



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

FERNANDA LUIZA DE MIRANDA LINS E LINS

**Avaliação renal de macacos-de-cheiro (*Saimiri collinsi*) por ultrassonografia e
bioquímica sérica**

**BELÉM
2015**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

FERNANDA LUIZA DE MIRANDA LINS E LINS

**Avaliação renal de macacos-de-cheiro (*Saimiri collinsi*) por ultrassonografia e
bioquímica sérica**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

**BELÉM
2015**

Lins, Fernanda Luiza de Miranda Lins e

Avaliação renal de macacos-de-cheiro (*Saimiri Collinsi*) por ultrassonografia e bioquímica sérica / Fernanda Luiza de Miranda Lins e Lins. - Belém, 2015.

35 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.
Orientador: Frederico Ozanan Barros Monteiro

1. Primatas – rins – avaliação 2. Cistatina C. 3. Biomarcadores renais 4. Diagnóstico Por Imagem I. Monteiro, Frederico Ozanan Barros II. Título.

CDD – 599.852



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

FERNANDA LUIZA DE MIRANDA LINS E LINS

**Avaliação renal de macacos-de-cheiro (*Saimiri collinsi*) por ultrassonografia e
bioquímica sérica**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde & Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho – Co-orientador – Presidente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof^a. Dr^a. Maria Vivina Barros Monteiro – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof^a. Dr^a. Ana Rita de Lima – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Leandro Nassar Coutinho – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Luiz Marcelo Lima Pinheiro – Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Aos meus amados pais, irmã e marido, pelos cuidados, atenção, carinho e paciência, que a mim dedicaram nessa longa estrada, cheia de alegrias e alguns percalços, para meu engrandecimento como pessoa e, principalmente, como profissional dedicada à saúde desses seres tão especiais para a maioria, se não todos nós.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais de sangue e de coração (Leda & Gil, Luiz & Eliane) pela educação e pelos valores que me deram, sem cobranças excessivas, mas com muito amor e dedicação. Vocês são meu chão e meu céu... todas as minhas vitórias são antes suas... afinal, sem vocês eu jamais estaria e chegaria aqui.

As minhas irmãs de sangue e de coração, Larissa Lins e Danielle Vieira, minhas alegrias, com quem eu aprendi e aprendo diariamente como ser uma pessoa melhor, mais generosa e paciente. Amo vocês. Dani, obrigada por me presentear com a coisa mais linda e gostosa (nossa Manu).

Ao meu amado marido, pela dedicação e cuidados diários, nunca deixando que o estresse do dia-a-dia nos abalasse, estando sempre presente com uma palavra e um gesto de carinho, fazendo dos meus dias os melhores possíveis. Minha vida, meu chuchu... não há palavras para expressar o quão grande é meu amor por você... são alguns anos de companheirismo, amizade e acima de tudo respeito... Amo você pelo simples fato de ser quem és.

Aos meus mestres, Frederico Ozanan, Andre Marcelo, Caterina Muramoto, Érika Branco, Ana Rita de Lima, Adriana Maciel, Edileia Mesquita, Sinerey Aragão, Rosa Cabral, Rinaldo Viana, Vivina Monteiro, Ednaldo Filho sempre presentes, tirando as dúvidas e ensinando, vocês foram e são fundamentais para meu engrandecimento como pessoa e como profissional.

Ao professor Leandro Nassar, você colaborou muito com a confecção do trabalho, suas sugestões e direcionamentos foram excepcionais. Muito obrigada por fazer parte desse momento.

As minhas bichinhas de todos os momentos Verena Ferreira (Vê), Thais Marques (Tatá), Brenda Baker (Prenda). Obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pelos ensinamentos e pelo convívio quase que diário, nos tornando quase que irmãs. Amo vocês.

Aos meus amigos de todas as horas Keitty Reis, Dennis Lima, Anderson Carvalho, Jonan Silva, Tâmara Mata, Évelin Wanzeler, Naima Macedo, Suellen Monger e Roberta Aguirra. Adoro dividir os melhores momentos com vocês.

A minha melhor estagiária Bianca Mendonça. A única coisa que posso lhe desejar é um futuro brilhante... foi muito bom trabalhar com você e poder participar do seu crescimento profissional, espero ter contribuído.

A melhor equipe de trabalho que poderia ter (Aline Imbelone, Wellington Bandeira, Mika Aihara, Manoella Vaz, ...), obrigada pela flexibilidade e agilidade, a eficiência de vocês foi fundamental para o andamento rápido do trabalho. Foi ótimo trabalhar com vocês, espero que continuemos com a parceria.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos Margareth Pinheiro, Bruno Martins, Brenda Leandro, Valeska Feitosa, Danielle Fernandes, Sabine Hilbert, Oscarleana Oliveira, Michele Lima, Hertel Barros, Bernard Gemaque, Priscila Nogueira, Rogério Silva e Gisely Faria vocês são ótimos como vets e como pessoas, adoro dividir meus dias e poder aprender todo dia um pouquinho mais com vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASP – American Society of Primatologists

BUN – Blood Urea Nitrogen

CENP – Centro Nacional de Primatas

CEUA / IEC – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas

CYS C – Cistatina C

DCC – Diâmetro Craniocaudal

DDV – Diâmetro Dorsoventral

DT – Diâmetro Transversal

FE1 – Faixa Etária 1

FE2 – Faixa Etária 2

GGT – γ -Glutamyl Transferase

KIM-1 – Molécula de Injúria Renal-1

NAG – N-acetil β -D-glucosaminidase

NGAL – Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica

PENIA – Particle Enhanced Nephelometric Immunoassay

PNM – Primatas do Novo Mundo

PVM – Primatas do Velho Mundo

RBP – Proteína de Ligação ao Retinol

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

VR – Volume Renal

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Measurements of the right kidney from sagittal (A) and transversal scans (B). Length and height were measured in the sagittal scan (A and C) and width in the transversal scan (B and D). The calculated renal volume was an approximation based on a spheroidal geometric model that incorporated the length, height, and width measurements.22
- Fig. 2** (A) Sagittal section of right kidney compared to the liver. The right kidney showed up hyperechoic in relation to the liver when the liver and the kidney were cranial pole contact. (B) Transversal section of right kidney. (C) Sagittal section of the left kidney, the spleen was hyperechoic compared to left kidney. (D) Transversal section of the left kidney. Arrows show the kidney capsule, and arrowheads show the renal pelvis.25
- Fig. 3** Comparison of the mean \pm stand derivation of the volumes in right and left kidneys of in males and females of *Saimiri collinsi* (1.50 ± 0.27 ; 1.41 ± 0.32 cm³, respectively).26

LISTA DE TABELAS

Table 1 Mean \pm Stand derivation of body length/mass, urea, serum creatinine (SCr), uric acid, and cystatin C (CysC) of 30 Saimiri collinsi individuals, categorized by gender, age group (AG) and reference ranges (minimum - maximum).....24

Table 2 Renal ultrasonography variables of Saimiri collinsi expressed as mean \pm standard deviation according to gender and age groups (young adult - AG1 and senile - AG2).27

SUMÁRIO

RESUMO	12
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1. REVISÃO DE LITERATURA	13
Title: Renal evaluation of squirrel monkey (<i>Saimiri collinsi</i>) by serum biochemistry and ultrasonography	17
Introduction	18
Material and Methods	19
Results	23
Discussion	28
Acknowledgments	30
References	31

RESUMO

Os primatas do gênero *Saimiri* têm sido especialmente utilizados em estudos farmacológicos, cardiovasculares e neurológicos, fazendo-se cada vez mais necessária a manutenção dessa espécie em cativeiro. Porém, a utilização contínua de primatas nas pesquisas experimentais e biomédicas pode levar ao desenvolvimento de doenças renais. Além da avaliação bioquímica sérica ou urinária, pode-se realizar a ultrassonografia renal, mesmo na presença de função renal prejudicada. Assim, objetivou-se promover a avaliação ultrassonográfica dos rins e estabelecer o perfil bioquímico sérico renal da espécie *Saimiri collinsi* criados em cativeiro, associando os dados morfométricos ultrassonográficos. Foram examinados 30 animais da colônia do Centro Nacional de Primatas – CENP, sendo 16 machos e 14 fêmeas, distribuídos em duas faixas etárias: FE1 [jovens, 3 – 7 anos, (n=15, 8 machos e 7 fêmeas)] e FE2 [idosos 14 – 17 anos (n=15, 8 machos e 7 fêmeas)]. Realizaram-se dosagens de ureia, creatinina e Cistatina C, bem como ultrassonografia renal de todos os animais. Não houve diferença significativa entre faixas etárias para as avaliações da bioquímica sérica, entretanto, a dosagem de creatinina apresentou diferença significativa quando comparada entre os sexos. A avaliação ultrassonográfica dos rins demonstrou que os rins são volumetricamente simétricos quando comparados entre os lados e entre as faixas etárias. Na comparação entre os sexos, apenas o rim direito apresentou diferença. Os resultados obtidos para Cistatina C podem ser utilizados como referência para esse novo marcador.

Palavras-chave: Primatas – rins – avaliação. Cistatina C. Biomarcadores renais. Diagnóstico Por Imagem

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Tem havido crescente interesse da comunidade científica nas pesquisas com primatas não humanos, isso se deve, principalmente, a similaridade filogenética com humanos em relação aos demais animais utilizados em biotérios (Ward & Vallender 2012). Os Primatas do Novo Mundo (PNM) possuem algumas características que justificam o aumento da sua utilização em pesquisas biomédicas, em detrimento do uso de Primatas do Velho mundo (PVM). Por exemplo, os PNM possuem um ciclo reprodutivo mais curto, algumas espécies produzem partos duplos (Calitriquídeos) e a criação e o manejo são mais simples, envolvendo menor custo financeiro (Ward & Vallender 2012).

Várias espécies neotropicais vêm sendo constantemente ameaçadas, principalmente pelo desmatamento e pela caça. Assim, a criação em cativeiro tornou-se cada vez mais necessária (Mittermeier et al. 1994), tanto para atender à comunidade científica, quanto para a própria manutenção das espécies (Mittermeier et al. 1994, Chiarello et al. 2008). Além disso, ambientes cativos propiciam dados sobre os históricos clínicos e parentesco dos animais avaliados, colaborando significativamente com as pesquisas (Zimblér-Delorenzo & Stone 2011).

A utilização contínua de primatas em pesquisas científicas podem levar ao desenvolvimento de doenças renais, sendo pielonefrite, nefrocalcinose, glomerulonefrite, hidronefrose e doenças funcionais as mais diagnosticadas em primatas do gênero *Saimiri* (Borda et al. 2000a). Com isso, há uma necessidade crescente de métodos diagnósticos precoces de alteração da função renal, haja vista que o prognóstico ruim da doença renal em suas fases avançadas, principalmente com o avanço da idade (Cobrin et al. 2013).

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

a. Gênero *Saimiri*

Os primatas do gênero *Saimiri* se mantêm em grandes grupos na natureza (Brady 2000). São distribuídos em toda a Floresta Amazônica, estendendo-se até a região costeira da América Central (Alfaro et al. 2015). Preferem florestas sazonalmente alagadas e áreas de várzeas, ocupando, principalmente, os dosséis e sub-bosques (Boubli et al. 2013).

As principais espécies de macacos-de-cheiro estudadas são *Saimiri sciureus* e *Saimiri boliviensis* (Brady 2000), havendo relatos de estudos farmacológicos (Liu et al. 2011),

cardiovasculares (Abee 2000, Brady 2000) e neurológicos (Macri et al. 2013). A taxonomia dos Saimiri baseada na morfologia tem sido muito contestada, devido à natureza extremamente sutil das diferenças morfológicas entre os táxons (Alfaro et al. 2015). Outras técnicas para determinação das espécies dos Saimiri incluem a citogenética e análise de DNA (Brady 2000). A característica fenotípica mais utilizada para identificação é a forma da área de pelo não-pigmentado acima dos olhos, além diferenças de coloração do pelo na cabeça e no corpo, que pode variar de sutil a óbvia (Abee 2000).

Em geral, os estudos com Saimiri podem ser realizados apenas com contenção manual. Contudo, nos casos em que há necessidade de sedação ou anestesia, deve-se levar em consideração que a técnica de contenção pode ter efeitos importantes. Os Saimiri têm baixa tolerância a procedimentos prolongados, ou que exijam jejum, em virtude da possibilidade de hipoglicemia (Brady 2000).

Os primatas do gênero Saimiri têm sido especialmente utilizados em estudos farmacológicos (Liu et al. 2011), cardiovasculares (Abee 2000, Brady 2000) e neurológicos (Macri et al. 2013), fazendo-se cada vez mais necessária a manutenção dessa espécie em cativeiro (Mittermeier et al. 1994, Brady 2000). Alguns fatores podem estar relacionados à utilização deste gênero na pesquisa biomédica. Por exemplo, baixo potencial zoonótico, quando comparados aos primatas do Velho Mundo; serem animais de pequeno porte, isso facilita o manejo e diminui os custos com alimentação (Abee 2000).

Nos estudos em que haja necessidade de avaliação de parâmetros hematológicos, como hemograma e bioquímica sanguínea, bem como para realização de medicações e sedação ou anestesia, o acesso venoso pode ser realizado a partir da veia femoral no triângulo femoral. Em primatas de uma forma geral, a coleta de um volume de sangue que corresponda a até 10% do peso do animal em gramas é considerada segura (Almosny e Monteiro, 2006).

Os macacos-de-cheiro criados em cativeiro podem ser acometidos por lesões renais, dentre elas litíase renal, pielonefrite e glomerulonefrite são frequentes em Saimiri boliviensis (Borda et al. 2000b). Contudo, para que o diagnóstico seja preciso e precoce, é necessária a avaliação clínica desses animais, além de exames laboratoriais (hemograma, bioquímica sérica e urinálise, por exemplo) e ultrassonografia.

b. Avaliação Renal

A avaliação renal pode ser realizada através da dosagem de biomarcadores. Um marcador de função renal ideal seria uma substância inerte filtrada livremente, sem

metabolização, secreção ou reabsorção pelos rins (Puzantian & Townsend 2013). O biomarcador deve ser capaz de diagnosticar com precisão tanto as alterações agudas quanto as crônicas (Cobrin et al. 2013), bem como determinar o prognóstico da doença e avaliar a resposta ao um tratamento (Tesch 2010). Além disso, as amostras devem ser obtidas, preferencialmente, por procedimentos não-invasivos ou minimamente invasivos (Tesch 2010).

Dentre os exames bioquímicos séricos, a ureia e a creatinina são os mais utilizados na rotina clínica veterinária (Bush 2004, Endre et al. 2011, Cobrin et al. 2013). Mais recente novos biomarcadores de função renal têm sido testados, a exemplo da Cistatina C (Iwona 2012, Puzantian & Townsend 2013, Ghys et al. 2014).

A ureia é um produto final do catabolismo de proteínas, é sintetizada no fígado, principalmente, a partir de proteína da dieta (Puzantian & Townsend 2013). Ela se acumula no plasma sanguíneo quando a filtração glomerular está prejudicada (Bush 2004). Fatores de origem extra-renal influenciam seus níveis séricos, são eles: dietas ricas em proteínas, medicamentos (corticosteroides e tetraciclina), trauma, hemorragia gastrointestinal, infecções e insuficiência cardíaca (Tesch 2010, Puzantian & Townsend 2013).

A creatinina é um subproduto do metabolismo muscular endógeno. É o marcador de função renal mais amplamente utilizado, tanto na medicina quanto na veterinária. Ela é completamente excretada pela filtração glomerular quando a função renal é normal (Endre et al. 2011, Cobrin et al. 2013, Puzantian & Townsend 2013). Sofre influência de alguns fatores, são exemplos: a idade, o sexo, função hepática, amputações e variações na ingestão alimentar, tais como dieta vegetariana (Tesch 2010, Puzantian & Townsend 2013).

Tanto a ureia quanto a creatinina não são sensíveis para detecção de doença renal precoce, ou em condições de doença rapidamente progressivas, pois só se alteram quando a função renal está muito comprometida, em torno de 75% de perda funcional dos néfrons (Dharnidharka et al. 2002, Laterza et al. 2002, Endre et al. 2011, Cobrin et al. 2013, Puzantian & Townsend 2013, Arthur et al. 2014, Brott et al. 2014). Desta forma, é cada vez mais emergente a determinação de novos marcadores de função renal que podem auxiliar no diagnóstico precoce de alterações renais.

Um desses marcadores é a Cistatina C, uma proteína produzida por todas as células nucleadas, sem influência de fatores extra-renais (Laterza et al. 2002). A Cistatina C é excretada exclusivamente por filtração glomerular (Antognoni et al. 2005, Cobrin et al. 2013, Puzantian & Townsend 2013), permitindo a detecção precoce de redução da taxa de filtração glomerular (Laterza et al. 2002, Cobrin et al. 2013, Puzantian & Townsend 2013). Alguns

estudos indicam que a Cistatina C pode sofrer influencia da idade (Monti et al. 2012, Puzantian & Townsend 2013), podendo estar relacionado à redução da função renal fisiológica com o avanço da idade, além disso fatores como sexo e tamanho também podem influenciá-la (Rule et al. 2006).

Dentre outros biomarcadores para avaliação de lesão renal em estudo, a albumina urinária é considerada um significativo marcador prognóstico (Tesch 2010, Puzantian & Townsend 2013). N-acetil β -D-glucosaminidase (NAG), γ -Glutamil Transferase (GGT), Molécula de Injúria Renal-1 (KIM-1), Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL) têm sido utilizadas na avaliação de lesão tubular, principalmente em doença renal aguda (Cobrin et al. 2013). Enquanto a Proteína de Ligação ao Retinol (RBP) tem sido mais utilizada nas avaliações de doença renal crônica (Jungbauer et al. 2011, Cobrin et al. 2013).

Além das provas de bioquímica sérica e urinária, a ultrassonografia pode ser realizada para complementar a avaliação renal em colônias de primatas. Esse exame é útil para determinação, em tempo real, das dimensões, forma, contornos, localização e avaliação da arquitetura interna pela presença de alterações focais (sólidas ou císticas) (Nyland & Matton 2002). A ultrassonografia do trato urinário tem sido largamente utilizada em medicina veterinária em diversas situações clínicas, complementando informações obtidas pelos exames clínico e laboratorial, sendo de fundamental importância para avaliação de afecções renais (Gaschen et al. 2000, Sampaio & Araújo 2002).

Alterações na forma e tamanho dos rins, sejam uni ou bilaterais, podem representar distúrbios renais. A redução do tamanho renal frequentemente está associada à nefrite intersticial crônica e a estenose da artéria renal, enquanto pielonefrite aguda, a doença policística e a hidronefrose podem levar ao aumento do tamanho dos rins (Sampaio & Araújo 2002).

Assim, objetivou-se determinar os níveis séricos fisiológicos de biomarcadores renais (ureia, creatinina e Cistatina C) e promover a avaliação ultrassonográfica dos rins da espécie *Saimiri collinsi* criados em cativeiro.

1 **Title:** Renal evaluation of squirrel monkey (*Saimiri collinsi*) by serum biochemistry and
2 ultrasonography

3 **Running Title:** Renal evaluation of squirrel monkey

4 Fernanda Luiza de Miranda Lins e Lins¹, Ednaldo Silva Filho¹; Aline Amaral Imbeloni^{1,2};
5 Wellington Bandeira da Silva^{1,2}; Maria Vivina Barros Monteiro³; Diana Célia Sousa
6 Nunes-Pinheiro⁴; Frederico Ozanan Barros Monteiro^{1*}

7 ¹ Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Programa de Pós-graduação em Saúde
8 e Produção Animal (PPGSPAA), Belém, PA, Brasil.

9 ² Centro Nacional de Primatas (CENP), Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da
10 Saúde, Ananindeua, PA, Brasil

11 ³ Universidade Federal do Pará (UFPA), Faculdade de Medicina Veterinária, Castanhal, PA,
12 Brasil.

13 ⁴ Universidade Estadual do Ceará (UECE), Programa de Pós-graduação em Ciências
14 Veterinárias (PPGCV), Fortaleza, CE, Brazil.

15 *Correspondence to: Professor Frederico Ozanan Barros Monteiro

16 Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) / Instituto da Saúde e Produção Animal
17 (ISPA). Avenida Presidente Tancredo Neves, Nº 2501. Bairro: Terra Firme Cep: 66.077-
18 901. Belém-Pará-Brazil. Phone: +55 91 32105261, Fax +55 91 32105256

19

20 **Abstract**

21 **Background** The objective was to determine renal parameters (urea, serum creatinine – SCr,
22 uric acid – UA, and Cystatin C – CysC) and promote ultrasonography of the kidneys in
23 relation to body length/mass, gender, and age group of *Saimiri collinsi* raised in captivity.

24 **Methods** Thirty monkeys were divided into two age groups: AG1 (young adult) and AG2
25 (senile). Urea, SCr, and UA tests were performed with kits Abbott in a System C4000 and
26 by immunonephelometry with kit N Latex (CysC). A multiple frequency linear array probe
27 (5–12 MHz) was used to performing ultrasound exams.

28 **Results and conclusions** Gender and age did not influence the results of the Urea, UA, and
29 CysC. However, the body length/mass, and SCr concentration are influenced by the gender.
30 In addition, this study provides ultrasonographic measurement reference values for the
31 morphology the kidneys. All data obtained can be used as reference intervals in healthy *S.*
32 *collinsi*.

33 **Key words:** *Saimiri*; renal biomarkers; ultrasound

34 **Introduction**

35 The constant use of primates in biomedical research can lead to the development of
36 renal, hepatic, cardiovascular diseases, among others. For instance, in squirrel monkeys
37 raised in captivity, more renal diseases described were urolithiasis, pyelonephritis, and
38 glomerulonephritis [3]. In humans, the frequency of nephrolithiasis by uric acid stones
39 varied with age, gender, geographic location, and local environmental factors [23].

40 Consequently, when a renal diseases diagnosis is considered, a serum blood analysis of
41 urea, creatinine (SCr), and uric acid (UA) should be determined.

42 An ideal renal function marker would be an inert substance, freely filtered without
43 metabolism, secretion or reabsorption by the kidneys [27], and able to accurately diagnose
44 acute and chronic changes [6]. Serum biochemical tests for assessment of renal function,
45 such as the urea [5, 6], SCr [6, 9], are widely used in both medicine and in veterinary.
46 However, the possibility of new biomarkers of renal function has been reported in the
47 literature, in particular Cystatin C (CysC) [12, 15, 27]. It is a protein produced by nucleated
48 cells without influence of extrarenal factors [18] and excreted exclusively by glomerular
49 filtration [2, 6, 27]. This allows for early detection of loss of kidney function [6, 18, 27].

50 In addition, interpretation of imaging diagnostic technologies, such as
51 ultrasonography, are necessary to describe the renal morphophysiology. This exam is useful
52 to determine, in real time, the size, shape, contour, location and evaluation of the internal
53 architecture of the presence of focal changes (solid or cystic) [24].

54 The possibility of combining laboratory and image diagnostic methods contributes
55 to a better understanding of the physiology and aids in diagnosing kidney diseases. The
56 objective was to determine physiological serum concentration of urea, SCr, UA and CysC
57 and promote ultrasonography of the kidneys of *Saimiri collinsi* raised in captivity. The
58 hypothesis was that under standard conditions of housing, the organism's age and sex
59 might influence these parameters.

60 **Material and Methods**

61 Study site and subjects

62 This study was conducted between March 2013 and February 2015. All procedures
63 followed the guidelines for the care and use of laboratory animals and was approved by the
64 Ethics in Research with Animals Committee of the Evandro Chagas Institute (CEPAN/IEC
65 0030/2013) and System for Authorization and Information on Biodiversity/Chico Mendes
66 Institute for Biodiversity (SISBIO/ICMBIO 38529-1). All subjects belonged to the
67 breeding colony of the National Primate Center (CENP) in Brazil and were identified using
68 a three-letter code tattooed on the internal face of the right thigh and a microchip placed in
69 the interscapular area.

70 There were evaluated 30 adults squirrel monkeys (*Saimiri collinsi*, 16 males and 14
71 females). They were divided into two age groups [AG1 young adult, 3 – 7 years, (n=15; 8
72 males and 7 females)] e AG2 [senile 14 – 17 year (n=15; 8 males and 7 females)]. Subjects
73 were housed in groups (1 male: 6 females) of up to 12 individuals. They were kept in
74 enclosures constructed of brick and covered with tiles and wire netting, which were
75 positioned in a north–south orientation to receive 12 hours of natural light, thereby
76 providing a regular access to the sun throughout the year. The cages measured 3 m in
77 length, 3 m in width, and 3 m in height. The grounds had a double lateral communication-
78 controlled sliding door, which was used for management of the group.

79 The animals were fed according to the standard husbandry practices of the CENP.
80 The animals' diet contained different kinds of fruits and vegetables, eggs, milk, and
81 commercial primate food with 18% crude protein (Cebidae P18 Megazoo, Rações
82 Megazoo, Betim, Minas Gerais, Brazil). It was also provided a daily supplementation of
83 amino acids, vitamins, macro and micro minerals, and 0.5 g of Aminomix Pet[®] (Vetnil Ind.
84 and Company, Produtos Veterinários Ltda, Louveira, São Paulo, Brazil) per kg of body

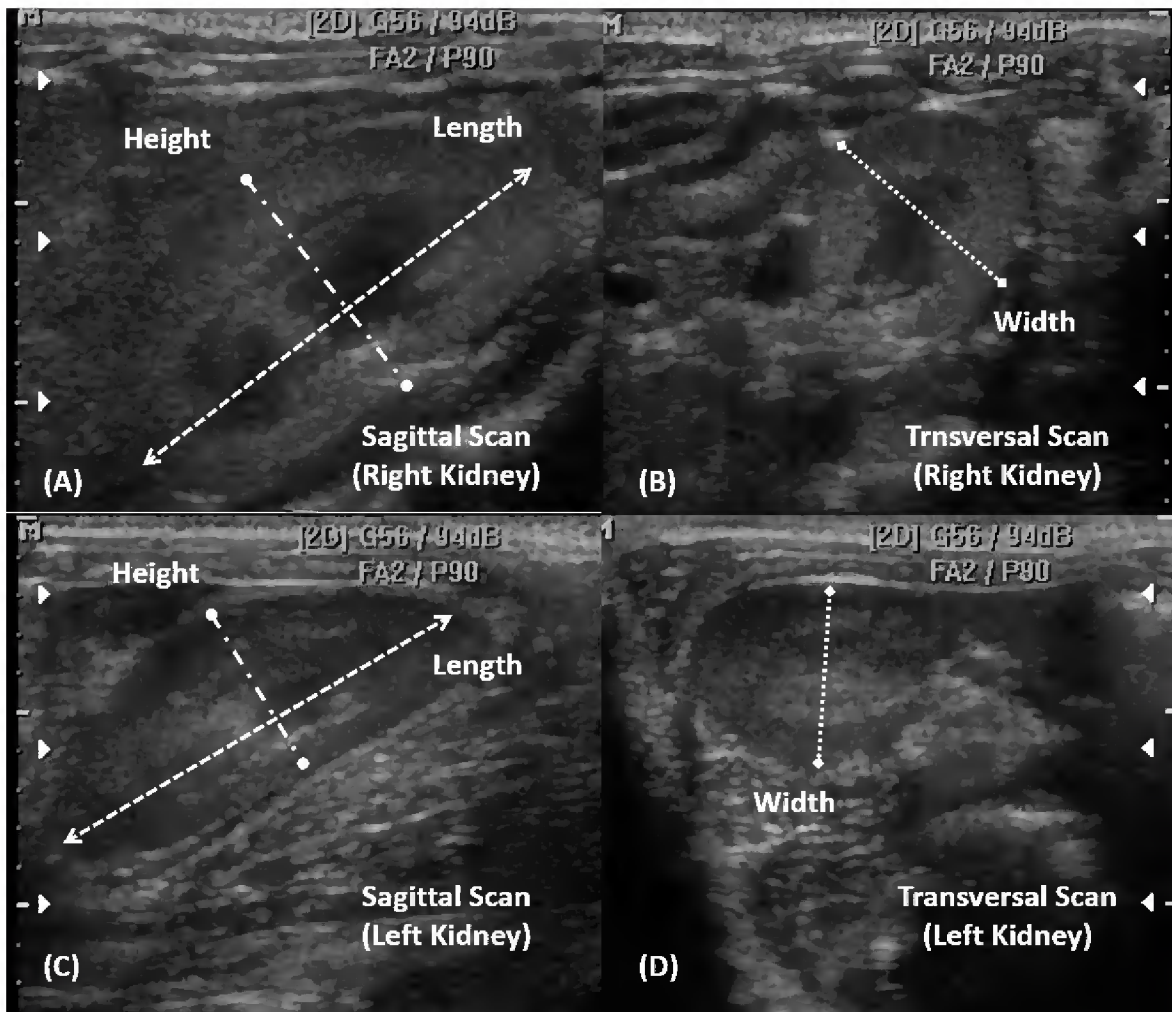
85 mass. Water was offered “ad libitum”. Only manual restraint was used to collect blood
86 samples and performing the ultrasound examinations.

87 Serum Chemistry Profile

88 Blood samples (3 ml) were collected from the femoral vein with sterile syringe
89 needles. Urea, SCr, and UA tests were performed with kits (Abbott Laboratories,
90 Wiesbaden, Germany) in a System C4000 Architect® (Tecnigen S/A. Av. Zañartu, Nuñoa,
91 Santiago, Chile). CysC tests were performed by immunonephelometry with kit N Látex
92 CysC Siemens® (Siemens Ltda, Av. Mutinga, São Paulo, SP, Brazil) according to Cordeiro
93 et al. [7]. A sample aliquot was stored at -20°C, and it was subsequently analyzed by
94 particle-enhanced nephelometric immuno-assay (PENIA). Hemolysis, icteric, or lipemic
95 serum were not analyzed.

96 Ultrasonography

97 Each kidney was examined according to Lins et al. [19], i.e. in the sagittal and
98 transverse planes in order to evaluate their shape, echogenicity, echotexture, and size. Renal
99 length (L) and height (H) were measured (cm) from sagittal scans (right and left kidney,
100 Fig.1A and 1C, respectively) and the width (W) at the hilus was measured (cm) from
101 transverse scans (right and left kidney, Fig. 1B and 1D, respectively). Renal volume (V)
102 was calculated (cm³) with the onboard computer by approximating the spheroidal
103 geometric model from the three linear measurements ($L \times H \times W \times \pi / 6$).



104

105 **Fig. 1** Measurements of the right kidney from sagittal (A) and transversal scans (B). Length
 106 and height were measured in the sagittal scan (A and C) and width in the transversal scan
 107 (B and D). The calculated renal volume was an approximation based on a spheroidal
 108 geometric model that incorporated the length, height, and width measurements.

109 Statistical method

110 Descriptive statistics (mean, variance, standard deviation) was calculated for all the
 111 variables. Parameters of urea, SCr, UA, CysC, and renal measurements by ultrasonography
 112 were tested for normal distribution (Gaussian) using the Kolmogorov-Smirnov test. It was

113 used the Tukey test post hoc multiple comparison tests to compare the difference in the
114 effect of gender and age on the variables. In addition, it was performed Pearson correlation
115 to compare body length/mass and the results of the urea, SCr, UA, and CysC. A level of
116 significance of 0.05 was adopted for all tests, which was calculated with the aid of the
117 BioEstat software (version 5.0; Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, Pará, Brazil).

118 **Results**

119 Mean body mass was lower in AG1 than in AG2, but did not differ between two age
120 groups ($p>0.05$). However, when the analysis was performed independently of age, male
121 was significant heavier than female. Biochemical tests showed Gaussian distribution, and
122 reference ranges have been established with of 95% of confidence (Table 1). Urea, UA, and
123 CysC concentrations did not differ between gender or age groups and no relationship was
124 observed with body length and mass ($p>0.05$). However, males present SCr concentrations
125 higher than female (0.71 ± 0.08 ; 0.65 ± 0.08 mg/dl, respectively). In addition, SCr
126 demonstrate positive correlation with body length and mass ($r = 0.39$; $p<0.05$; $r = 0.67$,
127 $p<0.05$, respectively).

128

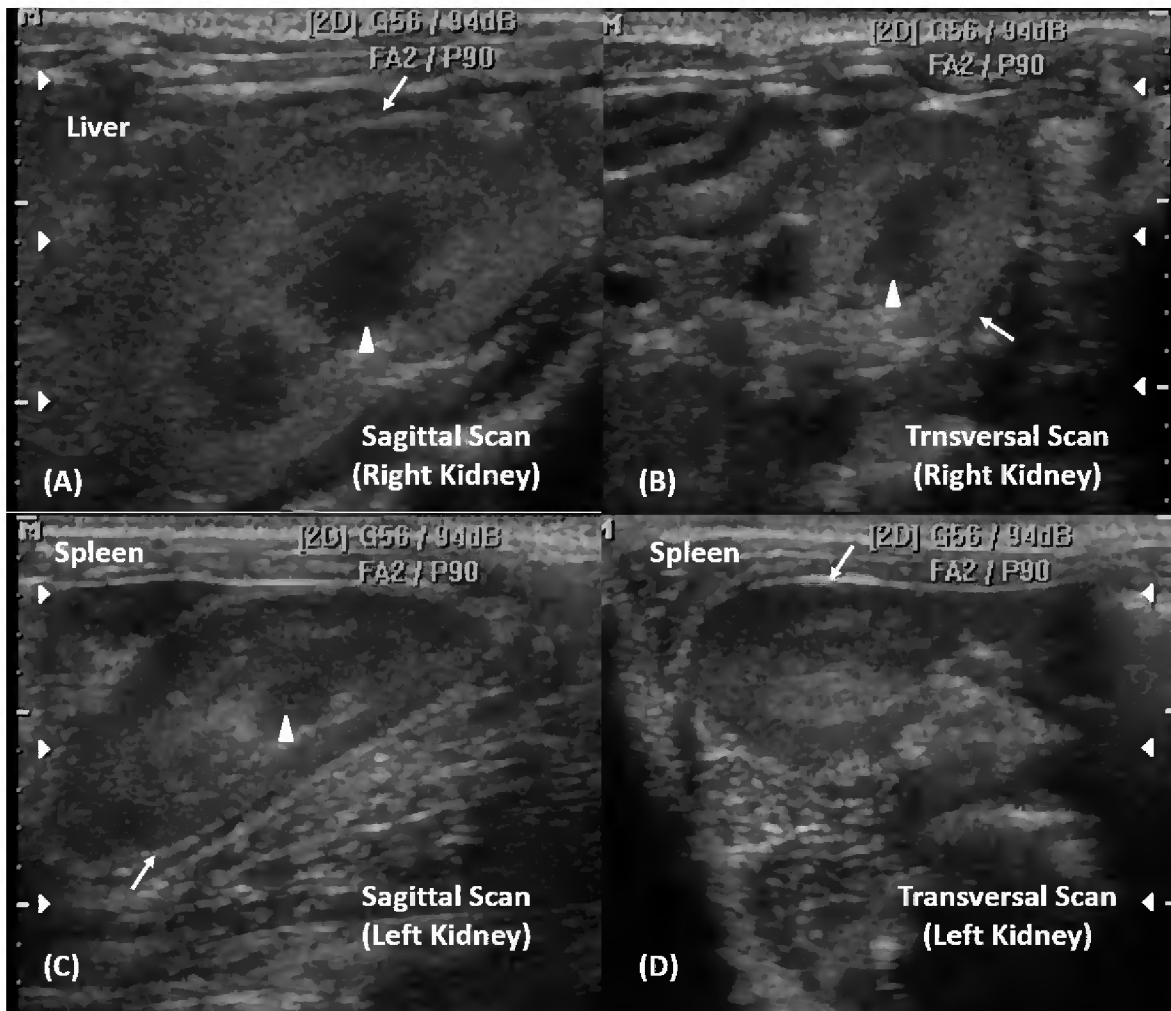
129 **Table 1** Mean \pm Stand derivation of body length/mass, urea, serum creatinine (SCr),
 130 uric acid, and cystatin C (CysC) of 30 Saimiri collinsi individuals, categorized by gender,
 131 age group (AG) and reference ranges (minimum - maximum).

Variables	Gender	AG1 (n=15) (3 – 7 years)	AG2 (n=15) (14 – 17 years)	AG1 & AG2 (N=30)	Reference 95% (Min. – Max.)
Body leght (cm)	♂	28.00 \pm 3.70	29.50 \pm 1.51	28.75 ^a \pm 2.84	23.07 – 34.43
	♀	26.14 \pm 1.35	26.57 \pm 0.99	26.36 ^b \pm 1.15	24.06 – 28.66
	♂♀	27.13 \pm 2.92	28.13 \pm 1.96	-	-
Body mass (Kg)	♂	0.87 \pm 0.28	1.03 \pm 0.20	0.95 ^a \pm 0.25	0.45 – 1.45
	♀	0.60 \pm 0.03	0.64 \pm 0.07	0.62 ^b \pm 0.05	0.52 – 0.72
	♂♀	0.75 \pm 0.25	0.85 \pm 0.25	-	-
Urea (mg dl ⁻¹)	♂	82.88 \pm 9.70	72.25 \pm 10.25	77.56 \pm 10.06	
	♀	70.86 \pm 9.53	80.14 \pm 8.14	75.50 \pm 10.74	55.90 – 97.30
	♂♀	77.27 \pm 11.46	75.93 \pm 9.41	-	
SCr (mg dl ⁻¹)	♂	0.71 \pm 0.10	0.70 \pm 0.05	0.71 ^a \pm 0.08	0.56 – 0.85
	♀	0.64 \pm 0.05	0.65 \pm 0.07	0.65 ^b \pm 0.08	0.54 – 0.76
	♂♀	0.68 \pm 0.08	0.68 \pm 0.06	-	-
Uric acid (mg dl ⁻¹)	♂	0.31 \pm 0.16	0.22 \pm 0.13	0.27 \pm 0.15	
	♀	0.31 \pm 0.11	0.23 \pm 0.19	0.27 \pm 0.15	0.00 – 0.58
	♂♀	0.31 \pm 0.14	0.22 \pm 0.16	-	
CysC (mg dl ⁻¹)	♂	0.59 \pm 0.10	0.61 \pm 0.05	0.62 \pm 0.10	
	♀	0.57 \pm 0.08	0.67 \pm 0.12	0.60 \pm 0.10	0.42 – 0.79
	♂♀	0.58 \pm 0.08	0.64 \pm 0.10	-	

132 ♂, Male, ♀, Female, ♂♀, Male and Female; mg dl⁻¹ – miligram per decilitre. Means with
 133 different letters represent comparison between lines p <0.05 by Tukey test.

134 In all subjects the sonographic evaluation demonstrated that the kidneys were
 135 located in an anatomical position, with the right kidney slightly more cranial than the left.
 136 Right kidney was in contact with the right lobe of the liver (Fig. 2A e Fig. 2B) and left
 137 kidney was located between the abdominal aorta and spleen (Fig. 2C e Fig.2D). Both
 138 kidneys showed regular contours, elliptical shape and homogeneous echotexture.
 139 Furthermore, the cortical area was more echogenic medullary, with a clear demarcation in
 140 echogenicity in the corticomedullary junction (Fig. 2). The central region, formed by the

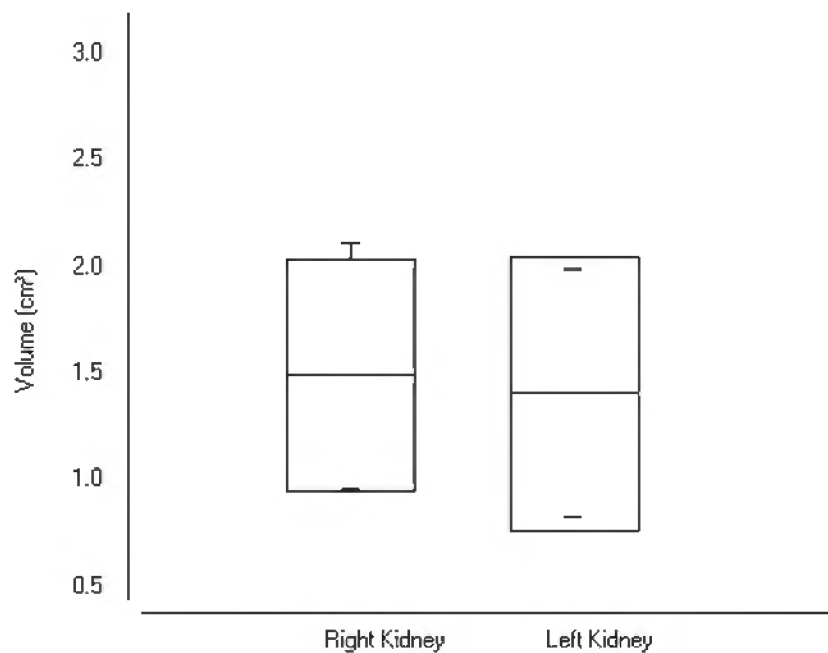
141 breast and renal pelvis, has performed more echogenic due to the vessel wall and the
 142 entrance to the renal hilum. It was also observed that the right and left renal cortices were
 143 more echogenic compared to the liver and spleen, respectively.



144

145 **Fig. 2** (A) Sagittal section of right kidney compared to the liver. The right kidney showed
 146 up hyperechoic in relation to the liver when the liver and the kidney were cranial pole
 147 contact. (B) Transversal section of right kidney. (C) Sagittal section of the left kidney, the
 148 spleen was hyperechoic compared to left kidney. (D) Transversal section of the left kidney.
 149 Arrows show the kidney capsule, and arrowheads show the renal pelvis.

150 The renal morphometric parameters shown Gaussian distribution with reference ranges
151 established with 95% confidence. Sonographic measurements of the kidneys showed that
152 only the width of the right kidney was different between the age groups. However, this
153 difference was not enough to cause difference in renal volume compared between age
154 groups (Fig. 3). In comparison between the sides, there was a significant difference in the
155 length, but this was not enough to cause difference in renal volume compared between the
156 sides (Table 2).



157

158 **Fig. 3** Comparison of the mean \pm stand derivation of the volumes in right and left kidneys
159 of in males and females of *Saimiri collinsi* (1.50 ± 0.27 ; 1.41 ± 0.32 cm³, respectively).

160 **Table 2** Renal ultrasonography variables of *Saimiri collinsi* expressed as mean \pm standard deviation according to gender and age
 161 groups (young adult - AG1 and senile - AG2).

Variables	Gender	Right kidney			Left kidney		
		AG1 (n=15) (3 – 7 years)	AG2 (n=15) (14 – 17 years)	AG1 & AG2 (N=30)	AG1 (n=15) (3 – 7 years)	AG2 (n=15) (14 – 17 years)	AG1 & AG2 (N=30)
Length (cm)	♂	2.25 \pm 0.18	2.23 \pm 0.10	2.24 ^a \pm 0.13	2.18 \pm 0.13	2.16 \pm 0.15	2.17 ^a \pm 0.13
	♀	2.08 \pm 0.11	2.17 \pm 0.08	2.13 ^b \pm 0.14	2.03 \pm 0.12	2.03 \pm 0.07	2.03 ^b \pm 0.13
	♂♀	2.17 \pm 0.17	2.20 \pm 0.09	2.19 ^{A*} \pm 0.13	2.11 \pm 0.14	2.10 \pm 0.13	2.11 ^{B*} \pm 0.14
Height (cm)	♂	1.11 \pm 0.11	1.10 \pm 0.11	1.10 \pm 0.09	2.18 \pm 0.11	2.16 \pm 0.13	1.06 \pm 0.13
	♀	1.03 \pm 0.06	1.07 \pm 0.06	1.05 \pm 0.08	2.03 \pm 0.09	2.03 \pm 0.15	1.09 \pm 0.12
	♂♀	1.07 \pm 0.10	1.09 \pm 0.08	1.08 \pm 0.09	1.06 \pm 0.10	1.10 \pm 0.14	1.08 \pm 0.12
Width (cm)	♂	1.20 \pm 0.10	1.27 \pm 0.11	1.24 ^a \pm 0.09	1.16 \pm 0.10	1.25 \pm 0.11	1.21 \pm 0.12
	♀	1.12 \pm 0.10	1.20 \pm 0.04	1.16 ^b \pm 0.09	1.13 \pm 0.13	1.12 \pm 0.10	1.12 \pm 0.11
	♂♀	1.16 ^A \pm 0.11	1.24 ^B \pm 0.09	1.20 \pm 0.10	1.15 \pm 0.11	1.19 \pm 0.13	1.17 \pm 0.12
Volume (cm ³)	♂	1.58 \pm 0.32	1.64 \pm 0.26	1.61 ^a \pm 0.28	1.42 \pm 0.32	1.54 \pm 0.35	1.48 \pm 0.33
	♀	1.27 \pm 0.21	1.46 \pm 0.13	1.37 ^b \pm 0.19	1.28 \pm 0.28	1.36 \pm 0.32	1.32 \pm 0.29
	♂♀	1.43 \pm 0.31	1.56 \pm 0.22	1.50 \pm 0.27	1.36 \pm 0.30	1.46 \pm 0.34	1.41 \pm 0.32

162 ♂, Male, ♀, Female, ♂♀, Male and Female. Lowercase letters indicate a comparison between gender in the same kidney and age
 163 group. Capital letters with asterisk indicate a comparison between kidney independently of gender and age groups. Capital letters
 164 without asterisk indicate a comparison between age groups of the same kidney independently of gender. Means with different
 165 letters represent significant Tukey's test results with $P < 0.05$.

Discussion

Renal assessment using ultrasonography associated with serum levels of urea and creatinine have been reported in the literature for *Aotus azarai infulatus* [19]. The serum levels of UA in primates were performed on species from the New and Old World [8]. Studies using new biomarkers of renal function, especially CysC, have been described in humans [22, 26, 29], dogs [6], and cats [12]. However, for NHP there is only a verification of CysC assay in serum of cynomolgus monkey [25]. Thus, studies to determine the reference range of this biomarker in primates show up pioneers and can be useful in veterinary practice in the early detection of kidney disease in the species *S. collinsi*.

The lack of variation in serum urea between gender and age groups observed in this study was also described in *A. a. infulatus* [20]. The authors attributed the result to the absence of changes in extra-renal factors (food and concomitant diseases) able to influence them. In humans, it has been observed that excessive protein intake increased rates urea [32] and UA [23]. In *Cebus* [17] and *M. radiata* [28] males showed higher urea concentrations than in females.

In the present study we observed effect of gender in SCr concentrations. The same change was observed in *A. a. infulatus* [19, 33] and in human [16]. The elevation of SCr may be related to length and body mass difference between genders observed in this and other studies with squirrel monkey [31], capuchin monkey [30], and macaques [28]. It was observed increase in SCr concentrations with increasing age in *Pan troglodytes* [34] and *A. a. infulatus* [19]. These authors reported that occurs physiological reduction in renal function in aged animals, however this was not observed in this study.

Serum determination of UA should be taken into account during renal evaluation, because, in humans, uric acid calculi account for a significant percentage of urinary stones, second only to calcareous stones [23]. In this study the serum mean concentration of UA was $(0.27 \pm 0.15\text{mg/dl})$, similar to *S. sciureus* (0.5mg/dl), genus *Macaca* and *Papio* ($0.3 - 0.5\text{mg/dl}$). However, this data were very different to other New World Primates, such as *Cebus albifrons* (3.3mg/dl), *C. apella* (2.8mg/dl), *Lagothrix lagotricha* (3.1mg/dl), *Saguinus oedipus* (2.1mg/dl) [8]. These authors related that the low concentrations of UA in serum and urine of *Saimiri* are in marked contrast with the values found in all other South American species examined.

In this study, it was not observed influence of age, length and body mass on the values obtained for CysC. These results differ from those found for canine species, which demonstrated significantly lower CysC concentrations in young animals and weighing less than 15 kg [4]. In human, serum concentration CysC may be higher in infants due to immaturity of the nephron to perform glomerular filtration and was progressively decreased reaching adult values in the first year of life [10]. In dogs [4, 21] and cats [13] gender did not influence the serum CysC. Low biological variation of CysC is an important advantage over the SCr and demonstrates that it is not necessary to establish specific reference ranges for males and females [13]. These findings are similar to results of this study. However further studies are needed to evaluate the efficiency of CysC as renal biomarker for the species *S. collinsi*.

The sonographic appearance of the kidneys was similar to that described for other primates *A. a. infulatus* [19], *M. fascicularis* [11], *C. apella* [1], and *Callithrix jacchus* [35]. Increased echogenicity of the cortical region compared to medullar can be explained by the

glomeruli in the renal cortex, while the medullar layer is composed of the most tubules collecting system, having larger amount of liquid component [1, 19]. The kidneys of *A. a. infulatus* [19], *C. apella* [1], and *M. mulatta* [14] showed symmetry and no influence of gender, similar to our results. A study with *C. jacchus*, the authors report differences in craniocaudal diameter of males and females rights kidneys [35], while renal ultrasonography of *M. fascicularis* showed differences in the shapes of right and left kidneys [11]. These variations may be related to the applied methodology, because unlike our experiments were not conducted three measurement plans to determine kidney volume more accurately.

The results showed that ultrasonography is useful in renal evaluation and can be coupled to the biochemical tests, in order to providing more accurate data for making clinical decisions. In addition, the gender and age do not influence urea, UA, and CysC. However, the body length/mass, and SCr concentration are influenced by the gender in *S. collinsi* raised in captivity.

Acknowledgments

We are grateful to the National Primate Center (CENP), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), CAPES and CNPq (Procad/Casadinho 06/2011, and Chamada Universal 14/2012, Faixa A) for their support. We also thank to Maria Vania Feijó Cordeiro from Albert Sabin Hospital (Serviço de Patologia Clínica - HIAS/SESA), for analyzes of CysC.

References

1. Alves FR, Costa FB, Arouche MMS, Barros ACE, Miglino MA, Vulcano LC, Guerra PC: Avaliação ultra-sonográfica do sistema urinário, fígado e útero do macaco-prego, *Cebus apella*. *Pesq Vet Bras* 2007; **27(9)**:377-82.
2. Antognoni MT, Siepi D, Porciello F, Fruganti G: Use of serum Cystatin C determination as a marker of renal function. *Vet Res Communication* 2005; **29**:265-7.
3. Borda JT, Nunes-Bastos V, Pérez-Escalá S, Sánchez-Negrette M: Histopathological characterization of nephritides in the brown capuchin monkey, *Cebus apella* (Primates: Cebidae). *Rev Biol Trop* 2000; **48(1)**:255-60.
4. Braun JP, Perxachs A, Pe´Chereau D, De La Farge F: Plasma cystatin C in the dog: reference values and variations with renal failure. *Comp Clinic Path* 2002; **11**:44-9.
5. Bush, BM: Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. São Paulo, Brazil: Editora Roca, 2004. 376.
6. Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C: Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *J Small Anim Pract* 2013; **54**:647–55.
7. Cordeiro VF, Pinheiro DC, Silva GB Jr, Lima JW, Mota RM, Libório AB, Daher EF: Comparative study of cystatin C and serum creatinine in the estimative of glomerular filtration rate in children. *Clin Chim Acta* 2008; **391**:46-50.
8. Christen P, Peacock WC, Christen AE, Wacker, WEC: Urate oxidase in primates phylogenesis. *Eur. J. Biochem* 1970; **12**:3-5.

9. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ: Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **301**:697–707.
10. García MF, Coll E, Pedret SV, Guitarte CB, Fernández MCC, Rius MC, Montes MG, Martínez-Brú C, Surribas DP, González TR, Ortiz CV, Contreras JAV, Muñiz EZ: Cistatina C en la evaluación de la función renal. *Rev Lab Clín* 2011; **4(1)**:50-62.
11. Gaschen L, Menninger K, Schuurman HJ: Ultrasonography of the normal kidney in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): morphologic and Doppler findings. *J Med Primatol* 2000; **29**:76–84.
12. Ghys L, Paepe D, Smets P, Lefebvre H, Delanghe J, Daminet S: Cystatin C: a new renal marker and its potential use in small animal medicine. *J Vet Intern Med* 2014; **28(4)**:1152-64.
13. Ghys L, Paepe D, Duchateau L, Taffin ERL, Marynissen S, Delanghe J, Daminet S: Biological validation of feline serum cystatin C: The effect of breed, age and sex and establishment of a reference interval. *Vet J* 2015; **205**:168-173.
14. Hill LR, Hess KR, Stephens LC, Price RE, Gray KN: Correlation of kidney weight and volume and selected skeletal parameters to sex in the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol* 2001; **30**:56–60.
15. Iwona PK: Usefulness of serum cystatin c measurement for assessing renal function in cats. *Bull Vet Inst Pulawy* 2012; **56**:235-9.
16. Jin R, Grankemeier GL, Brown JR, Furnary AP: Estimated glomerular filtration rate and renal function. *Ann Thorac Surg* 2008; **86**:1–3.

17. Larsson MHMA, Lucas SRR, Mirandola RMS, Lazaretti P, Fedulho JDL, Guimarães MABV: Valores de referência das provas de funções hepática, renal e de alguns eletrólitos em *Cebus apella*, anestesiados com cetamina. *Cienc Rural* 1997; **27**: 257-62.
18. Laterza OF, Price CP, Scott MG: Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002; **48(5)**:699–707.
19. Lins FL, Monteiro FO, Takeshita RS, da Silva GA, Faturi C, Palha MD, Monteiro MV, Coutinho LN, Kugelmeier T, de Castro PH: Renal evaluation of *Aotus azarai infulatus* by ultrasonography and serum chemistry profile. *Am J Primatol* 2012; **74(5)**:482-90.
20. Monteiro FOB, Coutinho LN, Araujo KF, Monteiro MVB, Castro PHG, Silva KSM, Benigno RNM, Vicente WRR: Biochemical and haematological parameters in owl monkeys infected and uninfected with *Trypanoxyuris* sp. *J helminthol* 2009; **83(3)**:225-9.
21. Monti P, Benchekroun G, Berlato D, Archer J: Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. *J Small Anim Pract* 2012; **53**:254–9.
22. Nejat M, Pickering JW, Walker RJ, Endre ZH: Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**:3283–9.
23. Ngo TC, Assimos DG. Uric Acid Nephrolithiasis: recent progress and future directions. *Rev Urol*, 2007; **9**:17:27.
24. Nyland TG, Matton JS: Small animal diagnostic ultrasound. W.B. Saunders, Philadelphia, 2002.

25. Perigard CJ, Foley JP, Davoy HR, Nichols WJ, Courtwright PA, Walker DB: Verification of an automated cystatin c assay for cynomolgus monkey serum. *Vet Clin Path* 2010; **39(4)**:520-33.
26. Pucci L, Triscornia S, Lucchesi D, Fotino C, Pellegrini G, Pardini E, Miccoli R, Del Prato S, Penno G: Cystatin C and Estimates of Renal Function: Searching for a Better Measure of Kidney Function in Diabetic Patients. *Clin Chem* 2007; **53(3)**:480–8.
27. Puzantian HV, Townsend RR: Understanding kidney function assessment – The basics and advances. *J Am Assoc Nurse Pract* 2013; **25**: 334–41.
28. Ramachandra SG, Ramesh V, Krishnamurthy HN, Ravindranath N, Shetty KT: Normal hematological and plasma biochemical parameters of the captive bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Primates* 1998; **39(2)**:127-34.
29. Risch L, Blumberg A, Huber A: Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**:1991-6.
30. Riviello MC, Wirz A: Haematology and blood chemistry of *Cebus apella* in relation to sex and age. *J Med Primatol* 2001; **30**:308–12.
31. Schuler AM, Abee CR: Squirrel Monkeys (*Saimiri*). In: Enrichment for nonhuman primates. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 05, 2005; 5749.
32. Shavit L, Lifschitz M, Galperin I: Influence of enteric nutrition on blood urea nitrogen (BUN) in very old patients with chronic kidney disease (CKD). *Arch Gerontol Geriatr* 2012; **54(1)**:228-31.

33. Takeshita RS, Monteiro FO, Lins FL, da Silva GA, Faturi C, Coutinho LN, Monteiro MV, Kugelmeier T, Castro PH, Muniz JA: Hematological, hepatic, and renal evaluation in *Aotus azarai infulatus*. *J Med Primatol* 2011; **40(2)**:104-10.
34. Videan EN, Fritz J, Murphy J: Effects of Aging on Hematology and Serum Clinical Chemistry in Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am J Primatol* 2008; **70**:327–38.
35. Wagner WM, Kirberger RM: Transcutaneous ultrasonography of the abdomen in the normal common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vet Radiol Ultrasound* 2005; **46**:251-8.