 administração. Para se calcular a porcentagem de própolis a ser acrescida na dieta dos
146 animais, foi feita uma estimativa do consumo de alimento diário por animal, uma vez que
147 não foram encontrados relatos na literatura sobre a quantidade de alimento consumido.
148 Para isto, foram realizadas observações prévias, em que o alimento foi pesado antes de ser
149 oferecido, bem como as sobras deixadas na gaiola. Sendo assim foi tomado como base o
150 consumo médio de 40 gramas/ animal/dia.

151

152 TRATAMENTOS

153

154 Em uma primeira etapa experimental com duração de quatro meses, machos e
155 fêmeas foram mantidos separados.

156 Durante essa etapa não houve a administração da própolis durante os dois
157 primeiros meses (momento 1), sendo o apiterápico oferecido nos dois meses restantes
158 (momento 2).

159 Foi oferecida 2% da própolis bruta em pó, em relação ao consumo diário
160 estipulado por animal; ou seja 0,8g de própolis juntamente à uma colher medida de queijo

161 petit suisse (Danoninho[®]) para melhorar a palatabilidade uma vez por semana. A dieta
162 de rotina dos animais foi oferecida normalmente durante esses quatro meses de
163 experimento.

164 Na segunda etapa experimental os casais foram agrupados e seguiu-se então o
165 período gestacional das fêmeas. A figura 2 reflete as médias das mensurações durante os
166 quatro meses gestacionais (P1, P2, P3 e P4). Nesta etapa os animais foram separados em
167 dois grupos: Grupo tratamento (GT) composto de 12 animais adultos (seis machos e seis
168 fêmeas) e Grupo controle (GC) composto também de 12 animais (seis machos e seis
169 fêmeas) sem a adição da própolis na dieta. A água foi servida *ad libitum*.

170 A própolis foi oferecida durante quatro meses de gestação.

171

172 PESO

173

174 Os animais foram condicionados à pesagem durante seis meses através do
175 condicionamento com reforço positivo. As pesagens foram realizadas em balança
176 analítica de quatro dígitos uma vez por mês durante os oito meses de experimento.

177

178 NOTA ÉTICA

179

180 O experimento realizado teve a autorização da Comissão de Ética no Uso de animais
181 (CEUA) da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho-Botucatu-SP-Brasil, autorização
182 número 126/2010.

183

184

185 ANÁLISE ESTATÍSTICA

186

187 O modelo de medidas repetidas foi utilizado para comparar as médias de peso dos
188 animais entre os momentos, sexos e tratamentos.

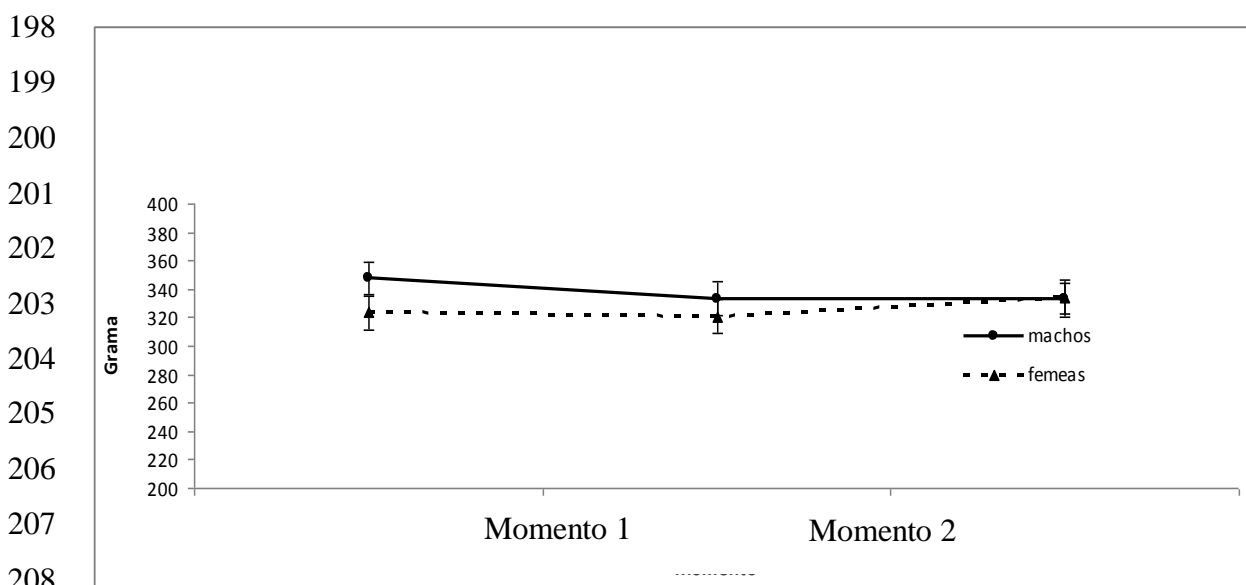
189

190 **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

191

192 Em relação à primeira etapa experimental (momento M1), antes da administração
193 do apiterápico foi observado uma redução no peso dos machos (de $351,0 \pm 53,2$ para
194 $330,0 \pm 48,8$) e manutenção no peso das fêmeas (de $319,50 \pm 50,1$ para $320,0 \pm 38,4$).

195 Após a administração da própolis (momento M2) foi verificado uma recuperação gradual
196 no peso dos machos ($342,0 \pm 55,2$) e um aumento no peso das fêmeas ($338,0 \pm 46,2$)
197 mesmo que de forma não significativa (Figura 1).



209 .

210 Figura 1: Peso dos saguis (g) machos e fêmeas separados entre os momentos ($p=0,67$)

211

212

213 Na segunda etapa experimental foi observado aumento de peso homogêneo do
214 grupo tratado enquanto que no grupo controle durante o momento P3 referente ao terceiro
215 mês de gestação foi verificado uma redução acentuada do peso dos animais (Figura 2 e
216 tabela 1). Segundo FERRAZ (2008), em seu estudo em relação ao efeito da própolis
217 produzida em Botucatu - São Paulo - Brasil na manutenção do peso de saguis submetidos
218 ao estresse, a autora observou que os animais que receberam 2% do apiterápico tiveram
219 um aumento significativo de peso em relação ao grupo que recebeu 5% e em relação ao
220 grupo controle que não recebeu a substância, sugerindo um possível efeito da própolis no
221 incremento do peso dos animais. Lui *et al.* (2007) verificaram que coelhas tratadas com o
222 apiterápico obtiveram aumento de peso quando comparadas com os animais do grupo
223 controle.

224

225

226

227

228

229 Após o agrupamento dos casais, as fêmeas ficaram prenhes no mesmo período
 230 pois os nascimentos ocorreram em intervalos próximos. Durante esta etapa experimental
 231 foi observada uma tendência estatística ($p=0,056$)

232

233

234

235

236

237

238

239

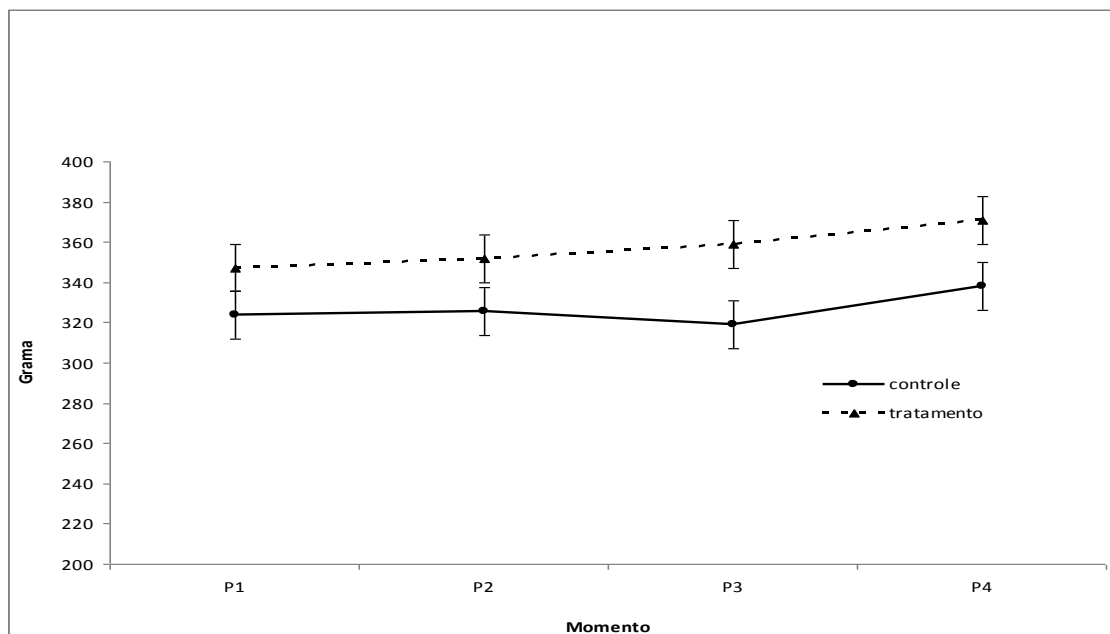
240

241

242

243

244



245

246 Figura 2: Peso entre os grupos controle e tratado após o agrupamento dos casais de saguis.

247

248

249

250

251 Tabela 1: Médias e Desvios Padrões do peso (g) entre os grupos de saguis durante os meses
 252 gestacionais.

Agrupamento	1 mês de gestação	2 meses de gestação	3 meses de gestação
Grupo Tratado	347.3 ± 31.8	351.8 ± 30.5	371.0 ± 24.3
Grupo Controle	324.1 ± 42	325.6 ± 42.8	338.2 ± 50.3

253

254

255 Sanchez e Galardi (1989) observaram que leitões tratados com própolis tiveram
256 um maior ganho de peso, resultado de uma ação estimulante do apiterápico sobre o
257 apetite dos animais, como consequência de uma melhora na resposta imunológica dos
258 mesmos após o consumo.

259 Prado (2005) verificou aumento de 25,5% na digestibilidade *in vitro* da matéria
260 seca de rações com 100% de volumoso quando utilizou o produto.

261 Sendo o cativeiro por si só é um fator limitante ao animal, algumas espécies não
262 conseguem adaptar-se à vida cativa, desenvolvendo a chamada síndrome da má
263 adaptação, onde os animais iniciam um processo de anorexia.

264 Uma das dificuldades em se estabelecer as necessidades nutricionais dos símios
265 reside no fato das mesmas serem dinâmicas, sendo afetadas não apenas pela espécie
266 animal, mas também pela idade, sexo, status reprodutivo, condição de saúde,
267 características ambientais, dentre outros. Os resultados deste estudo sugeriram que o
268 apiterápico auxiliou no ganho de peso dos animais podendo ser utilizado como uma
269 importante ferramenta nutricional para primatas mantidos em cativeiro. Buhatel et al.
270 (1983) utilizando a própolis em rações de frangos de corte atestaram a melhora do ganho
271 de peso diário das aves quando comparado aos animais que não receberam própolis,
272 esses autores concluíram ainda que a própolis preveniu desordens digestivas e
273 proporcionou melhor conversão alimentar.

274

275

276 **CONCLUSÕES**

277

278 A administração da própolis bruta na alimentação de *Callithrix jacchus* auxiliou
279 no ganho de peso de machos e fêmeas antes do período gestacional além de ter
280 colaborado na manutenção do peso do Grupo Tratado durante a gestação das fêmeas,
281 sugerindo desta forma uma melhor conversão alimentar.

282

283 **AGRADECIMENTOS**

284

285 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro
286 dado a esse projeto de Pesquisa (2009/52654-9; 2010/51926-2).

287

288

289 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

290

291 ABBOT, D. H.; BARNETT, D. K.; COLMAN, R. J.; YAMAMATO, M. E.; SCHULTZ-
292 DARKEN, N. J. Aspects of common marmoset basic biology and life history important
293 for biomedical research. **Comparative Medicine**, v.53, n. 3, p. 339-350, 2003.

294

295 ABBOT, D. H. Behavioral and physiological suppression of fertility subordinate
296 marmosets monkeys. **American Journal Primatology**. v. 6, n.3, p. 169-186, 1984.

297

298 ALENCAR, A. I.; YAMAMOTO, M. E.; OLIVEIRA, M. S.; LOPES, F. A.; SOUSA, M.
299 B.C.; SILVA, N. G. Behavior and progesterone levels in *Callithrix jacchus* females.
300 **Brazilian journal Medicine Biology Research**. v.28, p.631-645, 1995.

301

302 ALLISON, S.P. Malnutrition, disease and outcome. **Nutrition**, v. 16, n.1, p. 590-593,
303 2000.

304

305 ARRUDA, M. F.; ARAÚJO, A.; SOUSA, M. B. C.; ALBUQUERQUE, F. S.;
306 ALBUQUERQUE, A. C. S. R.; YAMAMOTO, M. E. Two-breding females within free-
307 living groups may not always indicate polygyny: Alternative subordinate female strategies
308 in common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Folia Primatologica**. v.76, p.10-20, 2005.

309

310 BUHATEL, T.; VESA, S.; DIMITRIN, A.; MOLDOVAN, I. Contributii la cunoasterca
311 actiunii biostimulatoare a propolisului asupra tincretului porcini si aviar. **Bulgary Institute**
312 **Agronomy**, v.37, n. 45, p.48, 1983.

313

314 BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis
315 (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n. 4, p.347-63, 1998.

316

317 CLARKE, J. M. The common marmoset *Callithrix jacchus*. **Anzccart News**, v.7, p. 1-8,
318 1994.

319

320 COELHO, M. S.; SILVA, J. H. V.; OLIVEIRA, E. R. A. A; SILVA, N. V.; LIMA, R. M.
321 B. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Archivos Zootecnia**, v.59, p.96,
322 2010.

- 323
- 324 FERRAZ, M. C. **Própolis na dieta de primatas(*Callithrix SP*) submetidos ao estresse e**
325 **mantidos em cativeiro.** 73f. 2008. Dissertação apresentada ao programa de Pós-
326 Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
327 Botucatu-SP. 73p., 2008.
- 328
- 329 GEOGOZIAN, N. Marmosets: Their potential in experimental medicine. *Animals N. Y.*
330 **Academic of Science**, v. 162, p. 336-362, 1969.
- 331
- 332 LUI, J. F., COLONY, R. D., SANTOS, E. Extrato etanólico de própolis sobre o ganho de
333 peso, parâmetros de carcaça e PH cecal de coelhos em crescimento. **Biotemas**, v. 20, n. 2,
334 59-64, 2007.
- 335
- 336 ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; FERNANDES JR., A.; BANKOVA, V.
337 Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella Thypi. **Brazilian Journal**
338 **Microbiology**, v.37, n. 2, p.108-112, 2006.
- 339
- 340 POSWILLO, D. E.; HAMILTON, W. J.; SOPHER, D. The marmosets as an animal model
341 for teratological research. **Nature**, v. 239, p. 460-462, 1973.
- 342
- 343 PRADO, O. P. P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS).**
344 78f.2005. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal –
345 Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 78f, 2005.
- 346
- 347 SALTZMAN, W.; SCHULTZ-DARKEN, N. J.; ABBOTT, D. H. Behavioral and
348 endocrine predictors of dominance and tolerance in female common marmosets, *Callitrix*
349 *jacchus*. **Animal Behavior**, v.51, p.657-674, 1996.
- 350
- 351 SANCHEZ, M.; GALARDI, R. **Influencia del propoleo en la conversión de lechones**
352 **destetados.** In: ASIS, M. Investigaciones cubanas sobre el propoleo: Memorias del 1o
353 Simposio sobre los efectos del propoleo en la salud humana y animal, 1988. Varadero.
354 Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, p. 211-214,
355 1989.
- 356

357 SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of**
358 **Ethnopharmacology**, v.113, n. 1, p.1-14, 2007.

359

360 SILVA, H. P.; SOUSA, N. B. C. T. The pair-bond formation and its role in the stimulation
361 of reproductive function in female common marmosets, *Callithrix jacchus*. **International**
362 **Journal of Primatology**, v.18, n. 1, p.389-400, 1997.

363

364 SOUSA, M. B. C.; ALBUQUERQUE, A. C. S. R.; ALBUQUERQUE, F. S.; ARAÚJO,
365 A.; YAMAMOTO, M. E.; ARRUDA, M. F. Behavioral strategies and hormonal profile of
366 dominant and subordinate common marmoset (*Callithrix jacchus*) females in wild
367 monogamous groups. **American Journal of Primatology**, v.67, n. 1, p.37-50, 2005.

368

369 TARDIFF, S. D.; JAQUISH, C. E. Number of ovulation in the marmoset monkeys
370 (*Callithrix jacchus*): Relation to body weight, age, repeatability. **American journal**
371 **Primatology**, v. 42, n.4, p. 323-329, 1997.

372

373 ULLREY, D. E.; ALLEN, M. E.; BAER, D. J. Formulated diets versus seed mixtures for
374 psittacines. **Journal of Nutrition**, v. 121, n. 3, p. 193-S205, 1991.

375

376

CAPÍTULO 7

1 **MAL FORMAÇÃO FETAL EM SAGUI COMUM (*Callithrix jacchus*)**

2
3 **FETAL BAD FORMATION IN COMMON MARMOSET (*Callithrix jacchus*)**

4
5 Myrna Campos Ferraz¹; André Vicente Ruiz de Matos²; Nereu Carlos Prestes³; João Carlos
6 Pinheiro Ferreira⁴; Lygia Carla Francelino⁵; Flavia da Silva Cunha⁶; Eunice Oba⁷

7
8 1)-Myrna Campos Ferraz-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ –
9 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil.

10 E-mail: [dra_myrnacampos@yahoo.com.br/](mailto:dra_myrnacampos@yahoo.com.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 2)-André

11 Vicente Ruiz de Matos-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ –
12 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil.

13 E-mail: [parmeso_xl@yahoo.com.br/](mailto:parmeso_xl@yahoo.com.br) Fone: (5514) 3880-2110 /Fax: (5514) 3880-2042; 3)-

14 Nereu Carlos Prestes-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FMVZ- Universidade
15 Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail:

16 [nereu@fmvz.unesp.br/](mailto:nereu@fmvz.unesp.br)Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119.4) João Carlos Pinheiro Ferreira-

17 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista
18 “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail:

19 [jcferreira@fmvz.unesp.br/](mailto:jcferreira@fmvz.unesp.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 5)-Lygia Carla Francelino-

20 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual Paulista
21 “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail:

22 [lygia.francelino@hotmail.com/](mailto:lygia.francelino@hotmail.com) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119; 6) Flavia da Silva

23 Cunha- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – Universidade Estadual
24 Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP – Brasil. E-mail: Fone/Fax:

25 (5514) (14) 3880-2119; 7) Eunice Oba- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-

26 FMVZ- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP - Botucatu - SP
27 – Brasil E-mail: [euniceoba@fmvz.unesp.br/](mailto:euniceoba@fmvz.unesp.br) Fone/Fax: (5514) (14) 3880-2119.

28
29 * **Trabalho a ser enviado para a Revista American Association for Laboratory Animal**
30 **Science**

1 RESUMO: O *Callithrix jacchus* é um primata neotropical de fácil adaptação em cativeiro.
2 As colônias podem ser facilmente estabelecidas em um curto espaço de tempo e a um custo
3 baixo comparado a outras espécies de primatas maiores, que são normalmente utilizados
4 em laboratório. Por serem filogeneticamente semelhantes aos seres humanos em situações
5 que induzem à ansiedade estes pequenos primatas estão sendo cada vez mais utilizados em
6 pesquisas que envolvam a resposta ao estresse. Animais silvestres em cativeiro estão
7 submetidos a uma série de eventos estressores que dependendo da sua duração e
8 intensidade podem modificar a homeostase orgânica. Observamos nesse estudo, graves
9 problemas ocorridos com a formação fetal nas proles de *Callithrix jacchus* mantidos em
10 ambiente com alto grau de estresse.

11

12

13 ABSTRACT: *Callithrix jacchus* is a neotropical primate adaptable in captivity. Colonies
14 can be easily established in a short time and at low cost compared to other species of adults
15 primates, which are normally used in the laboratory. Because they are phylogenetically
16 similar to humans in situations that induce anxiety, these small primates are increasingly
17 being used in research involving the stress response. Wild animals in captivity are subjected
18 to a series of stressful events that depending on the duration and intensity can modify the
19 organic homeostasis. Observed in this study, serious problems occurred with the formation
20 in fetal offspring of *Callithrix jacchus* kept in an environment with a high degree of stress.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1 INTRODUÇÃO

2

3 A espécie *Callithrix jacchus* é de distribuição natural do nordeste brasileiro.^{8,12}

4 Representantes do gênero *Callithrix* vivem em grupos com alto grau de parentesco,
5 contendo, normalmente, uma única fêmea reprodutora.¹²

6 Por serem filogeneticamente semelhantes aos seres humanos em situações que
7 induzem à ansiedade estes pequenos primatas estão sendo cada vez mais utilizados em
8 pesquisas que envolvam a resposta ao estresse¹. O tempo médio de duração da gestação é
9 de 144 dias⁵. O número alto de filhotes nos calitriquídeos pode provocar problemas para as
10 fêmeas, pois o peso destes pode ultrapassar 10% do peso corporal da mãe⁴.

11 O *Callithrix jacchus* se adapta bem em cativeiro, ao manejo e aos procedimentos
12 experimentais, ainda mais se um sistema de recompensa for oferecido. Colônias em
13 cativeiro podem ser facilmente estabelecidas em um curto espaço de tempo e a um custo
14 baixo comparado a outras espécies de primatas maiores, que são normalmente utilizados
15 em laboratório⁶.

16 No entanto sabe-se que animais em cativeiro são habitualmente submetidos à
17 situações estressantes e durante a gravidez o corpo da mãe passa por muitas mudanças
18 físicas e químicas, incluindo a produção alterada de certos hormônios. Os níveis de cortisol
19 são tipicamente encontrados mais altos em mulheres grávidas.⁹ Tal elevação do cortisol é
20 essencial para o crescimento do embrião. Entretanto, excessiva elevação dos níveis de
21 cortisol pode modificar permanentemente o crescimento do feto.¹¹

22

23

1 **OBJETIVO**

2 O Objetivo do presente trabalho foi relatar a ocorrência de mal formação fetal em
3 saguis da espécie *Callithrix jacchus*.

4

5 **RELATO DE CASO**

6

7 Os relatos que se seguem ocorreram com sete fêmeas de sagui comum (*Callithrix*
8 *jacchus*) presentes em uma colônia do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais
9 Silvestres (CEMPAS) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da
10 Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP, campus de Botucatu – SP
11 - Brasil, 22°53'09” latitude sul e 48°26'42” longitude oeste com temperatura media anual
12 de 22°C.

13 Estes animais participavam de um experimento de monitoramento não invasivo da
14 função reprodutiva de fêmeas e machos de *Callithrix jacchus*. O experimento não tinha
15 como objetivo causar danos à saúde dos animais. No entanto o estresse de cativeiro, como a
16 presença de predadores ao lado do recinto dos animais, frio intenso e sons podem ter
17 desencadeado os problemas ocorridos durante a pesquisa. O experimento foi conduzido no
18 período entre julho de 2010 e dezembro de 2011, sobre o protocolo da comissão de ética N°
19 126/2010.

20 Foi tomada a precaução de evitar cruzamentos consanguíneos, assim agrupamos
21 machos e fêmeas provenientes de dois locais distintos (Parque Ecológico do Tietê-
22 Guarulhos - SP. e Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros – Sorocaba - SP).

1 As fêmeas tiveram seu período gestacional de julho a dezembro de 2011. Dessas,
2 três fêmeas parturientes foram levadas ao ambulatório da área de reprodução animal com o
3 seguinte histórico:

4

5 •Fêmea 1: iniciou as contrações as 10:30 horas do dia 26/11/2011. Procedeu-se a remoção
6 manual de um feto insinuado aguardando-se até o dia 27/11/2011 na expectativa que outro
7 feto fosse expulso naturalmente.

8 •Fêmea 2: as contrações iniciaram as 7:00 horas do dia 13/12/2011, porem como os
9 nascimentos ocorrem rapidamente neste espécie e após três horas ela não havia expulsado
10 nenhum filhote e tendo sido constatado a morte fetal optou-se pela cesariana realizada as
11 11:00 horas do mesmo dia.

12 •Fêmea 3: atonia uterina. Cesariana realizada no dia 21/12/2011 pela manhã. A fêmea
13 alimentou-se bem no dia anterior, mas no dia 21 apresentou apatia e anorexia.

14 Após o exame radiográfico (Figura 1), exame físico e ultrassonográfico e em que
15 ficou constada a morte dos fetos e seu tamanho relativo grande com relação ao porte
16 materno, os animais foram preparados para a cesariana sob protocolo anestésico
17 compatível¹⁰ (Figura 2).

18 Após a pré-oxigenação, foi realizada a indução anestésica através da câmara de
19 indução com isoflurano (4 vol %) diluído em O₂ ,100%. Após adequado relaxamento
20 muscular e decúbito, os animais foram retirados da caixa e a indução foi complementada
21 com isoflurano administrado através de máscara facial. A intubação orotraqueal foi
22 realizada com cateter 14G após a perda dos reflexos palpebral, interdigital e laringo-
23 traqueal. Lidocaína a 2% foi administrada topicamente na laringe para facilitar a intubação.

1 Também foi confeccionado um circuito anestésico adequado ao tamanho reduzido dos
2 animais, para que não ocorra reinalação de CO₂, bem como adequada manutenção da via
3 aérea durante o procedimento anestésico, possibilitando inclusive a ventilação. A
4 manutenção anestésica foi realizada com isoflurano (0,5-2,5 vol %) diluído e O₂ 100% e a
5 analgesia trans-operatória foi realizada através da administração de morfina ou metadona,
6 na dose de 0,1 mg/kg por via intramuscular. A fluidoterapia foi realizada com solução
7 Ringer com lactato administrado através de bomba de infusão na taxa de 5 ml/kg/h. Os
8 saguis foram monitorados através do eletrocardiograma, Doppler e capnografia.
9 Normotermia foi mantida através da utilização do insuflador de ar quente durante todo o
10 procedimento. Ao fim do procedimento cirúrgico, a administração de anestésico foi
11 descontinuada e o cateter orotraqueal foi retirado após o retorno dos reflexos protetores,
12 ocorrendo a recuperação tranquila e sem intercorrências. Meloxicam foi administrado na
13 dose de 0,1 mg/kg, IM, como analgésico pós operatório¹⁰.



1

2

3

4

5

Figura 1: Imagem radiográfica de abdômen de fêmea de *Callithrix jacchus* submetida a parto cesariana.



6

7

8

Figura 2: Cesariana em *Callithrix jacchus*.

1 DISCUSSÃO

2 Das sete fêmeas parturientes, três tiveram partos cesariana e quatro tiveram partos
 3 normais, sendo que entre os partos normais apenas dois filhotes de um casal sobreviveram.
 4 Os peso das fêmeas levadas para a realização das cesarianas e a biometria das suas
 5 respectivas proles encontram-se descritos na Tabela 1. O peso das fêmeas de *Callithrix*
 6 *jacchus* e a biometria dos natimortos nascidos de parto normal estão descrita na Tabela 2.

7

Fêmea	Nº de Fetos	Peso das mães	Peso dos fetos	Sexo dos fetos	Comprimento fetal	Comprimento das caudas dos fetos	Diâmetro cranial dos fetos
1	2	264 g	34.4 g	F	15 cm	10 cm	9 cm
			36.1 g*	M	15 cm	10 cm	9 cm
2	2	338 g	34.0 g	F	13 cm	9 cm	9.5 cm
			32.0 g	M	11 cm	10 cm	9 cm
3	2	270 g	28 g	F	11 cm	9 cm	7 cm
			28 g	F	11 cm	8 cm	10 cm

8 Tabela 1: Peso das fêmeas de *Callithrix jacchus* levadas para a realização de parto cesariana
 9 e biometria das suas respectivas proles.

10

11

Fêmea	Nº de Fetos	Peso das mães	Peso dos fetos	Sexo dos fetos	Comprimento fetal	Comprimento das caudas dos fetos	Diâmetro cranial dos fetos
1	2	336 g	34.0g	M	14,5 cm	12,5 cm	9,5 cm
			34.4 g	M	14,5 cm	10,5 cm	10,5 cm
2	2	376 g	35.0 g	F	14 cm	10 cm	9.5 cm
			34.0 g	F	14 cm	11 cm	9 cm
3	2	254 g	26 g	F	12 cm	9 cm	7 cm
			27 g	F	11 cm	9 cm	8 cm

12 Tabela 2: Peso das fêmeas de *Callithrix jacchus* e biometria das suas respectivas crias
 13 nascidas de partos normais.

14

15

1 Os dez neonatos natimortos apresentaram mal formação cranial em especial fendas
2 palatinas (Figuras 3 e 4). O estresse altera os níveis de muitos hormônios e outras
3 moléculas encontradas no sangue, podendo acarretar modificações no feto.



4

5

Figura 3: Fetos de *Callithrix jacchus* apresentando mal formação



1
2 . .
3 .
4 .
5 .
6 .
7 .
8 .
9 .
10 .
11 .
12 .
Figura 4: Fetos de *Callithrix jacchus* apresentando mal formação.

O estresse pré-natal afeta em particular a placenta, diminuindo a função desse órgão por meio de uma redução dos níveis de nutrientes e oxigênio que alcançam o feto. O mecanismo desse efeito resulta em níveis elevados de adrenalina no sangue, os quais induzem o aumento da resistência vascular e a redução do fluxo de sangue para a placenta.²

Em uma colônia de *Callithrix jacchus* o estresse ambiental foi o principal fator para um grande número de abortos.⁷

Certas alterações morfológicas, bem como da fisiologia do útero ou ainda, distúrbios hormonais maternos podem conduzir a variações da embriogênese que culminam com o nascimento de criança portadora de fissura lábio palatina.⁸ As alterações

1 morfológicas estão associadas com a topografia do útero e com a situação do embrião na
 2 cavidade uterina. Estas circunstâncias podem acarretar modificações fisiológicas que, de
 3 certa forma, diminuem o fluxo sanguíneo. A consequente hipóxia tecidual agrava-se com o
 4 ritmo acelerado de desenvolvimento das estruturas embrionárias.³

5 O estado emocional da gestante é um fator de influência, especialmente se acontecer
 6 uma tensão emocional no primeiro trimestre da gravidez. O estresse provoca uma liberação
 7 de cortisona, substância dotada de efeito teratogênico.³

8 Durante todo o período gestacional das fêmeas foram realizadas anotações
 9 referentes aos possíveis agentes estressores; assim como foram feitas observações em
 10 relação ao comportamento dos animais. As observações sugeriam que nos dias em que
 11 ocorriam eventos estressores, o número de vocalizações de alarme, de andar arqueado e de
 12 tufos para trás aumentavam consideravelmente quando comparados aos dias em que tais
 13 eventos não ocorriam (Tabela 3).

14
 15 Tabela 3: Número médio de comportamentos relacionados à atitudes de alerta na presença e
 16 na ausência de agentes estressores em primatas da espécie *Callithrix jacchus*.

	PRESENÇA DE PREDADORES	SONS ESTRANHOS PESSOAS ESTRANHAS	CONTENÇÃO DE ANIMAIS VIZINHOS	SEM AGENTES ESTRESSORES
VOCALIZAÇÃO DE ALARME	1.750	1.400	1.700	1.203
ANDAR ARQUEADO	500	1.400	200	150
TUFOS PARA TRÁS	150	650	400	100

1 **CONCLUSÕES**

2

3 Devido a diferença no comportamento dos animais em dias em que não ocorriam
4 eventos estressantes e devido aos relatos descritos na literatura, sugerimos que a alta
5 incidência de natimortos apresentando mal formações pode estar relacionada com os altos
6 níveis de estresse impostos ao grupo.

7

8 **AGRADECIMENTOS**

9

10 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro
11 dado a esse trabalho (2009/52654-9; 2010/51926-2).

12

13 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

14

15 1- **Barros M, Tomaz C.** 2002. Non-human primate models for investigating fear and
16 anxiety. *Neurosci Biobehav* **26** : 187-201.

17

18 2- **Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S.** 2010. Prenatal stress and brain
19 development. *Brain Res Rev* **65** :56-79, 2010.

20

21 3- **Capelozza Filho L.** 1988. Conceitos vigentes na epidemiologia das fissuras lábio-
22 palatinas. *Rev Bras Cirur* **77** : 223-230.

23

- 1 4- **Eisenberg JF.** 1977. Comparative ecology and reproduction of New World monkeys.
2 In: Kleiman, D.G. The Biology and conservation of Callitrichidae. Washington, D.C.:
3 Smithsonian Institute Press, p. 39-71, 1977.
4
- 5 5- **French JA, Brewer KJ, Schaffner CM, Schalley J, Hightower-merritt D, Smith TE,**
6 **Bell SM.** 1996. Urinary steroid and gonadotropin excretion across the reproductive cycle in
7 female Wied's black tufted-ear marmosets (*Callithrix Kuhli*). Am J Primatol **40**: 231-245.
8
- 9 6- **Hearn NJ.** 1983. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) In: Journal of Zoology.
10 Reproduction in new world primates: new models in medical science. Lancaster: MTP
11 Press, p.181-215.
12
- 13 7- **Jhonson EO, Kamilares TC, Gold PW, Chrousos GP.** 1991. Environmental stress and
14 reproductive sucess in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Am J Primatol **25** : 191-
15 201.
16
- 17 8- **Modolin M, Cerqueira EM.** 1994. Etiopatogenia. In: ALTMANN, E. B. C. Fissuras
18 labiopalatinas. 3.ed. Carapicuíba: Pró-Fono departamento editorial cap. 2, pp.25-30.
19
- 20 9- **Ng PC.** 2011. Effect of stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fetus and
21 newborn. J Pediatr **158** : 3-41.
22

- 1 10- **Silva LS, Prestes NC, Ferreira JCP, Ferraz MC, Garofalo NA, Simões CRB.** 2012.
2 Cesariana em sagui (*Callithrix jacchus*): Relato de caso. Anais do II Simpósio de
3 Neonatologia Veterinária. UNESP – Botucatu, p.11.
4
- 5 11- **Seckl JR, Holmes MC.** 2007. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental
6 metabolism and fetal ‘programming’ of adult pathophysiology, *Natural Clinical Practice*
7 *Endocrinol Metab*3 : 479-88.
8
- 9 12- **Stevenson MF, Rylands AB.** 1988. The marmosets, genus *Callithrix* sp. 131-222. In:
10 *Ecology and Behavior of Neotropical Primates, Volume 2.* (R.A. Mittermeier, A.B.
11 Rylands, A.F. Coimbra-Filho & G.A.B. Fonseca, Eds.) World Wildlife Fund, Washington
12 D.C.
13
14
15
16
17
18
19

DISCUSSÃO GERAL

O estresse é bastante observado em animais selvagens em cativeiro (Pachaly et al. 1993), sendo assim é necessário que haja uma preocupação com a qualidade de vida das espécies durante o período de confinamento, havendo a necessidade de adotarmos alternativas para a melhoria de seu bem-estar (Costa e Pinto 2003; Laule 2003). Nesse sentido o condicionamento e as coletas de saliva, fezes e urina realizadas de forma não invasiva são ferramentas importantes que podem ser utilizadas nas pesquisas envolvendo animais selvagens.

No entanto a utilização dos ensaios para monitorar a função endócrina e adrenal através da mensuração de metabólitos de esteróides e glicocorticóides fecais pode não ser fidedigna, por isso é necessário proceder a validação fisiológica e laboratorial destas técnicas (Palme, 2005; Touma & Palme, 2005; Heistermann et al., 2004).

Os Calitriquídeos são utilizados em pesquisas que avaliam aspectos relacionados ao desenvolvimento de doenças e aos parâmetros fisiológicos (Clarke, 1994) além de serem modelos experimentais também nas áreas de nutrição, farmacologia, toxicologia e na área de estresse (Abbot et al., 2003). Jhonson et al. (1996), utilizando saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) em seu estudo, demonstraram que essa espécie apresenta diversas características que a tornaram um modelo para estudo de estresse social, dentre elas, a proximidade filogenética aos seres humanos e ao fato desta espécie exibir resposta fisiológica e comportamental semelhante aos humanos, em situações que induzem ansiedade (Barros & Tomaz, 2002).

As alterações hormonais relacionadas à reprodução de *Callithrix jacchus*, têm despertado o interesse de muitos pesquisadores. São comuns nessa área, estudos sobre as alterações hormonais que ocorrem durante a gravidez e pós-parto, bem como em contextos de disputa entre as fêmeas. Os eventos fisiológicos, endócrinos e comportamentais relacionados à reprodução durante o ciclo ovulatório, gravidez e lactação na espécie já foram estudados por diversos pesquisadores (HEARN, 1983; DIXSON e LUNN, 1987).

A espécie apresenta características reprodutivas singulares que a tornam um interessante modelo biológico para o estudo da foliculogênese. As fêmeas desta espécie apresentam ciclos ovulatórios contínuos durante todo o ano, não havendo sazonalidade reprodutiva e os estros pós parto podem ser observado após o nascimento dos filhotes (CHAMBERS e HEARN, 1979).

Neste estudo foi possível validar os ensaios relacionados aos metabólitos de estradiol e progesterona fecais permitindo dessa forma avaliar as concentrações desses hormônios antes, durante e após a gestação das fêmeas, dessa forma o trabalho corroborou para melhor entendimento da fisiologia reprodutiva desses animais.

O *Callithrix jacchus* se adapta bem em cativeiro, ao manejo e aos procedimentos experimentais, ainda mais se um sistema de recompensa for oferecido. Colônias em cativeiro podem ser facilmente estabelecidas em um curto espaço de tempo e a um custo baixo comparado a outras espécies de primatas maiores, que são normalmente utilizados em laboratório. No entanto sabe-se que animais em cativeiro são habitualmente submetidos a situações estressantes e que por esse motivo poderiam ocorrer baixas taxas

reprodutivas. Durante esse trabalho observamos alta mortalidade das proles além de problemas ocorridos na formação do fetos.

O estresse pré-natal afeta em particular a placenta, diminuindo a função desse órgão por meio de uma redução dos níveis de nutrientes e oxigênio que alcançam o feto. O mecanismo desse efeito resulta em níveis elevados de adrenalina no sangue, os quais induzem o aumento da resistência vascular e a redução do fluxo de sangue para a placenta. (CHARIL et al., 2010).

Em uma colônia de *Callithrix jacchus* o estresse ambiental foi o principal fator para um grande número de abortos (JHONSON et al., 1991).

Por ser uma espécie frequentemente utilizada como modelo biológico para diversos tipos de pesquisa é imprescindível o oferecimento de uma alimentação balanceada, suprimindo desta forma a necessidade nutricional dos animais, assim possibilitando melhor resposta imunológica e conseqüentemente a obtenção de uma colônia mais saudável.

Entretanto, o desconhecimento das necessidades nutricionais dos animais silvestres, seu comportamento alimentar e seletividade dos alimentos em cativeiro, o emprego isolado de informações de hábitos alimentares em vida livre no estabelecimento das dietas e a falta de informações a respeito da composição química e digestibilidade dos alimentos oferecidos são os principais fatores envolvidos com a desnutrição desses animais. Portanto alimentar adequadamente animais silvestres em cativeiro é um desafio para nutricionistas e pesquisadores (ULLREY et al., 1991). Sendo assim existe a necessidade de mais pesquisas sobre substâncias que possam ser acrescentadas na alimentação desses animais melhorando dessa forma sua nutrição.

Segundo os resultados deste trabalho, a própolis substância produzida e elaborada pelas abelhas a partir de secreções de árvores, flores e folhas e que recebe ainda a adição de substâncias secretadas pelo metabolismo glandular das abelhas (BURDOCK, 1998), atuando principalmente no controle de processo infecciosos, conseqüentemente melhorando a resposta imunológica, as desordens digestivas e a conversão alimentar (COELHO et al.,2010) auxiliou na manutenção e no ganho de peso dos saguis utilizados nesse estudo.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi possível colaborar com melhor entendimento sobre a fisiologia reprodutiva da espécie em estudo, assim também como obtivemos respostas importantes sobre fatores que podem ocasionar alterações nos resultados esperados quando realizamos estudos relacionados ao estresse. Existe necessidade de estrutura e manejo adequados para a realização de pesquisas que utilizem a espécie *Callithrix jacchus* como modelo biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, D. H.; BARNETT, D. K.; COLMAN, R. J.; YAMAMATO, M. E.; SCHULTZ-DARKEN, N. J. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. **Comparative Medicine**, v.53, n. 3, p. 339-350, 2003.

ANNIE, C.L.; GROER, M. Child birth stress: an immunologic study. **Journal of Obstetrics and Gynecology and Neonatal Nursing**, v.20, p.391-397, 1991.

ARRUDA, M.F.; ARAÚJO, A.; SOUSA, M.B.C.; ALBUQUERQUE, F.S.; ALBUQUERQUE, A.C.S.R.; YAMAMOTO, M.E. Two breeding females within free-living groups may not always indicate polygyny: alternative subordinate female strategies in common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Folia Primatologica**, v.76, p.10-20, 2005.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168p.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Própolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BARROS, M.; TOMAZ, C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. Neuroscience, **Biobehavior Review** v. 26, p. 187-201, 2002.

BOINSKY, S.; SWING, S.P.; GROSS, T.S.; DAVIS, J.K. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. **American Journal of Primatology**, v.48, p.49-68, 1999.

BOSCH, J.A.; RING, C.; DE GEUS, E.J.; VEERMAN, E.C.; AMEROGEN, A.V. Stress and secretory immunity. **International Review of Neurobiology**, v.52, p.213-253, 2002.

BRENNAN, F.X.; CHARNETSKI, C.J. Explanatory style and immunoglobulin A. **Integrative Physiological and Behavioral Science**, v.35, n.4, p.251-255, 2000.

BROOM, D.M.; JOHNSON, K.G. Assessing welfare: short term responses. In: BROOM, D.M.; JOHNSON, K.G. (Eds.). **Stress and animal welfare**. London: Chapman and Hall, 1993. p.87-144.

BROWN, J.W.S.; STEINMAIN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. Virginia: Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, 2004.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.347-363, 1998.

CARLSTEAD K,SHEPHERDSON,D. Effects of environmental enrichment on reproduction. **Zoo Biology**, v.13, p.447-458, 1994.

CARVER, J.F.A.; HAU, J. Development of a saliva sampling method and a rocket immunoelectrophoretic assay for quantification of salivary IgA in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **In Vivo**, v.14, p.735-739, 2000.

CASTRO, S.L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.34, n.3, p.49-83, 2001.

CASTRO, C.S.S.; ARAÚJO, A. Diet and feeding behavior of marmoset, *Callithrix jacchus*. **Brazilian Journal of Ecology**, v.10, n.2, p.16-21, 2006.

CATTARUZI, D.R. **Perfil analítico das progesterinas fecais nas fases de puberdade e ciclicidade ovariana em onça pintada (*Panthera onca*); gestação e lactação em gato Mourisco (*Puma yagouaroundi*)**. 2008. 74f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CHAMBERS, P.L.; HEARN, J.P. Peripheral plasma levels of progesterone, 17 β -estradiol, testosterone, androstenedione, chorionic gonadotrophin during pregnancy in marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction & Fertility**, v.56, p.23-32, 1979.

CHARIL, A.; LAPLANTE, D.P.; VAILLANCOURT, C.; KING, S. Prenatal stress and brain development. **Brain Research Review**, v. 65, p.56-79, 2010.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of stress response. **Annual Review of Physiology**, v.67, p.259-284, 2005.

CHINNADURAI, S.K. **Evaluation of fecal glucocorticóides metabolite assays for short-term stressors and validation for stress monitoring in African herbivores.** 2006. 59f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Missouri, Columbia, 2006.

CLASSEN, W. Behaviour, neurology and electrophysiology. In: KRINKE, G.J. (Ed.). **The laboratory rat: the handbook of experimental animals.** San Diego: Academic Press, 2000. p.419-435.

COE, J.C. Steering the ark toward Eden: design for animal well-being. **JAVMA**, v.223, p.977-980, 2003.

COELHO, M. S.; SILVA, J. H. V.; OLIVEIRA, E. R. A. A; SILVA, N. V.; LIMA, R. M. B. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Archivos Zootecnia**, v.59, p.96, 2010.

COSTA, M.J.R.P.; PINTO, A.A. Princípios de etologia aplicada ao bem-estar animal. In: DEL-CLARO K, PREZOTO F. **As distintas faces do comportamento animal.** Jundiaí: Sociedade Brasileira de Etologia, Livraria Conceito, 2003. p.211-223.

CZEKALA, N.M.; DURRANT, B.S.; CALLISON, L.; WILLIAMS, M.; MILLARDS, S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. **Zoo Biology**, v.13, p.119-128, 1994.

DHABHAR, F.S.; McEWEN, B.S. Acute stress enhances while chronic stress suppress cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leucocytes trafficking. **Brain, behavior and immunity**, v.11, p. 286-306, 1997.

DALLMAN, M.F.; MAKARA, G.B.; ROBERTS, J.L.; LEVIN, N.; BLUM, M. Corticotrope response to removal of releasing factors and corticosteroids in vivo. **Endocrinology**, v.117, p.2190-2197, 1985.

DANTZER, R. Animal welfare methodology and criteria. **Revue Scientifique et Technique**, v.13, p.291-302, 1994.

DANTZER, R.; MORMÉDE, P. Fisiopatología de la reacción a las agresiones. In: DANTZER, R. **El stress en la cría intensiva del ganado**. Zaragoza: Editorial Acríbia, 1984. p.41-86.

DATSON, N.A.; MORSINK, M.C.; ATANASOVA, S.; ARMSTRONG, V.W.; ZISCHLER, H.; SCHLUMBOHM, C.; DUTILH, B.; HUYNEN, A.; WAEGELE, B.; RUEPP, A.; KLOET, R.; FUCHS, E. Development of the first marmoset-specific DNA microarray (EUMAMA): a new genetic tool for large-scale expression profiling in a non-human primate. **BMC Genomics**, v.8, p.190, 2007.

DEINZER, R.; SCHULLER, N. Dynamics of stress related decrease of salivary immunoglobulin A (sIgA): relationship to symptoms of the common cold and studying behavior. **Behavioral Medicine**, v.23, p.161-169, 1998.

DIGBY, L.J.; FERRARI, S.F. Multiple breeding females in free-ranging groups of *Callithrix jacchus*. **International Journal of Primatology**, v.15, p.389-397, 1994.

DIXSON, A.F.; LUNN, S.F. Postpartum changes in hormones and sexual behavior in captive groups of marmosets (*Callithrix jacchus*). **Physiology Behavioral**, v.4, p. 577-583, 1987.

ERWIN, J.; SACKETT, G. Effects of management methods, social organization, and physical space on primate behavior and health. **American Journal of Primatology**, v.20, p.23-30, 1990.

FERRAZ, M.C. **Própolis na dieta de primatas (Callithrix SP) submetidos ao estresse e mantidos em cativeiro**. 2008. 73p. Dissertação (Mestrado) - Programam de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.

FLORENCE, B.D.; SVENDSEN, L.; STODULSKI, G.; CROWLEY, A.; HAU, J. Assessment of lacrimal IgA potential parameter for measurement of long term stress in poultry. **In Vivo**, v.9, p.19-26, 1999.

FOX, C.M.Z.; HARRINSON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment agains psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v.175, p.1-8, 2006.

FOWLER, M.E. Stress. In: Fowler ME (Ed.). **Zoo & wild animal medicine**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. p.33-35.

GARCIA, R.; SÁ, M.; LANGONI, H.; FUNARI, S. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* “in vitro” e em coelhos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.26, n.1, p.69-77, 2004.

GILCHRIST, R.B.; WICHEREK, M.; HEISTERMANN, M.; NAYUDU, P.L.; HODGES, J.K. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset. **Biology of Reproduction**, v.64, p.127-135, 2001.

GLEESON, M.; McDONALD, W.A.; CRIPPS, A.W.; PYNE, D.B.; CLANCY, R.L.; FRICKER, P.A.; WLODARCZYK, J.H. Exercise, stress and mucosal immunity in elite swimmers. In: MESTECKY, J. (Ed.). **Advances in mucosal immunology**. New York: Plenum Press, 1995. p.571-574.

GRAHAM, L.H.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A.A. Versatile enzyme immunoassay for the determination of progestagens in feces and serum. **Zoo Biology**, v.20, p.227-236, 2001.

GREEN, M.L.; GREEN, R.G.; SANTORO, W. Daily relaxation modifies serum and salivary immunoglobulins and psychophysiologic symptom severity. **Bio Feedback and Self Regulation**, v.13, p.187-199, 1988.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Order primates (Primates) - Reproduction. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. *Biology, medicine, and surgery of South American wild animals*. Iowa: Iowa State University Press, p. 274-278, 2001.

GUYTON, A. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.753-746.

HARDING, R.D.; HOLMES, M.J.; LUNN, S.F.; HENDERSON, C.; AITKEN, R.J. Plasma progesterone levels throughout the ovarian cycle of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Journal of Medical Primatology**, v.11, p.43-51, 1982.

HATTORI, W.T.A. Transferência de alimentos no cuidado à prole em *Callithrix jacchus* em ambiente natural. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

HEARN, J.P.; LUNN, S.F. The reproductive biology of the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. **Laboratory Animal Handbooks**, v.6, p.191-202, 1975.

HEARN, J. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) In: *Journal of Zoology. Reproduction in new world primates: new models in medical science*. Lancaster: MTP Press, 1983. p.181-215.

HEISTERMANN, M.; TARI, S.; HODGES, J.K. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in new world primates, Callitrichidae. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.99, p.243-251, 1993.

HEISTERMANN, M.; ADEMMER, C.H.R; KAUMANN, W. Ovarian cycle and effect of social changes on adrenal and ovarian function in *Pygathrix nemaeus*.

International Journal Primatology, v. 25, p. 689–708, 2004.

HONESS, P.; MARIN, C. Behavioural and physiological aspects of stress and aggression in nonhuman primates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.30, p.412, 2006.

JANOSIK, E.H.; DAVIES, J.L. Adaptional variations and disruptions. In: Janosik EH, Davies JL. **Mental health and psychiatric nursing**. 2.ed. Boston: Little Brown; 1996. p.581.

JHONSON, E.O.; KAMILARES, T.C.; GOLD, P.W.; CHROUSOS, G.P. Environmental stress and reproductive success in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **American Journal Primatology**, v.25, p. 191-201, 1991.

JOHNSON EO, KAMILARES TC, CARTER CS, CALOGERO AE, GOLD PW, CHROUSOS GP. The biobehavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). **Society of biological Psychosomatic**, v. 40, p. 317-337, 1996.

JOHANSSON, A. **Principles and practice of immunoassay**. New York: Macmillan, 1991. 300p.

KENDRICK, K.M.; DIXSON, A.F. Hyperprolactinaemia abolishes sensitivity of stria terminalis neurones to testosterone. **Journal of Endocrinology**, v.102, n.1, p.109-113, 1983.

KENT, S.; BLUTHÉ, R.M.; KELLY, K.W.; DANTZER, R. – Sickness Behavior Control on Lymphocyte Reactivity, Antibody Responses and Neuroendocrine Activation in Rats. **Physiol Bull.**, v. 11, p. 475-89, 1992.

KOHU, K.; YAMABE, E.; MATSUZAWA, A. Comparison of 30 immunity-related genes from the common marmoset with orthologues from human and mouse. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.215, p.167-180, 2008.

KRONFOL, Z.; REMICK, D.G.-Cytokines and the Brain: Implications for clinical psychiatry. **American Journal of Psychiatry.**, v. 157, p.683-94, 2000.

LASLEY, B.L.; KIRKPATRICK, J.F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.22, n.1, p.23-31, 1991.

LAULE, G.E. Positive reinforcement training and environmental enrichment: enhancing animal wellbeing. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, p.969-972, 2003.

MACPHAIL, R.C.; LEANDER, J.D. Chlordimeform effects on schedule-controlled behavior in rats. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v.3, p.19-26, 1981.

MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1996.

MASON, G.J. Stereotypies and suffering. **Behavioural Processes**, v.25, p.103-115, 1991.

McEWEN, B. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v.886, p.172-189, 2000.

McEWEN, B.; WINGFIELD, J. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behaviour**, v.43, p.2-15, 2003.

McLLAND, D.C.; ROSS, G.; PATEL, V. The effect of an academic examination on salivary norepinephrine and immunoglobulin levels. **Journal of Human Stress**, v.11, p.52-59, 1985.

MENDOZA, S.P. Sociophysiology of well-being in nonhuman primates. **Laboratory Animal Science**, v.41, n.4, p.344-349, 1991.

MILLER, A. H.; SPENCER, R.L.; PEARCE, B.D.; PISSEL, T.L.; AZRIELI, Y.; TANAPAT, P.; ODAY, H.; RHEE, R.; McWEN, B.S. Glucocorticoid receptors are

differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. **Cellular Immunology**, v. 186, p. 45-54, 1998.

MIRANDA, G.H.B. **Aspectos da ecologia e comportamento do mico-estrela (*Callithrix penicillata*) no cerrado e cerrado denso da Área de Proteção Ambiental (APA) do Gama e Cabeça-de-Veado/DF**. 1997. 97f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, 1997.

MISSIMA, F. **Efeito da própolis sobre parâmetros imunológicos de camundongos BALB/c submetidos a estresse crônico**. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

MOBERG, G.P. Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. (Eds.). **The biology of animal stress**. New York: CABI Publishing, 2000. p.1-21.

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

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in birds droppings: An analytical approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1046, p.1734, 2005.

MUNRO, C.J.; STABENFELDT, G.H.; CRAGUN, J.R.; ADDIEGO, L.A.; OVERSTREET, J.W.; LASLEY, B.L. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v.37, n.6, p.838-844, 1991.

NAKAGAWA, S.; MÖSTL, E.; WASS, J.R. Validation of an enzyme immunoassay to measure fecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): a non-invasive tool for estimating stress? **Polar Biology**, v.26, p.491-493, 2003.

NELSON, R. **An introduction to behavioral neuroendocrinology**. Michigan: Sinauer Associates, 2000.

NG, V.; KOH, D.; CHAN, G.; ONG, H.Y.; CHIA, S.E.; ONG, C.N.A. Salivary immunoglobulin A and lysozyme markers of stress among nurses? **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.41, p.920-927, 1999.

OLIVEIRA, C.A.; NOGUEIRA, G.P.; CASTRO, J.C.B. Avaliação reprodutiva pós-parto em Anta (*Tapirus terrestris*): relato de caso. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.38, p. 290-292, 2001.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FUNARI, S.R.C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JR., A. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **International Immunopharmacology**, v.5, n.2, p.359-368, 2005.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES JR., A.; BANKOVA, V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella Thypi. **Brazilian Journal Microbiology**, v.37, n.2, p.108-112, 2006.

ORSINI, H.; BONDAN, E.F. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas implicações no comportamento e bem estar animal – revisão da literatura. **Revista Instituto de Ciências e Saúde**, v.24, n1, p.7-13, 2006.

OVERSTREET, D.H. Pharmacological approaches to habituation of acoustic startle responses in rats. **Physiological Psychology**, v.5, p.230-238, 1977.

PACHALY, J.R.; WERNER, P.R.; SCHIMANSKI, J.C.; CIFFONI, E.M.G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. **A Hora Veterinaria**, v.13, n.74, p.47-52, 1993.

PADGETT, D.A & R. GLAZER. How stress influences the immune response. **TRENDS in immunology.**, v. 24, p. 444-448. 2003.

PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1046, p.75-80, 2005.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; FÁVARE, R.C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v.23, n.5, p.497-507, 2001.

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

PEARSON, E. Uenceof stress on secretory IgA: is it a possible stress marker in animals? **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v.25, p.19-24, 1998.

PEREZ, I. Influencia de las dosis parenteral de propoleo sobre la respuesta imune (RES), en conejos em 1989. In: SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1988. **Memórias...** Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, 1989. p.230-233.

PRASAD, S.; HUMPHREYS, I.; KIRETA, S.; GILCHRIST, R.B.; BARDY, P.; RUSS, G.R.; COATES, P.T.H. The common marmoset as a novel preclinical transplant model: identification of new MHC class II DRB alleles and prediction of in vitro alloreactivity. **Tissue Antigens**, v.69, p.72-75, 2007.

REGO, M.V. **Perfil hormonal anual de machos e fêmeas de saguis (*Callithrix jacchus*)**. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

ROUSH, R.S.; SNOWDON, C.T. Food transfer and development of feeding behavior and food-associated vocalizations in cotton-top tamarins. **Ethology**, v.107, p.415-429, 2001.

SAPOLSKY, R. Endocrinology of the stress-response. In: BECKER, J.B.; BREEDLOVE, S.M.; CREWS, D.E.; MCCARTHY, M.M. **Behavioral endocrinology**. 2.ed. Cambridge: The MIT Press, 2002. p.409-499.

SAPOLSKY, R.; ROMEO, R.D.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinology Review**, v.21, p.55-89, 2000.

SASAKI, E.; HANAZAWA, K.; KURITA, R.; AKATSUKA, A.; YOSHIZAKI, T.; ISHII, H.; TANIOKA, Y.; SUEMIZU, H.; SUGAWARA, A. Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). **Stem Cells**, v.23, p.1304-1313, 2005.

SALDANHA, D.M.; NASCIMENTO, H.G.; SOUSA, M.B.C. Monitoramento hormonal do par reprodutor de sagui comum (*Callithrix jacchus*) antes e após o nascimento dos filhotes. **Revista Publica**, v.1, n.1, p.32-41, 2005.

SELYE, H. **Stress: a tensão da vida**. 2.ed. São Paulo: Ibrasa; 1959.

SELYE, H. Syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v.138, p.169-188, 1939.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.1, p.1-14, 2007.

SGAI, M.G.F. **Avaliação da influencia das técnicas de enriquecimento ambiental nos parâmetros endócrinos e comportamentais de *Callithrix penicillata* (sagüi-de-tufos-pretos) mantidos em estabilidade social e isolados.** 2007. 109f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SHEPHERDSON, D.J. The role of environmental enrichment in captive breeding and reintroduction of endangered species. In: Mace G, Olney P, Feistner A. Creative conservation: interactive management of wild and captive animals. London: Chapman and Hall, 1994. p.167-177

SHIMIZU, K. Studies on reproductive endocrinology in non-human primates: application of non-invasive methods. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, n.1, p.1-13, 2005.

SHIMIZU, K.; DOUKE, C.; FUJITAS, S.; MATSUZAWA, T.; TOMONAGA, M.; TANAKA, M.; MATSUBAYASHI, K.; HAYASHI, M. Urinary steroids, FSH and CG measurements for monitoring the ovarian cycle and pregnancy in the chimpanzee. **Journal of Medical Primatology**, v.32, p.15-22, 2003.

SNOWDON, C.T.; PICKHARD, J.J. Family feuds: severe aggression among cooperatively breeding cotton-top tamarins. **International Journal of Primatology**, v.20, n.5, p.651-663, 1999.

SOUSA, M.B.C.; ZIEGLER, T.E. diurnal variation on the excretion of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. **American Journal of Primatology**, v.46, p.105-117, 1998.

SOUSA, M.B.C.; ALBUQUERQUE, A.C.S.R.; ALBUQUERQUE, F.S.; ARAÚJO, A.; YAMAMOTO, M.E.; ARRUDA, M.F. Behavioral strategies and hormonal profile of dominant and subordinate common marmoset (*Callithrix jacchus*) females in wild monogamous groups. **American Journal of Primatology**, v.67, p.37-50, 2005.

SOUSA M.B.C.; LEÃO, A.C.; SILVA, H.P.A. Sexual differences on behaviour and fecal cortisol using the separation paradigm in common marmoset, *Callithrix jacchus*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY, 19., 2002, Pequin. **Abstracts...** Pequin, 2002. p.94.

STEVENSON, M.F.; RYLANDS, A.B. The marmosets, genus *Callithrix*. In: MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; COIMBRA FILHO, A.; FONSECA, G.A.B. (Eds.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Contagem: Littera Maciel, 1988. p.131-222.

STONE, A.A.; COX, D.S.; VALDIMARSDOTTIR, H.; JANDORF, L.; NEALE, J.M. Evidence that secretory IgA antibody is associated with daily mood. **Journal of Personality and Social Psychology**, v.52, n.5, p.988-993, 1987.

SWANSON, L.W.; SIMMONS, T.I. Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat SO. **The Journal of Comparative Neurology**, v.4, n.285, p.413-435, 1989.

TARDIF, S.D.; CARSON, R.L.; GANGAWARE, B.L. Comparison of infant care in family groups of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). **American Journal of Primatology**, v.11, p.103-110, 1986.

TARDIF, S.D. Relative energetic cost of infant care in small-bodied neotropical primates and its relation to infant-care patterns. **American Journal of Primatology**, v.34, p.133-143, 1994.

TARDIF, S.D.; JAQUISH, C.E. Ovulation number in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): relation to body weight, age and repeatability. **American Journal of Primatology**, v.42, p.323-329, 1997.

TOUMA C, PALME R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. **Academic Science**, v. 1046, p. 54–74, 2005.

TSUJI, A.; MAEDA, M.; ARAKAWA, H. Chemiluminescent enzymatic assay for cholesterol in serum using lucigenin. **Analytical Sciences**, p.497, 1989.

ULLREY, D. E.; ALLEN, M. E.; BAER, D. J. Formulated diets versus seed mixtures for psittacines. **Journal of Nutrition**, v. 121, n. 3, p. 193-S205, 1991.

VALLE, R. **Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*)**. 2007. 169f. Tese (Doutorado) - Universidade São Paulo, São Paulo, 2007.

VERONA, C.E.S.; SOUZA, F.F.S.; TONIOLLO, G.H.; GARCIA, J.M.; ESPER, C.R. Colheita e avaliação do sêmen de Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.544-552, 2009.

VILELA, A.L.M. Sistema Endócrino (on line), in Anatomia e Fisiologia Humana, Internet, 2003 – **Disponível em <http://www.afh.bio.br/endocrino/endocrino3.asp>**

WASSER, S.K.; RISLER, L.; STEINER, R.A. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.39, p.862-872, 1988.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; BROWN, J.L.; COOPER, K.; CROCKETT, C.M.; BERCHERT, U.; MILLSAUGH, J.; LARSON, S.; MONFORT, S. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v.120, p.260-275, 2000.

WASSER, S.K.; HUNT, K.E.; CLARKE, C.M. Assessing stress and population genetics through noninvasive means. In: AGUIRRE, A.A.; OSTFELD, R.S.; TABOR, G.M.; HOUSE, C.; PEARL, M.C. (Eds.). **Conservation medicine: ecological health in practice**. Oxford University Press, 2002. p.130-144.

WHITTEN, P.L. Non-invasive methods for the study of stress, reproductive function, and aggression. **American Journal Physiology and Anthropology**, v.24, p.239, 1997.

WHITTEN, P.L.; STAVISKY, R.; AURELI, F.; RUSSEL, E. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v.44, p.57-69, 1998.

WIRZ, A.; RIVIELLO, M.C. Reproductive parameters of a captive colony of capuchin monkeys (*Cebus apella*) from 1984 to 2006. **Primates**, v.49, p.265-270, 2008.

ZECCHINI, A. Animais selvagens em cativeiro perdem suas características naturais. **A Hora Veterinária**, v.22, n.130, p.42-43, 2002.

ZIEGLER, T.E.; SCHEFFLER, G.; WITTWER, D.J.; SCHULTZ-DARKEN, N.; SNOWDON, C.T.; ABBOT, D.H. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, *saguinus oedipus* and *callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. **Biology Reproduction**, v.54, p.91-99, 1996.

NORMAS DAS REVISTAS

Capítulo 2 - American Journal of Primatology

Copyright © 2013 Wiley Periodicals Inc.

Executive Editor: Paul A. Garber

Impact Factor: 2.459

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 20/149 (Zoology)

Online ISSN: 1098-2345

Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, please

visit our policy statement (<http://www.wiley.com/go/nihmandate>).

Visit the new Author Services (<http://authorservices.wiley.com/>) today!

Features

include:

Free access to your article for 10 of your colleagues; each author of a paper may

nominate up to 10 colleagues. This feature is retrospective—even articles already

published offer this feature for free colleague access.

Access in perpetuity to your published article.

Production tracking for your article and easy communication with the Production

Editor via e-mail.

A list of your favorite journals with quick links to the Editorial Board, Aims & Scope,

Author Guidelines and if applicable the Online Submission website; journals in which you

have tracked production of an article are automatically added to your Favorites.

Guidelines on optimizing your article

(<http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>) for maximum discoverability.

Publication Forms

28/07/13 American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library
file:///C:/Users/User/Desktop/ultima versão/American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library.html 2/7

This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further

information, see <http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-321171.html> (<http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-321171.html>).

The *American Journal of Primatology* welcomes manuscripts from all areas of primatology.

The Journal publishes both original research papers and review articles.

Original research may

be published as standard Research Articles, Review Articles, and

Commentaries. The

American Journal of Primatology no longer accepts Brief Reports.

Submission. As of January 1, 2008, AJP will use a new online submission system for

28/07/13 American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library

file:///C:/Users/User/Desktop/ultima versão/American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library.html 3/7

Submission. As of January 1, 2008, AJP will use a new online submission system for

receiving, reviewing, and accepting manuscripts for publication,

ScholarOne Manuscripts

(formerly known as Manuscript Central). This exciting feature for the

American Journal of

Primatology enables authors to submit their manuscripts online to expedite the peer review

process. Authors also have the ability to check the status of their

manuscripts during the peer

review process. ScholarOne Manuscripts allows us to move manuscripts

through the peer

review process more expeditiously and will decrease time to publication.

In order to submit a manuscript, use either the ASP homepage

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/www.asp.org/research/ajp/)

[2345/homepage/www.asp.org/research/ajp/](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/www.asp.org/research/ajp/)

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/www.asp.org/research/ajp/)

[2345/homepage/www.asp.org/research/ajp/](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/www.asp.org/research/ajp/))) or the *American Journal of*

Primatology

journal homepage ([wileyonlinelibrary.com/ajp](http://onlinelibrary.wiley.com/ajp)

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/wileyonlinelibrary.com/ajp/)

[2345/homepage/wileyonlinelibrary.com/ajp/](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/wileyonlinelibrary.com/ajp/))). There you will find a link for

"Online

Submission". Using that link, the corresponding author will be instructed to create a user

account. Once the account has been created, manuscripts are to be

submitted through the

"Author Center". Follow all instructions and complete all required fields.

Submit your

manuscript and all Figures and Tables as separate files. After the

manuscript has been

successfully submitted, authors will see a confirmation screen with the manuscript number and receive an email reply from the AJP executive editor, Paul A. Garber, acknowledging receipt of the manuscript. If that does not happen, please check your submission and/or contact tech support at support@scholarone.com ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2345/homepage/support@scholarone.com](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/support@scholarone.com)).

Paul A. Garber

Executive Editor

Department of Anthropology

University of Illinois

Urbana, Illinois 61801 USA

E-mail: ajp-asp@uiuc.edu (<mailto:ajp-asp@uiuc.edu>)

Manuscripts must be submitted in English (American style), and must be double-spaced with

no less than 12 cpi font and 3-cm margins throughout. Lines should be numbered

consecutively from the title through the references. Number all pages in sequence beginning

with the title page, placing the first author's surname and the page number in the upper right

hand corner of each page. A Research Article should not exceed 35 pages total, and a

Review Article should not exceed 45 pages in total, including the title page, abstract,

text, acknowledgements, references, tables, figure legends, and figures.

Cover Letter. All manuscripts must be accompanied by a formal statement that explicitly

confirms the following:

Acceptance of the provisos in the next paragraph of these Instructions (see "Provisos" below).

The Methods section must also include a statement that:

the research complied with protocols approved by the appropriate Institutional

Animal Care Committee (provide the name of the committee; see iacuc.org (<http://www.iacuc.org/>));

the research adhered to the legal requirements of the country in which the research

was conducted; and

file:///C:/Users/User/Desktop/ultima versão/American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library.html 4/7

the research adhered to the American Society of Primatologists (ASP) Principles for

the Ethical Treatment of Non Human Primates (see

<https://www.asp.org/society/resolutions/EthicalTreatmentOfNonHumanPrimates.cfm>

(<https://www.asp.org/society/resolutions/EthicalTreatmentOfNonHumanPrimates.cfm>).

All research protocols reported in this manuscript were reviewed and approved by an

appropriate institution and/or governmental agency that regulates research with animals.

All research reported in this manuscript complied with the protocols approved by the

appropriate institutional Animal Care and Use Committee (see

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2345/homepage/www.iacuc.org](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/www.iacuc.org)

([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2345/homepage/www.iacuc.org](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2345/homepage/www.iacuc.org))). Researchers outside the U.S. must

confirm that their

research received clearance from, and complied with, the protocols approved by the

equivalent institutional animal care committees of their country.

All research reported in this manuscript adhered to the legal requirements of the country in

which the work took place.

Provisos. All manuscripts submitted to the *American Journal of Primatology* (AJP) must

be submitted solely to this journal, and may not have been published in any substantial form in

any other publication, professional or lay. Submission is taken to mean that each of the coauthors

acknowledge their participation in conducting the research leading to this manuscript

and that all agree to its submission to be considered for publication by AJP.

The Editorial

Office cannot be responsible for returning any materials submitted for review. The publisher

reserves copyright, and no published material may be reproduced or published elsewhere

without the written permission of the publisher and the author. The journal will not be

responsible for the loss of manuscripts at any time. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors who will assist the editors by reviewing proofs before publication. Reprints may be ordered from <https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=AJP> (<https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=AJP>) No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in the journal.

Conflict of Interest. AJP requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter (if applicable) to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the footnotes, Conflict of Interest or Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Journal Cover Artwork. Along with their manuscript, authors are welcome to submit an original photograph or other artwork that illustrates their research for possible use on the cover of the issue in which the article appears. This artwork is submitted with the understanding that

it has not been published elsewhere, that the author has copyright, and that the author grants Wiley-Blackwell permission to publish the photo as a cover image, should it be chosen.

Candidate images for journal covers may be submitted electronically as TIF files.

Manuscript Preparation. Manuscripts should be divided into the major divisions given below in the order indicated.

Title page. The first page of the manuscript should include the complete title of the paper; the names of authors and their affiliations; a short title (not more than 40 characters including spaces); and name, postal address, E-mail address, and phone number of person to whom

editorial correspondence, page proofs, and reprint requests should be sent.

Abstract. The abstract must be a factual condensation of the entire work, including a

statement of its purpose, a succinct statement of research design, a clear description of the

most important results, and a concise presentation of the conclusions.

Abstracts should not

exceed 300 words. Three to six key words for use in indexing should be listed immediately

below the abstract.

Text. The body of Research Articles must be organized into the following sections: Abstract,

Introduction, Methods, Results, Discussion and Acknowledgments. The Methods section

must include the dates and location of the study. The Methods section must also include a

statement that the research complied with protocols approved by the appropriate institutional

animal care committee (provide the name of the committee) and adhered to the legal

requirements of the country in which the research was conducted. The

Results section must

include the essential values from all statistical tests cited to support statements regarding

findings, in addition to summarizing key data using tables and figures where possible.

Acknowledgments should include: funding sources; names of those who contributed but are

not authors, further statements of recognition appropriate to the study; and brief confirmation of compliance with animal care regulations and applicable national laws. If photos or identifiable data on human subjects are in any manuscript, they must be accompanied by a notarized copy of the consent form. Footnotes are not to be used except for tables and figures. Nonstandard abbreviations should be kept to a minimum and defined in the text.

Measurements should be given in metric units and abbreviated according to the American

Institute for Biological Sciences' Style Manual for Biological Journals. Review Articles and

Commentaries may deviate from this style of organization, but must include an Abstract, Introduction, Discussion, and Acknowledgements.

References. In the text, references should be cited consecutively with the author's surname and year of publication in brackets. The reference list should be arranged alphabetically by first

author's surname. List all authors if there are five or fewer; when there are six or more authors, list the first three followed by et al. Examples follow.

Journal Articles:

King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. 1998. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *Journal of Comparative Neurology* 390:537-551.

Lynch Alfaro JW, Boubli JP, Olson LE, et al. 2011. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *J Biogeogr* 39:272-288.

Books and Monographs:

Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1223 p.

Dissertations:

Ritzmann RE. 1974. The snapping mechanism of *Alpheid* shrimp [dissertation].

Charlottesville (VA): University of Virginia. 59 p. Available from:
University Microfilms, Ann
Arbor, MI; AAD74-23.

Book Chapters:

Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. 1998. Receptor
fusion proteins
and analysis. In: Ariano MA, editor. Receptor localization. New York:
Wiley-Liss. p 75-90.

Format for Presenting Statistical Information. Overall is it recommended
that authors

provide the details of their statistical analyses in the Methods, Tables, and
Figures as

appropriate. Linear statistics: means and standard deviation/standard errors
should be written

in the format $X \pm SD/SE$ unit (i.e., mean body weight = $6.38 \pm SD 1.29$ kg or
mean head-trunk

length = $425 \pm SE 3.26$ mm). Circular statistics: mean and angular
dispersion should be written

in the format $X \pm AD$ unit (i.e., phase relationship between head linear and
angular

displacement = $104 \pm AD 14$ deg). Ranges should be written as range: 15-
29; sample sizes

should be written as $N=731$; numbers less than 1 should be written as 0.54
not as .54. P values

that are deemed significant can be presented as less than a threshold value
(i.e., $P < 0.05$, $P <$

0.01 , $P < 0.001$). Nonsignificant test outcomes should be reported using an
exact probability

value whenever possible. The P value (P) and sample size (N) should be
capitalized, and

degrees of freedom, if required, should be written in lower case (e.g. $df=4$).

For example: X^2

= 1.84, $df=8$, $P = 0.91$ Unless a test statistic unambiguously refers to a
particular statistical test

(i.e., X^2 is understood to refer to a Chi-squared test), results should include
the name of the

statistical test which should be followed by a colon, the test statistic and its
value, degrees of

freedom or sample size (depending on which is most appropriate for that
test), and the P

value, with indication if it is one- or two-tailed (unless that issue has been
addressed for the

manuscript as a whole before any statistical results are given). These entries should be separated by commas. Wilcoxon signed-ranks test: $Z=3.82$, $P<0.001$, $N=20$
ANOVA: $F=2.26$,
 $df=1$, $P=0.17$

Tables. Tables should be titled and numbered in accordance with the order of their

appearance; each table should be placed on a separate page. All tables must be cited in the text

with approximate placement clearly defined. Table titles should be concise descriptions of the

data in the table. Table footnotes should provide more detail relating to the interpretation of

data presented in the table (i.e., notes on sample sizes, tests performed, etc.). Samples are

shown below:

Table title: Leadership of Group Movements by Males and Females within Each Group Table

footnote: Chi-square results for adult female- versus adult male-led group progressions overall

(A), when feeding occurred within 5 min of group movement (B), and when feeding did not

occur within 5 min of group movement (C). N refers to the number of progressions led by

each sex. Females in each group, except C3, led group movements significantly more than

males overall and in all contexts.

Table title: Food Species and Plant Parts in the Diet of *Rhinopithecus brelichi* at Yangaoping,

Guizhou During the Study Period Table footnote: Season: Sp, spring (February, March,

April); Su, summer (May, June, July); A, autumn (August, September, October); W, winter

(November, December, January); Y, four seasons. E, evergreen; D, deciduous

Figure Legends. A descriptive legend must be provided for each figure and must define all

abbreviations used therein.

Figures/Illustrations. Each figure should be high-contrast on a separate page with the figure

number clearly indicated. All color figures will be reproduced in full color in the online edition

of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print. Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential scientific information. For best reproduction, bright, clear colors should

28/07/13 American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library
 file:///C:/Users/User/Desktop/ultima versão/American Journal of Primatology - Author Guidelines - Wiley Online Library.html

Capítulos 3 e 4 – Animal Science Journal

Parts of the Manuscript

Manuscripts should be presented in the following order: (i) title page, (ii) abstract and key words, (iii) text, (iv) acknowledgments, (v) references, (vi) appendices, (vii) figure legends, (viii) tables (each table complete with title and footnotes) and (ix) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

Title page

The title page should contain (i) the title of the paper, (ii) the full names of the authors and (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with (iv) the full postal and email address, plus facsimile and telephone numbers, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent. The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote. The title should be short, informative and contain the major key words. Do not use abbreviations in the title. A short running title (less than 40 characters) should also be provided.

Abstract and Key words

All articles must have a structured abstract that states in 200 words or fewer the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. Five or fewer key words (for the purposes of indexing) should be supplied below the abstract.

Text

Authors should use the following subheadings to divide the sections of their manuscript: Introduction, Materials, Methods, Results and Discussion.

Acknowledgments

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions

should also be acknowledged. Personal thanks and thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

References

The Harvard (author, date) system of referencing is used (examples are given below). In the text give the author's name followed by the year in parentheses: Smith (2000). If there are two authors use 'and': Smith and Jones (2001); but if cited within parentheses use '&': (Smith & Jones 2001). When reference is made to a work by three or more authors, the first name followed by *et al.* should be used: MacDonald *et al.* (2002). In the reference list, references should be listed in alphabetical order.

Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Smith A,

2000, unpublished data). All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list.

Authors can cite the English text that has published from Book and/or peer-reviewed Journal. Author also can cite Non-English text when available to access and view a website, and abstract and figure is written in English in consultations with Editors. Authors are responsible

for the accuracy of the references.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. These sites are searchable at:

EndNote reference styles:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

(<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>)

Reference Manager reference styles:

Reference Manager reference styles:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

(<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>)

Journals

Drori D, Loosli JK. 1959. Influence of fistulation on the digestibility of feeds by steers. *Journal of Animal Science* 18, 206–210.

Online article not yet published in an issue

An online article that has not yet been published in an issue (therefore

has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue.

Abe H, Takeuchi H. 2012. Characterization of the intronic VNTR polymorphisms found in a paralog of chicken serotonin transporter gene. *Animal Science Journal*. 2012, doi: 10.1111/asj.12011

Books

Nalbandov AV. 1963. *Advances in Neuroendocrinology* 2nd edn. University of Illinois Press, Urbana, IL.

Chapter in a book

Folley SJ, Malpress FH. 1948. Hormonal control on mammary growth. In: Pincuss G, Thimamm KV (eds), *The Hormones* Vol. 1, pp. 695–743. Academic Press, New York.

Electronic material

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 1999. Nucleotide–nucleotide BLAST (blastn) [homepage on the Internet]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD; [cited 13 December 2002]. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)

Patent

Tomogane H. 2002. Improved method for meat quality. Japanese Patent No.3433212, granted 19 January 2002.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Number tables consecutively in the text in Arabic numerals. Type tables on a separate page with the legend above. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement

in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes.

Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for *P* values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figures

Color figures are not charged for publication effective on 1 January, 2013.

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text.

Figures should be sized to fit within the column (80.5 mm), intermediate (112 mm) or the full text width (168 mm).

Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration.

Line figures should be sharp, black and white graphs or diagrams, drawn professionally or with a computer graphics package. Lettering must be included and should be sized to be no larger than the journal text.

Figure legends

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable

without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Supporting Information

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format.

- Supporting figures, tables and text must be numbered Fig. S1, Fig. S2, etc., Table S1, Table S2, etc. and Doc. S1, Doc S2, etc, respectively.
 - Titles and legends of supporting figures and tables need to be included in the respective figure and table file (s).
 - Each figure and table file should not be larger than 5MB, although video files may be larger.
 - An author's website cannot be used as supporting information.
- There is no limitation to the amount of supplementary material that can be appended to the article, but in some instances the Editor may request a reduction if the amount of supplementary material submitted is judged excessive.

For further information on requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>
(<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>)

WILEY BLACKWELL AUTHOR SERVICES

Author Services enables authors to track their article, once it has been

accepted, through the production process to publication online.

Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production so they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>) for more details on online production tracking and for a wealth of resources, including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Proofs
It is essential that corresponding authors supply an email address to which correspondence can be emailed while their article is in production.

In case there is unclear text or material at the stage of typeediting, Word files of edited articles will be sent for checking via email, and should be returned to the Publisher. It is essential that these files are checked carefully, as the cost of changes made at a later stage may be charged to the author. Full instructions on how to correct and return the file will be attached to the email.

Notification of the URL from where to download a Portable Document Format (PDF) typeset page proof, associated forms and further instructions will be sent by email to the corresponding author. The purpose of the PDF proof is a final check of the layout, and of tables

and figures. Alterations other than the essential correction of errors are unacceptable at PDF proof stage. The proof should be checked, and approval to publish the article should be emailed to the Publisher by the date indicated, otherwise, it may be signed off on by the Editor or held over to the next issue.

Page charges

MEMBERS who is a First Author OR a Correspondence Author: A charge for full papers will be made for each paper (¥ 6000) and for extra typeset pages that exceed four (4) pages (¥ 12000 per page). A charge for rapid communications will be made for each paper (¥ 30000) and for extra typeset pages that exceed two (2) pages (¥ 12000 per page). A charge for review papers will be made for each paper (¥ 20000) and for extra typeset pages that exceed ten pages (¥ 12000 per page). Customers in Japan should add consumption tax.

NON-MEMBERS: A charge for full papers will be made for each paper (¥ 16000) and for extra typeset pages that exceed four (4) pages (¥ 12000 per page). A charge for rapid communications will be made for each paper (¥ 40000) and for extra typeset pages that exceed two (2) pages (¥ 12000 per page). A charge for review papers will be made for each paper (¥ 30000) and for extra typeset pages that exceed ten (10) pages (¥ 12000 per page). Customers in Japan should add consumption tax.

Offprints

A free PDF offprint will be supplied to the corresponding author.

Please

register with Wiley Blackwell Author Service to receive the benefits.

A minimum of 50 offprints will be provided upon request, at the author's expense.

OFFPRINTS in Black and White: An Offprint Order Form outlining the cost of offprints will be sent to the corresponding author from the Editorial Office. Offprints will be provided only if a completed Offprint Order Form is returned to the Editorial Office by mail by the specified date.

OFFPRINTS in Color: Please visit <http://offprint.cosprinters.com/> (<http://offprint.cosprinters.com/>), fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields.

Color figures

Color figures are not charged for publication effective on 1 January, 2013.

Early View

Animal Science Journal is covered by our Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance

of their publication on issue basis. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next

scheduled online issue. Early View articles are complete and final. They

have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. Please see an example of "*Online article not yet published in an issue*" in References section in this Author Guidelines. After issue online publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at <http://www.doi.org/faq.html> (<http://www.doi.org/faq.html>)

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version

of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article

is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online

Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see

<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>

(<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>)

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to

complete the payment form available from our website at:

<http://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

(<http://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>)

Prior to acceptance there is no requirement to inform Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

WILEY BLACKWELL JOURNAL ONLINE

Visit the *Animal Science Journal* home page at

<http://wileyonlinelibrary.com/journal/asj>

(<http://wileyonlinelibrary.com/journal/asj>) for more information and to search the articles and register for table of contents and e-mail alerts.

For submission guidelines and digital graphics standards visit

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>
 (http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp).
 EDITORIAL OFFICE ADDRESS
 Editorial Board: *Animal Science Journal*
 Japanese Society of Animal Science
 201 Nagatani Corporas
 Ikenohata 2-9-4
 Taitoku,
 Tokyo 110-0008
 Japan
 Email: editasj@siren.ocn.ne.jp (mailto:editasj@siren.ocn.ne.jp)
 Effective From January 1, 2013

Capítulo 5 – Primates

MANUSCRIPT PREPARATION

Please organize your manuscript as follows:

Title page (including all authors' full name; title of paper; affiliations of all authors; address

of corresponding author including e-mail address, phone and fax number).

Abstract (no more than 300 words)

3–7 key words

The text of the paper should be divided into the following sections: Introduction; Methods;

Results; Discussion; Acknowledgments; References; tables; figure legends.

Other styles

of manuscript organization may be accepted at the discretion of the editorial board.

When animals are used for experimentation, authors will be required to state at the end of the

acknowledgments that they have complied with the ethical standards in the treatment of their animals

with the guidelines laid down by the Primate Society of Japan, NIH (US), EC Guide for animal

experiments or other equivalent guidelines; as well as with specific national laws where applicable.

Genus and species names should be in italics. The common names of animals should not be capitalized.

SI units should be used throughout except where non-SI units are more common.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations. Note: If you use Word 2007, do not

create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor

or MathType instead.

Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference

included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should

never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or

tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by

superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use

footnotes instead of endnotes.

14/07/13 Primates - incl. option to publish open access

Word template (zip, 154 kB)

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

EndNote style file (zip, 17 kB)

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the

reference list. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Literature citations in the text should indicate the author's surname with the year of publication.

Multiple citations should be listed chronologically.

References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name:

Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title of article; journal title abbreviated in

accordance with international practice; volume number; first and last page numbers:

Imanishi K (1960) Social organization of subhuman primates in their natural habitat. *Cur Anthropol* 1:393–407

When citing articles that have been published only on line, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature, if available,

should be added at the end of the reference in question.

Plumptre AJ, Cox D (2005) Counting primates for conservation: primate surveys in Uganda. *Primates*. doi
10.1007/s10329-005-0146-8

Single contributions in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title

of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers:
Matthew JR, Denitsa GS, Kirk RJ, William LH (2007) Primate origins and the function of the circumorbital region:

what's load got to do with it? In: Matthew JR, Marian D (eds) *Primate origins: adaptations and evolution*. Springer, New York, pp 285-328

Book: name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication:

Holldobler B, Wilson EO (1990) *The ants*. Springer, Heidelberg

The author is responsible for the accuracy of the references.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word

Abbreviations, see

<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text

citations and reference list.

TABLES AND FIGURES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a

reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for

significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS

Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

14/07/13 *Primates* - incl. option to publish open access

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures

are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information

will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to

black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the

necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm

(8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on

an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions into your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in the text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If illustrations are

supplied with uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure captions

and citations.

If an appendix appears in your article/chapter and it contains one or more figures, continue

the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2,

A3, etc." Figures in online appendices (Electronic supplementary Material) should,

however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.

Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in

bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at

14/07/13 Primates - incl. option to publish open access

the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as

coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference

citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

Figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

The publisher reserves the right to reduce or enlarge figures.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from

the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do

not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have

occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please

make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software

or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead or in addition to colors for conveying information (color-blind

users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1.

Electronic supplementary material will be published in the online version only.

It may consist of

Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings

Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.

Large original data, e.g. additional tables, illustrations, etc.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author

names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require

very long download times and that some users may experience other problems during

downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should

be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized formats such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and

.tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

14/07/13 Primates - incl. option to publish open access

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the

material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation

(Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content

of the file.

Processing of Supplementary Files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without

any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files,

please make sure that

The manuscript contain a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice [<http://springer.com/openchoice>]

Copyright Transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Japan Monkey Centre and the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color Illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof Reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first

14/07/13 Primates - incl. option to publish open access

www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/10329?print_view=true&detailsPage=plctci_659147_7/7

© Springer faz parte do Springer Science+Business Media

publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Editorial office

Dr. Juichi Yamagiwa

Editor-in-Chief, Primates

c/o Editorial Office

Japan Monkey Centre, Inuyama

Aichi 484-0081, Japan

Tel: +81-568-61-2327 Fax: +81-568-62-6823

e-mail: primates.jmc@gmail.com

Capítulo 6 - Acta Scientiarum. Animal Sciences

Diretrizes para Autores

1. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* ISSN 1806-2636 (impresso) e ISSN 1807-8672 (on-line), é publicada trimestralmente pela Universidade Estadual de Maringá.

2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes da Zootecnia (Produção Animal), incluindo genética e melhoramento, nutrição e digestão, fisiologia e endocrinologia, reprodução e lactação, crescimento, etologia e bem estar, meio ambiente e instalações, avaliação de alimentos e produção animal.

3. Os autores se obrigam a declarar a cessão de direitos autorais e que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica. Esta declaração encontra-se disponível abaixo.

4. Os dados, idéias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do comitê editorial da revista.

5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.

6. Os artigos submetidos poderão ser em português ou inglês. Se aceitos para publicação será obrigatória a tradução para o inglês.

7. Os artigos serão avaliados por no mínimo três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.

8. Os artigos deverão ser submetidos pela internet acessando este **Portal ACTA**.

9. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

10. A revisão de português e a tradução e/ou revisão de língua estrangeira serão de responsabilidade e custeados pelos autores dos artigos aceitos a partir de 2010, mediante comprovação emitida pelos [revisores credenciados](#).

11. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

a) No processo de submissão deverão ser inseridos os nomes completos dos autores (no máximo seis), seus endereços institucionais e o e-mail do autor indicado para correspondência

b) Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: Resumo, Palavras-chave, Abstract, Key words, Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão, Conclusão, Agradecimentos (Opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.

c) O título, com no máximo vinte palavras, em português e inglês, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras, que não estejam citadas no título.

d) O resumo não excedendo 200 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais e métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis palavras-chave deverão ser acrescentadas ao final, tanto do resumo como do abstract, que não estejam citadas no título.

e) Os artigos não deverão exceder 15 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no MS-Word, ou compatível, utilizando Times New Roman fonte 12.

- f) O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.
- g) O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 2MB, bem como, não poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do Word.
- h) Tabelas, Figuras e Gráficos deverão ser inseridos no texto, logo depois de citados. As Figuras e as Tabelas deverão ter preferencialmente 7,65 cm de largura, e não deverão ultrapassar 16 cm.
- i) As Figuras digitalizadas deverão ter 300 dpi de resolução e preferencialmente gravados no formato jpg. Ilustrações em cores não serão aceitas para publicação.
- j) Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.
- k) As equações deverão ser editadas utilizando software compatível com o editor de texto.
- l) As variáveis deverão ser identificadas após a equação.
- m) Artigos de Revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.
- n) A revista recomenda que oitenta por cento (80%) das referências sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge*, *Scopus* ou *SciELO* com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência as citações de artigos internacionais. Não serão aceitos nas referências citações de dissertações, teses, monografias, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.
- o) As citações deverão seguir os exemplos seguintes que se baseiam na ABNT. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (LOPES, 2005); para dois autores Kevan e Imperatriz-Fonseca (2006) ou (KEVAN; IMPERATRIZ-FONSECA, 2006); três ou mais autores, utilizar o primeiro e após et al. (MENDOZA et al., 2009).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, justificado, conforme os exemplos seguintes que se baseiam na ABNT. Listar todos os autores do trabalho. Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados, sem o local de publicação.

Artigos

MENDOZA, F.; VALOUS, N. A.; ALLEN, P.; KENNY, T. A.; WARD, P.; SUN, D.W. Analysis and classification of commercial ham slice images using directional fractal dimension features. **Meat Science**, v. 81, n. 2, p. 313-320, 2009.

CARDOSO, V.; QUEIROZ, A. S.; FRIES, L. A. Estimativa de efeitos genotípicos sobre os desempenhos pré e pós-desmama de populações Hereford x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1763-1773, 2008.

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; SUGAWARA, M. S.; SILVA, M. S.; SCHWAN, R. F. L. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 3, p. 255-261, 2008.

Livros

HUI, Y. H.; NIP, W. K.; ROGERS, R.W.; YOUNG, O. A. **Meat science and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2001.

KEVAN, P. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. 2nd ed. Brasília, DF: Secretariat for Biodiversity and Forests, 2006.

SOUZA, J. P. de; PEREIRA, L. B. Fatores influenciadores na competitividade da cadeia de carne bovina no Estado do Paraná. In: PRADO, I. N. do; SOUZA, J. P. de (Org.). **Cadeias produtivas: estudos sobre competitividade e coordenação**. Maringá: Eduem, 2007. p. 53-79.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita e não está sendo avaliada por outra revista.
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, Open Office ou RTF (desde que não ultrapasse 2MB).
3. Todos os endereços de páginas da Internet, incluídas no texto (Ex: <http://www.eduem.uem.br>) estão ativos e prontos para clicar.
4. O texto está em espaçamento 1,5; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. No máximo 15 páginas.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
6. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção propriedades do Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação por Pares Cega](#).


Capítulo 7 - American Association for Laboratory Animal Science

Manuscript Preparation

Title

page


Manuscript should be single spaced, with no page or line numbers On the first page of the manuscript, include the:


- Full Title—a concise informative description of the presented work including the common name of the animals used (add genus and species in parentheses for nonhuman primates and species whose common name may be unfamiliar to readers).
- List of authors—the first name, middle initial (or first initial and middle name), and last name of each author
- Institutional affiliation of each author—the Department (or Program), Institution (or Company), City, State (or province), and Country (if not USA) at which the described work was done.
 - Use superscripted Arabic numerals to indicate respective institutions
 - Spell out all locations in full
- Corresponding author—the person who readers can contact regarding information or reagents
 - Indicate with * in the list of authors and provide that author's email address
- Running title—a descriptive phrase of no more than 72 characters (including spaces) to be used as a running head on each printed page
- Abbreviations and acronyms—a list of all nonstandard acronyms and abbreviations used throughout the manuscript and their definitions
 - **Standard Abbreviations**  need not be included on the title page.
 - Do not abbreviate terms used fewer than five times in a manuscript.


Abstract


Provide a single paragraph (no subheadings) of 300 words or fewer that sequentially summarizes the background, rationale, methods, results, and conclusions of the work.




Body



Use coded or **nonproprietary language**  throughout the manuscript. Cite the proprietary, brand, or vendor name associated with an assay, instrument, machine, service, or compound only in Materials and Methods.

Define all nonstandard abbreviations and acronyms at first use. Limit the number of novel abbreviations used. Refer to the **list of Standard Abbreviations**  for abbreviations that can be used without definition.

The length of and subsections comprising the body of the manuscript will vary depending on the **type of article submitted** . The manuscript may include some or all of the following sections:

- Introduction 
 - Provide the rationale and supporting background for the presented work and its importance and relevance.
 - Extensive reviews of the existing literature are inappropriate for research reports and case studies/reports.

- Materials and Methods 
 - Describe the animals, husbandry, tests, equipment, procedures, reagents, and services used in sufficient detail to permit replication of the work, with citation of published references as consistent with brevity and clarity.
 - Clearly define use of the term 'specific pathogen-free' by including specific criteria (for example, tests, organisms surveilled, housing, husbandry conditions) or citing publications providing that information.
 - Include statistical methods where relevant and attribute (name of software program used and name and location of vendor) or reference them appropriately. In addition, provide the P value used to define statistical significance.
 - Include a statement regarding Institutional Animal Care and Use Committee approval (or equivalent) for procedures and protocols involving animals.
 - Provide assurances regarding **humane care and use of animals** , citing AALAS Position Statements and national standards as appropriate to the country in which the work was performed.
 - For research involving human subjects, identify the committee that approved the experiments and include a statement that informed consent was obtained from all subjects, that measures are in place to protect the identity of all subjects, and that no coercion was used to solicit subjects.
 - Provide the vendor's name and location for any sole-source item or service.
 - Insert callouts (in parentheses) for all Figures and Tables, which are numbered in order of their mention in the text.
 - Follow **correct nomenclature**  for laboratory animals, genes, genetic markers, alleles, mutations, and microbes.
 - Wherever possible, use **International System of Units** base and derived units for numerical data.

- Results 
 - Use headings as needed to guide readers.
 - Accompany statements of differences between groups with appropriate statistics.
 - Summarize selected data from Figures and Tables in the Results section; do not merely repeat all information presented in graphics.
 - Save interpretation of data for the Discussion section. 

- Discussion
 - Begin the Discussion with a brief summary of the key findings.
 - Limit discussion of study findings to those that have been presented in the Results.
 - Address any limitations of the study and directions for potential future research.

Acknowledgments

Recognize (with their permission) people and institutions whose contributions of funding, technical assistance, reagents, data collection and analysis, and other services do not meet the [criteria for authorship](#).

References

Provide complete and accurate bibliographic information for all cited materials. Only information that is published or is already accepted for publication (that is, "in press") can be used as references. We will not accept citations of unpublished information or materials (for example, personal communications, unpublished data, manuscripts still undergoing review) in a reference list or parenthetically in the text.

Journals published by AALAS follow a modified version of the citation style found in Scientific Style and Format. Refer to previous issues of JAALAS or CM or the Example References Word file linked at left for specific types of referenced material.

Organize references numerically in strict ("letter-by-letter") alphabetical order. List references by the same author(s) chronologically.

Journal style template files are available for EndNote and RefMan.

- [RefMan template](#)
- EndNote template file: download from the [EndNote website](#) (enter Comparative Medicine in the box titled Publication Name and click on Find Style)

Figure Legends

Provide complete, concise descriptions of all figures in order of their mention in the text. Define additional abbreviations or acronyms.

Indicate the original magnification of images by citing the magnification factor in the legend or by using scale bars within images themselves.

Use of previously published material (in whole or part) must be cited in the legend and accompanied by a signed [Permission for Use form](#) .

[Appropriate manipulation of digital images](#)  must be made explicit in the accompanying legend.

Tables

Tables must be generated by using the Table function of Microsoft Word. Tables generated by using other programs (for example, Microsoft Excel) will be returned to the authors for reformatting, potentially delaying publication of the article.

Number tables in order of their mention in the text and provide a brief title describing the information presented. Footnotes to tables are indicated by using superscript lowercase letters.

Tables are used to present numerical data and are not wholly narrative. According to AALAS journal style, narrative information in a tabular format (for example, descriptions of scoring systems, experimental protocols) is submitted as a figure.

 top

Figure

Preparation

Figures are submitted electronically, separately from the manuscript. Do not embed any images within the manuscript file. Also, all submitted micrographs must be in color; black and white micrographs will not be accepted for publication.

File formats accepted are TIFF (preferred), EPS, high-resolution JPG, and high-quality PDF (no image compression). PowerPoint slides, Excel graphs, and images embedded in Word are not acceptable.

Minimal resolution: 600 dpi for line art (for example, graphs in black and white); 300 dpi for color (save as CMYK; not RGB or indexed) or grayscale images (save black and white images as grayscale); 1200 dpi for scanned line art (save as TIFF). Photos taken with a digital camera must have a resolution of at least 4 megapixels.

Create figures with a width of 89 mm (single column) or 187 mm (double column); do not enlarge created figure to meet these dimensions.

Designate panels of figures by using uppercase letters (no periods) in the upper left corner of the image; keep size of lettering and other labels (at least 2 mm in height as submitted) consistent between panels of a figure and between figures. Embed fonts within digital images.

Indicate the magnification factor of an image by including an appropriate size bar in its lower right corner.

Minimize the use of color in charts, graphs, and drawings to that necessary for clarity of communication and ease of understanding. Use solid fill or percentage screens (not pattern or textured fills) and a minimum line weight of 0.5 pt throughout.

Additional information regarding generating and formatting figures is available by emailing [Amy Tippett](#).

 top

Manuscript

Submission


Letters to the Editor are submitted by email (journals@aalas.org; please specify whether the letter is intended for publication in CM or JAALAS in the subject line) or through the USPS (Letter to the Editor, CM or JAALAS; AALAS; 9190 Crestwyn Hills Drive, Memphis, TN, 38125).

Research Reports, Case Reports, Case Studies, and Overviews are submitted electronically through the Manuscript Central system. To avoid publication delays, ensure that all portions of the manuscript conform to the specifications in the Information for Authors.

To submit a manuscript for possible publication, you need

- A Microsoft Word file of the manuscript itself. Do not add line numbers to the file.
- All associated image files.
- A list of **MeSH** terms (maximum, 7) for use as key words appropriate for indexing of the article.
- Names, institutional affiliations, and email addresses (maximum, 4) of suggested persons to include or exclude as potential reviewers.

Submit all necessary files for CM manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-cm>. Submit files for JAALAS manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-jaalas>.

As part of the submission process, return signed copies of the **Copyright Transfer and Declaration of Potential Competing Interests form**  by email (journals@aalas.org) or fax (901-334-5152).

The corresponding author must retain editable electronic copies of all text and illustrations used in the submitted manuscript.

 top

Manuscript

Review

and

Status

The Editor-in-Chief reviews all submissions and makes an initial determination regarding suitability for publication. If an Associate Editor transfers a submitted manuscript from CM to JAALAS (or vice versa), the contact author will be notified by email and may opt to withdraw the manuscript from consideration.

Before being sent for peer review, newly submitted manuscripts are screened to ensure that the text, figures (charts, graphs, images), and tables comply with the criteria described in the Information for Authors.

All manuscripts undergo thorough peer review (including digital assessment for plagiarism prior to acceptance), typically by three reviewers with relevant experience. Selection of the panel of reviewers ultimately is the prerogative of the Associate Editor.

AALAS gives timely review the highest priority. Once all reviewers for a manuscript have been assigned, authors can check the status of their submission through Manuscript Central. Whether a manuscript is accepted, requires revisions, or is rejected for publication typically is decided within 4 weeks of being sent for review. To avoid publication delays, regularly verify and update authors' contact information (<http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-cm> for CM manuscripts; <http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-jaalas> for JAALAS manuscripts).

Changes requested by reviewers must be completed within 2 months or an extension requested (email journals@aalas.org or call the journals office at 901-754-8620). Without timely return of revisions or a request for extension, the manuscript will be withdrawn from the publication process.

Approximately 5 weeks before the slated publication date, the contact author receives a copyedited version of the manuscript, which will have undergone a final review by the Editor-in-Chief.

After any additional queries that arise during copyediting and final review are addressed satisfactorily, the contact author receives a PDF of the page proofs of the article. At this late stage in the publication process, only minor revisions can be accommodated.

Approved page proofs must be emailed to journals@aalas.org within 48 hours of receipt.

After publication, the manuscript will be submitted to PubMed Central for indexing. Articles will become available to the general public 6 months after publication.