



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

TAIANARA TOCANTINS GOMES ALMEIDA

INFLUÊNCIA DE DIETA COM GLÚTEN SOB PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
EM *Saguinus fuscicollis* DE CATIVEIRO

BELÉM
2016



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

TAIANARA TOCANTINS GOMES ALMEIDA

INFLUÊNCIA DE DIETA COM GLÚTEN SOB PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
EM *Saguinus fuscicollis* DE CATIVEIRO

Trabalho de dissertação apresentado 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 e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro

BELÉM

2016

Almeida, Taianara Tocantins Gomes

Influência de dieta com glúten sob parâmetros hematológicos em *Saguinus fuscicollis* de cativeiro. Taianara Tocantins Gomes Almeida. –Belém, 2016.

67f.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia/ Saúde e Meio Ambiente) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2016.

1.Glúten 2.Inflamação em Primatas 3. Hemograma em Primatas 4. Bioquímica Sérica em Primatas

CDD: 634.99



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

TAIANARA TOCANTINS GOMES ALMEIDA

INFLUÊNCIA DE DIETA COM GLÚTEN SOB PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
EM *Saguinus fuscicollis* DE CATIVEIRO

Trabalho de dissertação apresentado 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 e Meio ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro

Aprovado em 30 de Maio 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - CASTANHAL

Prof. Dra. Ana Silvia Sardinha Ribeiro - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - CASTANHAL

Dedico este trabalho ao meu maior ícone de admiração acadêmica e de vida, meu marido, Ednaldo da Silva Filho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Ednaldo da Silva Filho, pela incansável dedicação e persistência no sonho desta minha titulação. Pelas cobranças, pelas noites em claro, pelos conselhos, pelo carinho, por tudo que esteve ao meu alcance sempre pensando no meu melhor e como prova de amor. Obrigada por acreditar e me incentivar.

Ao meu orientador, com muito carinho e a admiração, professor Dr. Frederico Ozanan Barros Monteiro, que foi paciente e me orientou quando sempre precisei. Obrigada professor por contribuir para meu crescimento acadêmico e pessoal, com sua competência e personalidade serena e correta.

À equipe do Centro Nacional de Primatas, com destaque aos veterinários Wellington Bandeira e Aline Imbeloni por sempre se mostrarem disponíveis para atividades deste projeto. E com especial carinho às técnicas em manejo do galpão de experimento, Carol, Débora e Vanisa pela dedicação na execução deste.

À professora Dra. Maria Vivina Barros Monteiro por me auxiliar sempre com doçura e competência e pela cooperação nas análises bioquímicas, juntamente com o técnico Sr. Antônio do laboratório da UFPA-Castanhal.

Ao Programa de Pós Graduação Saúde e Produção Animal na Amazônia por me receber e entender as minhas limitações. E por me proporcionar crescimento profissional e oportunidade de ser bolsista do programa da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior.

Aos membros da banca, Dra. Ana Silvia Sardinha Ribeiro, Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues e Dr. Leandro Nassar Coutinho pelas contribuições e ajustes no trabalho.

Aos professores por excelência no ensino, mesmo quando as condições não eram propícias. Ao professor Dr. Luiz Fernando pelos conselhos e amparos nos momentos difíceis. Aos meus colegas de curso, por amizade sincera e compartilhamento de bons momentos. E ao secretário, Jaime, por infinita paciência e sempre disponível para que tudo fosse resolvido com agilidade.

A minha família, pela confiança, amor e amparo sempre. Mesmo na distância foram presentes e porto seguro. Meus pais, Dagoberto e Soraia, meus irmãos Tassila e Taffarel.

Á minha sogra, Maria Luiza por paciência em me ouvir e pelo apoio. Ao exemplo de vida, sempre com muita força e conselhos de forma justa.

À minha amiga Pamela Santos, por torcer e acreditar em mim de forma incansável.

Aos meus amados filhos pets, Lord, Lady e Maat, por serem ponto de conforto e felicidade.

RESUMO

A doença celíaca (DC) é de base genética que desencadeia os sinais e sintomas com a interação ambiental de uma dieta com alimentos fontes de glúten (trigo, centeio e cevada). Esta condição patológica tem sido relacionada a Síndrome do Emagrecimento Progressivo (SEP) que acomete primatas não humanos, por apresentarem características clínicas semelhantes. As manifestações clínicas relacionadas ao glúten, em primatas humanos e não humanos, podem desencadear alterações nas variáveis hematológicas e alterações gastrointestinais. Objetivou-se avaliar a influência de uma dieta com glúten nos parâmetros hematológicos em *Saguinus fuscicollis* de cativeiro. O experimento foi realizado com os animais da colônia do Centro Nacional de Primatas. Na caracterização do perfil foram avaliadas variáveis hematológicas e bioquímicas em *Saguinus fuscicollis*. Os resultados revelaram que os parâmetros hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e coeficiente de variação eritrocitária (RDW) foram diferentes para machos e fêmeas. A ativação de Gama Glutamil Transferase (GGT) os machos diferiram de forma significativa das fêmeas ($P < 0,05$). Os animais foram submetidos a quatro avaliações durante período de 105 dias, divididos em período de aclimação, experimentação e recuperação, que alternavam dieta com glúten (DCG) e dieta sem glúten (DSG). As mensurações incluíram coletas de sangue, massa corporal, temperatura e avaliação da consistência das fezes. Os resultados comparam os valores entre os sexos, revelando que os parâmetros hemoglobina, leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, bastonetes e plaquetas não sofreram nenhuma influência sob as diferentes condições nutricionais. Enquanto que os parâmetros He, Hb, HGM, CHGM e RDW foram alterados no sexo masculino. Portanto a dieta com glúten foi determinante para aumento da frequência de diarreia e da alteração em alguns parâmetros hematológicos. Assim os resultados elevam a importância do estudo desses valores sugere-se que alimentos com trigo, centeio ou cevada não façam parte da alimentação desses animais.

Palavras chave: Doença celíaca; Hematologia; Primatas Não Humanos.

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is the genetic basis that triggers the signs and symptoms with the environmental interaction of a diet food sources gluten (wheat, rye and barley). This pathological condition has been related to Progressive Weight Loss Syndrome (SEP) which affects non-human primates, because they have similar characteristics. The clinical manifestations related to gluten, in humans and non-human primates, can trigger changes in haematological variables and gastrointestinal disorders. This study aimed to evaluate the influence of a diet with gluten in hematological parameters of brown-mantled tamarin in captivity. The experiment was carried out with the animals of the colony of the National Primate Center. The characterization of the profile were evaluated hematological and biochemical variables in brown-mantled tamarin. The results show that the erythrocytes parameters (He), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht) and erythrocyte coefficient of variation (RDW) were different for males and females. Range activation The Glutamill transferase (GGT) males differed significantly in females ($P < 0.05$). The animals were evaluated four times during a period of 105 days, divided into acclimation period, trial and recovery, which alternated diet with gluten (DCG) and gluten-free diet (DSG). The measurements include blood samples, body weight, temperature and evaluating the stool consistency. The results compare the values between the sexes, revealing that the parameters hemoglobin, leucocytes, segmented neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, platelets and rods suffered no influence in different nutritional conditions. While He parameters Hb, HGM, CHGM and RDW were changed in males. So the diet with gluten was crucial to increase the frequency of diarrhea and changes in some hematological parameters. Thus the results of the study raise the importance of these values suggests that foods with wheat, rye or barley are not part of the feed of these animals.

Key words: Celiac disease; Hematology; Primates no human.

SUMÁRIO

1.CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1.1 GLÚTEN	12
1.2 RELAÇÃO DA DIETA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS E GLÚTEN	13
2.ARTIGO 1: PARÂMETROS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE <i>Saguinus fuscicollis</i> CRIADOS EM CATIVEIRO	15
ABSTRACT	17
MATERIALS AND METHODS	18
RESULTS	20
DISCUSSION	21
DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS	23
FUNDING	23
ACKNOWLEDGMENTS	23
REFERENCES	24
3.ARTIGO 2: EFEITOS DA DIETA COM GLÚTEN SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE <i>Saguinus fuscicollis</i> CRIADOS EM CATIVEIRO	29
RESUMO	31
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	36

DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	42
4.CONCLUSÕES GERAIS	50
5.REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	53

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Saguinus fuscicollis (Spix, 1823) é um táxon pertencente ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Primates e à família Callitrichidae, a qual é composta por 7 gêneros (*Cebuella*, *Callibella*, *Mico*, *Callithrix*, *Callimico*, *Leontopithecus*, e *Saguinus*), incluindo várias espécies e subespécies (RYLANDS, MITTERMEIER, SILVA JR, 2012).

De acordo com Rylands & Mittermeier (2008), o gênero *Saguinus* possui ampla distribuição geográfica, incluindo Brasil (estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia), Bolívia, Colômbia; Equador e Peru. Atualmente, existem 10 subespécies reconhecidas (*S. fuscicollis fuscicollis*; *S. f. fuscus*; *S. f. avilapiresi*; *S. f. cruzlimai*; *S. f. leucogenys*; *S. f. nigrifrons*; *S. f. lagonotus*; *S. f. illiger*; *S. f. weddelli*; *S. f. primitivus*). Esses táxons estão incluídos na categoria de (menor preocupação) pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2016). Entretanto, algumas espécies do gênero estão criticamente ameaçadas, a exemplo do *S. bicolor*, que tem se tornado restrito à cidade de Manaus – AM no Brasil. Dessa forma, criar e reproduzir PNH em cativeiro pode contribuir para manutenção de espécies em risco de extinção, além de fornecer material biológico importante para utilização em pesquisas biomédicas.

Os primatas deste gênero são de porte pequeno e muito ativos, com peso em torno de 0,400 kg para machos e 0,300 kg para fêmeas. Podem viver de 20 a 25 anos em cativeiro, mas atingem a maturidade sexual por volta de 1,3 anos, com sistema de acasalamento poliândrico. O tempo de gestação é de aproximadamente 5 meses, com um ou dois partos ao ano. Em vida livre, habitam níveis baixos do dossel e em pequenos grupos, variando de 4 a 15 indivíduos, sendo mais frequente grupo menores, de 2 a 8 indivíduos (RAVETTA, 2015). No contexto comportamental apresentam tolerância a modificações no ambiente e podem viver simpatricamente com outras espécies de micos em grupos mistos (SMITH, 2000). No estudo de Heymann (2000), observou-se os animais em associações poli específicas, compartilhando e defendendo a área de vida comum.

Em relação a dieta, os calitriquídeos são considerados frugívoros-insetívoros pois na natureza alimentam-se de frutas, flores, exsudato de plantas, insetos, aranhas, lesmas, pequenos répteis e anfíbios e filhotes de pássaros. A ingestão de presas é em torno de 20% e os insetos representam uma fonte rica em energia, na forma de proteínas e gorduras. O gênero *Saguinus* apresenta comportamento de forrageiro insetívoro diurno conforme descrição de

Aimee (2013), que investigou as estratégias de alimentação de *Alouatta seniculus*, *S. fuscicollis* e *Saimiri boliviensis* no Peru. As três espécies diferiram estaticamente no consumo global da dieta, demonstrando que os *S. fuscicollis* e *S. boliviensis* tinham dieta com maior proporção insetos (55,88% e 52,67%, respectivamente). No entanto, os *S. fuscicollis* complementam a dieta com frutas e *S. boliviensis* com flores. A suplementação da alimentação com frutas ocupou 32,35% da composição da dieta de *S. fuscicollis*, seguido de 7,35% flores e 2,94% de outros alimentos, na forma de gomas dos troncos das árvores e sementes. Entretanto, essa relação de proporção entre insetos e frutas, é discutida por Stone (2007), que relatou que na estação seca os *S. boliviensis*, por exemplo, tem 70% da dieta composta por insetos e defende que mudanças dietéticas na estação seca podem ser correlacionadas com um declínio de frutas maduras na floresta.

1.1 Glúten

O glúten é um composto protéico, formado por várias frações prolamínicas tóxicas para mamíferos, específicas em cada um dos alimentos que ele naturalmente compõe, como o trigo, centeio, cevada e aveia (RÉDEL, 2008). Porém Ludvigsson et al. (2012), aponta a retirada da aveia desse grupo, ressaltando que a presença de glúten na aveia se dá por contaminação cruzada com o trigo, por meio do maquinário de beneficiamento, que é compartilhado entre esses dois produtos ou até mesmo o ambiente de cultivo em comum.

Segundo Araújo et al (2010), o glúten é constituído por frações de gliadina e de glutenina, que na farinha de trigo totalizam 85% da fração proteica. Em cada grão dos alimentos que contém glúten há uma proporção de frações tóxicas, a exemplo da gliadina no trigo, hordeína na cevada e secalina no centeio, que são frações insolúveis e indigeríveis pelo intestino, responsáveis pelas reações inflamatórias. O trigo é o componente mais nocivo aos indivíduos predispostos ao desenvolvimento da inflamação celíaca por conter em sua composição a maior proporção dessas moléculas. Assim, a gliadina é a principal responsável pelo processo inflamatório da mucosa intestinal e edema do abdômen em indivíduos com características genéticas para desenvolvimento de doença celíaca, alergia ao trigo ou sensibilidade ao glúten não celíaco (FELINTO, 2008).

1.2 Relação da dieta de primatas não humanos e o glúten

Alimentos que adicionam glúten à dieta podem desencadear sinais clínicos relacionados a condição autoimune denominada Doença Celíaca (DC), descrita em humanos (VERDU, GALIPEAU, JABRI, 2015) e em PNH (CINTRA, 2010). Trata-se de uma enteropatia induzida pela ingestão do glúten, associada à susceptibilidade genética e a fatores imunológicos e ambientais, que são suficientes as manifestações clínicas da doença (NOBRE, SILVA, CABRAL, 2007). Essa associação foi observada no estudo de Kuehnel et al. (2013), em que realizaram exames sorológicos de acordo com os padrões humanos de diagnóstico de DC aplicados em 24 *Callithrix jacchus* (12 machos e 12 fêmeas), onde os animais foram submetidos a dieta a base de glúten por 6 meses para observar as alterações durante ingestão e apontar paralelos entre a sensibilidade ao glúten em humanos e semelhança com a desordem em PNH. Observou-se que 40% dos primatas perderam peso nos primeiros 10 dias de dieta com glúten, acompanhado de sinais clínicos como estômago distendido, algumas horas após a ingestão dos alimentos, dermatites, alopecia caudal, atrofia muscular e uma diminuição da atividade global. No período de recuperação, realizado durante 2 meses com dieta isenta de glúten, observaram-se a remissão destes sintomas com melhora do quadro clínico geral dos animais.

Nos calitriquídeos, esse conjunto de sinais e sintomas também são referidos como quadro clínico da Síndrome do Emagrecimento Progressivo (SEP), que apresenta semelhanças clínicas encontradas na DC humana. Bethune et al. (2008), realizaram triagem de doenças gastrointestinais em 2.820 PNH, de todas as idades e de ambos os sexos. E observaram a prevalência de 7,5% de diarreia idiopática (na ausência de vírus ou infecções). Taxas mais elevadas foram encontradas em animais com menos de um ano (16%), acompanhada de edema abdominal e manifestação dermatológica característicos de DC humana. Posteriormente os autores restringiram a pesquisa a 83 primatas da espécie *Macaca mulata*, de ambos os sexos, de todas as idades, com sintomas clínicos de diarreia crônica não-infecciosa, que foram submetidos a 4 tratamentos dietéticos com proporções de glúten diferentes durante 10 meses. Além disso, foram realizadas biopsias intestinais e observam então presença de achatamento das vilosidades total ou parcial, hiperplasia e inflamação das criptas, linfócitos e intraepitelial em 12,5% dos animais. Achados semelhantes estão tipicamente presentes em pacientes humanos em estágios avançados da DC, enquanto que

pacientes em estágios iniciais da doença exibem infiltrado linfocitário, com a arquitetura das vilosidades normal ou atrofia parcial das vilosidades.

Apesar do quadro clínico da SEP ser associativo ao da DC em humanos, a etiologia da SEP ainda não está bem estabelecida. Essa síndrome, representa uma importante causa de morbidade e mortalidade de saguis mantidos em cativeiro sendo comum associação ao estresse de natureza social e física, demonstrando a susceptibilidade desses animais a síndromes de má absorção (BETHUNE, et al. 2008).

Assim, calitriquídeos em cativeiro são propensos a desenvolver problemas intestinais, uma vez que na composição dietética em vida livre não há fontes alimentares consideradas alergênicas, a exemplo do leite, ovos, soja e glúten (presente no trigo, centeio e cevada). Condição esta, que difere dos animais que vivem em cativeiro, onde essas fontes podem estar presentes nas rações comerciais. Por exemplo, a ração P25 Megazoo[®], formulada para primatas da família Callitrichidae, apresenta farelo de soja, ovo, leite em pó e o levedo de cerveja, como a fonte de glúten, que são potenciais causadores de alergia alimentar (RAVETTA et al, 2015).

Marietta et al. (2011) em sua revisão modelos animais para a doença celíaca, destaca a viabilidade do uso de macacos rhesus para essa finalidade. Os autores explicam sobre a espontaneidade desses animais ao glúten, ou seja quando sensibilizados com alimentos que contenha glúten (trigo, centeio ou cevada) apresentam maior propensão a desenvolver mudanças no epitélio intestinal, com ativação de células inflamatórias (anticorpos anti-gliadina IGA) e atrofia das células da mucosa. Ainda conforme esses autores a detecção de DC em macacos rhesus atinge uma taxa de 1:125, semelhante a epidemiologia em humanos nos estados Unidos.

A pesar dos estudos sobre DC em PNH já existirem, não foram encontrados trabalhos que trace uma relação entre variáveis hematológicas e bioquímicas com a presença de glúten na dieta de PNH. Com base nisso, investigar relações dessa natureza é de extrema importância na dieta de PNH e para a prática clínica, por serem exames de fácil aplicabilidade e baixo custo, quando comparados com os testes mais específicos para detecção de alergia alimentar ao glúten.

2. ARTIGO 1: PARÂMETROS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE *Saguinus fuscicollis* CRIADOS EM CATIVEIRO

O artigo encontra-se conforme normas da revista *Laboratory Animals* (Anexo I).

Title: Hematological and biochemical parameters of saddleback tamarin (*Saguinus fuscicollis*) raised in captivity

Short title: Hematological and biochemical parameters of *Saguinus fuscicollis*

T T G Almeida¹, E Silva Filho¹, M V M Barros², A A Imbeloni³, W B Silva³, M A Huffman⁴, F O B Monteiro¹.

¹ Programa de Pós graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, Pará, Brasil.

² Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

³ Centro Nacional de Primatas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Ananindeua, Pará, Brasil.

⁴ Primate Research Institute. Kyoto University. Inuyama, Aichi, Japan.

Corresponding author: Taianara Tocantins Gomes Almeida

E-mail: tai.nutri@hotmail.com

Address: Universidade Federal Rural da Amazônia/ Instituto de Saúde e Produção Animal da Amazônia. Avenida Presidente Tancredo Neves, número 2501. Bairro: Terra Firme. CEP: 66.077-830, Belém-Pará-Brasil. Phone: +55 91 3210 5261, FAX: +55 91 3210 5256.

Abstract

The saddleback tamarin, *Saguinus fuscicollis* is widely distributed across the Amazon region, but is endangered. This species is serving an important role in biomedical research in captivity. However, reference values for hematological and biochemical parameters are required for the proper characterization of the species. It was therefore the objective of our research to establish the hematological and biochemical parameters of blood considering sex differences in healthy adult saddleback tamarins. Collecting 2 mL of blood from each individual, 20 animals were examined, (7 males, 13 females) and hematological and biochemical parameters were determined using commercial kits. Of the 27 variables measured, only red blood cell (RBC), hemoglobin (Hm) and hematocrit (Ht) values were significantly higher in males ($7.12 \pm 0.98 \times 10^6/\text{mm}^3$, $14.98 \pm 1.25 \text{ g/dL}$ and $48.71 \pm 4.91 \%$, respectively), while red cell distribution width (RDW) was higher in females ($14.58 \pm 1.89\%$). For the plasma biochemical parameters measured only gamma-glutamyl transferase (GGT) enzyme presented higher activity in females ($8.08 \pm 4.87 \text{ U/L}$) and a high glucose concentration range was observed (102.0 to 521.0 mg/dL) for both sexes. These parameters established with reference ranges for healthy adults provide a reliable reference source for the interpretation of laboratory housed saddleback tamarin.

Keywords: hematology, biochemistry, tamarin, neotropical primates,

Saddleback tamarin (*Saguinus fuscicollis*) have a wide geographical distribution, across the Amazon, including Brazil (Acre, Amazonas, Mato Grosso, and Rondônia States), Bolivia, Colombia; Ecuador, and Peru. Currently, there are 10 recognized subspecies of *Saguinus fuscicollis* (*S. fuscicollis fuscicollis*; *S. f. fuscus*; *S. f. avilapiresi*; *S. f. cruzlimai*; *S. f. leucogenys*; *S. f. nigrifrons*; *S. f. lagonotus*; *S. f. illiger*; *S. f. weddelli*; *S.*

f. primitivus). These taxa are included in the category "Least Concern" by the International Union for Conservation of Nature [1]. However, some species of the genus are endangered, due to increasing human pressures resulting in habitat fragmentation. The most important example is *S. bicolor* that occurs in the vicinity of Manaus, the capital of Amazonas State, Brazil [1].

Neotropical Primates have been widely used in biomedical research because of their phylogenetic similarities with humans [2]. In addition, they are easier to handle and have lower breeding costs when compared with Old World Primates [3]. The proper management of these animals in captivity favors the production of individuals with high genetic and health quality for use in biomedical research. In this context, studies aimed to establish reference values for hematological and biochemical parameters in neotropical primates should be encouraged. This is justified by the environmental variation, health, and nutrition, which are inherent in each breeding system. These data may be used in clinical practice and as tools for research regarding the health of laboratory animals. Reference values are generated from healthy animals, by applying standard statistical methods and ratings that represent the estimates within which 95% of clinically normal individuals must be found [4]. However, there have been very few studies aimed to determine hematological and biochemical parameters of the *Saguinus* genus. The effect of sex and age group have been described in *S. oedipus* [5] and *S. leucopus* [6], but there no established reference values for *S. fuscicollis*.

This study aimed to establish the hematological and biochemical parameters of *S. fuscicollis* considering the effect of sex in healthy adult animals raised at the National Primate Center (CENP), Para State, Brazil. The prediction is that, under normal handling at CENP, these parameters can influence blood variables.

Materials and Methods

All procedures were registered on the System for Authorization and Information on Biodiversity according to the Chico Mendes Institute for Biodiversity (SISBIO/ICMBIO Protocol No. 47969-1) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) established by the Evandro Chagas Institute (Ananindeua - PA, Brazil, protocol N° 017/2015).

Animals

Twenty adults saddleback tamarin (*Saguinus fuscicollis*) were examined (7 males, 13 females). All animals were in excellent health status throughout the study and belong to the primate colonies of the CENP, located at Ananindeua municipality, Para State, Brazil. Animals were housed in enclosures (1.5m x 2m x 3m) that were positioned in a north–south orientation to receive 12 h of natural light each day. The average temperature was 33°C and humidity was 85%. The animals' diet contained various fruits and vegetables, eggs, milk, and commercial primate food with 180 g/kg crude protein (Callitrichidae P25 Megazoo, Rações Megazoo, Betim, Minas Gerais, Brazil). Water was offered *ad libitum*.

All individuals were captured individually from the enclosure by an assistant using leather gloves, restraining them by the scruff of the neck. Before starting the physical examination, body mass was determined using a Filizola® scale (Indústrias Filiziola S/A, São Paulo, SP, Brazil), with a minimum capacity of 0.05 and maximum of 40 kg. In the clinical evaluation, inspection, palpation, body temperature monitoring, heart and respiratory measurements were performed.

Laboratory procedures

Blood samples (2 ml separated into two tubes of 1 mL each) were taken from the femoral vein using sterile syringes and needles. For the hemogram, tubes containing the

anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used. For biochemical analysis, blood was collected in vacuum tubes without anticoagulant, left at room temperature for clot retraction and centrifuged at 2,000 g for 10 min. The sera obtained were frozen at -20°C until the time of analysis.

Hematological analyzes were done at the CENP laboratory. Leucocyte counting was carried out by counting 100 cells in a blood smear colored with panoptic fast (NEWPROV Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais PR). Biochemical determinations were performed by commercial kits (Doles® e Labtest®), using a BS-120 automatic biochemical analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical Eletronics®, Germany). We carried out analyses of total protein, albumin, high density lipoprotein (HDL), triglycerides, urea, creatinine and determined aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (FA) and gamma glutamyltransferase (GGT) enzymes.

Statistical Analyzes

Results of all parameters were analyzed using the Komolgorov-Smirnov test to determine the normality distribution. Descriptive statistic used included average, standard deviation and minimal-maximum values. To avoid the effect of sex over biochemical and hematological variables, we used the Tukey test to databank with a normality distribution. Parameters without normality were compared by Mann-Whitney test. The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

Values of red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) were significantly higher in males ($P < 0.05$), while, red cell distribution width (RDW) was

higher in females ($P < 0.05$). In other hematological parameters no observed significant differences were noted between males and females (Table 1).

Table 1 here

Regarding biochemical values, GGT enzyme activity was significantly higher females ($P < 0.05$). There were no other statistically significant differences between males and females for other parameters measured (Table 2).

Table 2 here

Discussion

Hematological parameters have already been established for some Old World primate species used in biomedical research [7]. However, there is few information for the Neotropical primates [8] specially for *Saguinus* spp. There are studies about hematological and biochemical parameters for *S. leucopus* [6, 9] and *S. oedipus* [5]. The European Association of Zoologic and Aquarium – EAZA [10] has determined hematological and biochemical parameters for *S. fuscicollis*.

In the present study, red blood cells and hematocrit values were higher in males than females ($P < 0.05$). The influence of sex on these parameters have also been observed in other Neotropical non-human primates (NHP), including *Aotus* [11, 12, 13] and *Cebus apella* [8, 14]. For one callitrichids, *S. oedipus*, Shukan et al. [5] evaluated the same parameters, also finding significant differences between males and females, with females always with lower values. That can be explained most likely by hormonal effects, e.g. androgens are stimulants of erythropoiesis, while estrogens are inhibitors [15; 12].

RDW indicates the degree of anisocytosis of the erythrocytes, its high levels suggest an increase of heterogeneity of red blood cell size [16]. In humans, RDW is a useful measure to differentiate several kinds of anemia, for example, regeneration of anemias, due to an increase of reticulocyte number, elevates this index [17]. Our findings demonstrated high RDW values for females, similar to those observed in *Cebus apella* [5] and *Chlorocebus aethiops* [7]. However, the observed difference was small and possibly are of no clinical relevance.

The leucocyte global counting values were similar to those found in *C. penicillata* [18]. In the present study, leucocyte count did not differ between males and females, as previously observed in the same species by Boere et al., [18] and in *C. jacchus* by Cunha et al. [19]. In general, sex did not influence leucocyte count. The alterations of global leucometry occur, principally, in response to bacterial and virus inflammations, allergies, stress and hematological neoplasias, such as leukemia [20]. In *C. penicillata*, stress significantly increased leucocyte count in both males and females [21].

Regarding biochemical parameters, significant sex differences were only found for GGT. The results reported by Riviello and Wirz [8] and Wirz et al. [14] for *C. apella* showed significant sex differences for AST, GGT, urea and creatinina. However, these authors did not discuss the influence of sex over activity of these parameters. Beyond sex differences, age, nutrition, management conditions and housing also should influence the biochemical parameters of different NHP species [20].

The average value of glucose in the animals studied (225 ± 121.21 mg/dL) was higher than other studies of *S. fuscicollis* (173.00 ± 66.00 mg/dL; [10]) and other species of callitrichids such as *S. leucopus* (134.27 ± 54.59 mg/dL; [9]) and *C. jacchus* (192.00 ± 52.00 mg/dL; [22]). However, some studies detected average glucose

concentrations higher than reported in this study, where we can cite *S. oedipus* (266.00 ± 93.64 mg/dL; [5]) and *C. penicillata* (228.55 ± 50.37 mg/dL; [18]). Our results are consistent with all of the above mentioned studies; reporting no significant differences between males and females with regards to these biochemical parameters. Fox et al. [6], in their investigation of 27 adults *S. leucopus*, reported significant difference between males and females for total protein, albumine, hemoglobin, HGM, glucose and alkaline phosphatase. These results were consistent with the present study, since no significant sex differences were reported for total protein, albumine, glucose and alkaline phosphatase.

The results detected for hematological and biochemical parameters can be useful as a reference tool for interpreting the health of callitrichids being used in laboratory conditions, especially using *Saguinus fuscicollis* in captivity. However, it is necessary to evaluate these markers in different environmental condition, including nutrition, climatic stress and social behavior, since they correspond to challenges of adaptation of the animals in captivity, possibility thus, promote the best conditions to welfare and perpetuation of species.

Declaration of conflicting interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research was supported by the National Primate Center (CENP) and Federal Rural University of Amazon.

Acknowledgments

We are grateful to the National Primate Center (CENP), the Evandro Chagas Institute (IEC) and the Coordination for support from the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) program.

References

1. IUCN [International Union for Conservation of Nature]: *The red list of threatened species*. Online Referencing, <http://www.iucn.org> (2016, accessed 14 October 2016).
2. Torres LB, Araujo BHS, Castro PHG, et al. The use of New World Primates for Biomedical Research: A Overview of the last four decades. *Am J of Primatology* 2010; 72: 1055-1061.
3. Abee CR, Mansfield K, Tardif S, et al. Morris T. *Nonhuman primates in biomedical research: Biology and Management*. Second Ed. Elsevier: San Diego 2012; 1. p521.
4. George MP, Champion HC, Norris KA. Physiologic Changes in a Nonhuman Primate Model of HIV-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48: 374–381.
5. Shukan ET, Boe CY, Hasenfus AV, et al. Normal hematologic and serum biochemical values of cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 150-154.
6. Fox M, Brieva C, Moreno C, et al. Hematologic and Serum Biochemistry Reference Values in Wild-Caught White-Footed Tamarins (*Saguinus leucopus*) Housed in Captivity. *J. Zoo. Wildl Med* 2008; 39: 548-557.
7. Imbeloni AA, Rahal. SC, Silva Filho E, et al. Effect of age and sex on bone markers in *Chlorocebus aethiops* raised in captivity. *J Med Primatol* 2016; (45):3-11. 2016.
8. Riviello MC and Wirz A. Hematology and blood chemistry of *Cebus apella* in relation to sex and age. *J Med Primatol* 2001; 30:308– 312.

9. Castañeda F; Buritica E and Echeverry D. Establishment of some blood biochemistry parameters of White-footed tamarin (*Saguinus leocopus*-Gunther 1876) under captivity in Colombia. *Rev Colombiana Cienc Anim* 2013; 6: 51-58.
10. EAZA [European Association of Zoos and Aquaria]. *Handling Guide for Callithriids*. Zoo Beauval 2010; 2nd ed. Beauval.
11. Monteiro FOB, Coutinho LN, Araújo KF, et al.: Biochemical and hematological parameters in owl monkeys infected and uninfected with *Trypanoxyuris sp.* *J Helminthol* 2009; 83:225–9.
12. Takeshita RSC, Monteiro FOB, Lins FLML, et al. Hematological, hepatic and renal evaluation in *Aotus azarai infulatus*. *J Med Primatol* 2011; 40:104–10.
13. Lins FLML, Monteiro FOB; Takeshita RSC, et al. Renal evaluation of *Aotus azarai infulatus* by ultrasonography and serum chemistry profile. *Am J Primatol* 2012; 74:482-490
14. Wirz A, Truppa V and Rivielo MC. Hematological and Plasma Biochemical Values for Captive Tufted capuchin Monkeys (*Cebus apela*). *Am J Primatol* 2008; 70: 463-472.
15. Harewood WJ, Gillin A, Hennessy A, Armistead J, et al. Biochemistry and hematology values for the baboon (*Papio hamadryas*): the effects of sex, growth development and age. *J Med Primatol* 1999; 28: 19-31.
16. Comar SR and Silva PH. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. *Rev Bras de Anal Clín* 2009; 41:257-265.
17. Grotto HZW. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. *Rev Bras de Hemat e Hemot* 2009; 31: 178-182.
18. Boere V, Pinheiro EC, Oliveira e Silva I, Paludo GR, et al. Comparison between sex and age class on some physiological, thermal and hematological indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). *J Med Primatol* 2005; 34:156-162.

19. Cunha MS, Lopes DR, Sousa MBC. Variation in leukocyte counting in *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) submitted to acute stress situation. *Rev Bra Zool* 2005; 12:217-229.
20. McPherson FJ. Normal Blood Parameters. Common Diseases and Parasites Affecting Captive Non-human Primates. *J Primatol* 2013; 2:112 - 116.
21. Pereira LC, Barros M. Relationship body temperature, weight, and hematological parameters of black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*). *J Med Primatol* 2016; 1: 1-8.
22. Clarke JM. The Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *ANZCCART News* 1994; 17: 1-8.

Table 1. Hematological parameters expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and as the range for 20 healthy *Saguinus fuscicollis* categorized, based on gender.

Parameters (Unit)	Distribution	N	Sexes	Mean \pm SD	Minimum-Maximum	P Value
Red Blood Cells (10 ⁶ /mm)	Gaussian	7	♂	7.12 \pm 0.98	5.12 - 8.16	0.01
		13	♀	5.80 \pm 0.87	4.22 - 6.98	
Hemoglobin (g/dL)	No Gaussian	7	♂	14.98 \pm 1.25	12.80 - 16.40	0.01
		13	♀	12.60 \pm 2.09	9.25 - 14.80	
Hematocrit (%)	Gaussian	7	♂	48.71 \pm 4.91	38.70 - 53.40	0.01
		13	♀	41.36 \pm 6.18	31.90 - 50.35	
MCV (fL)	Gaussian	7	♂	68.48 \pm 3.64	65.40 - 75.60	0.30
		13	♀	71.56 \pm 6.08	58.50 - 78.60	
MCH (pg)	Gaussian	7	♂	21.27 \pm 2.18	19.50 - 25.00	0.55
		13	♀	21.91 \pm 2.31	16.70 - 24.50	
MCHC (g/dL)	Gaussian	7	♂	30.87 \pm 1.63	29.30 - 33.20	0.66
		13	♀	30.56 \pm 1.36	28.60 - 33.10	
RDW (%)	No Gaussian	7	♂	12.90 \pm 0.61	12.20 - 13.80	0.01
		13	♀	14.58 \pm 1.89	12.30 - 20.00	
Platelets (10 ³ /mm)	No Gaussian	7	♂	384.71	206.00 - 613.00	0.21
		13	♀	507.76	307.00 - 934.00	
				\pm 214.23		
WBC (10 ³ / μ L)	Gaussian	7	♂	8.76 \pm 7.702	2.40 - 20.00	0.69
		13	♀	7.78 \pm 3.16	2.70 - 13.60	
Segmented (10 ³ / μ L)	Gaussian	7	♂	3.85 \pm 3.09	0.74 - 8.97	0.38
		13	♀	4.95 \pm 2.33	1.16 - 9.02	
Neutrophils (10 ³ / μ L)	Gaussian	7	♂	0.00	0.00	1.00
		13	♀	0.00	0.00	
Lymphocytes (10 ³ / μ L)	No Gaussian	7	♂	2.73 \pm 3.04	1.21 - 9.55	0.50
		13	♀	2.06 \pm 1.27	0.38 - 4.76	
Monocytes (10 ³ / μ L)	No Gaussian	7	♂	0.76 \pm 0.86	0.13 - 2.60	0.38
		13	♀	0.72 \pm 0.52	0.00 - 1.76	
Eosinophils (10 ³ / μ L)	No Gaussian	7	♂	0.05 \pm 0.15	0.00 - 0.40	0.41
		13	♀	0.02 \pm 0.04	0.00 - 0.13	
Basophils (10 ³ / μ L)	Gaussian	7	♂	0.07 \pm 0.07	0.00 - 0.20	0.19
		13	♀	0.05 \pm 0.05	0.00 - 0.14	
MPV (fL)	Gaussian	7	♂	9.84 \pm 2.39	7.70 - 13.40	0.53
		13	♀	10.50 \pm 2.13	6.24 - 13.90	

N, individual number; ♂, male; ♀, female; SD, Standard Derivation; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; WBC, white blood cell.

Table 2. Biochemical parameters expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and as the range for 20 healthy *Saguinus fuscicollis* categorized based on sex.

Parameters (Unit)	Distribution	N	Sexes	Mean \pm SD	Minimum-Maximum	P Value
LDH (mg/dL)	Gaussian	7	♂	72.71 \pm 28.86	32.00 - 105.00	0.52
		13	♀	82.16 \pm 32.84	31.00 - 123.00	
Triglycerides (mg/dL)	Gaussian	7	♂	217.71 \pm 97.41	119.00 - 421.00	0.38
		13	♀	258.46 \pm 95.83	129.00 - 495.00	
ALT (U/L)	Gaussian	7	♂	74.57 \pm 18.55	52.00 - 108.00	0.39
		13	♀	67.75 \pm 15.04	38.00 - 86.00	
AST (U/L)	Gaussian	7	♂	67.71 \pm 34.73	12.00 - 111.00	0.36
		13	♀	83.16 \pm 34.42	0.00 - 126.00	
Creatinine (mg/dL)	Gaussian	7	♂	0.94 \pm 0.18	0.70 - 1.30	0.64
		13	♀	0.87 \pm 0.34	0.00 - 1.27	
FA (U/L)	Gaussian	7	♂	246.33 \pm 18.46	220.00 - 272.00	0.07
		13	♀	358.91 \pm 137.97	71.00 - 601.00	
GGT (U/L)	No Gaussian	7	♂	2.14 \pm 1.57 ^b	0.00 - 4.00	0.01
		13	♀	8.08 \pm 4.87	0.00 - 15.00	
Glucose (mg/dL)	Gaussian	7	♂	216.85 \pm 52.66	173.00 - 309.00	0.21
		13	♀	287.23 \pm 137.70	102.00 - 521.00	
TP (mg/dL)	Gaussian	7	♂	7.68 \pm 0.53	6.90 - 8.40	0.54
		13	♀	7.38 \pm 1.19	5.26 - 10.0	
Albumin (mg/dL)	No Gaussian	7	♂	2.91 \pm 1.10	0.5 - 3.60	0.40
		13	♀	3.17 \pm 0.65	1.79 - 3.88	
Urea (mg/dL)	Gaussian	7	♂	30.56 \pm 5.97	23.30 - 39.60	0.27
		13	♀	27.4 \pm 5.78	18.10 - 38.10	

N, individual number; ♂, male; ♀, female; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; ALP, alkaline phosphatase; TP - total protein; LDH, lactate dehydrogenase.

**3. ARTIGO 2: EFEITOS DA DIETA COM GLÚTEN SOBRE OS PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE *Saguinus fuscicollis* CRIADOS EM
CATIVEIRO**

O artigo encontra-se conforme normas da revista *Journal of Medical Primatology* (Anexo II)

Título: Efeitos da dieta com glúten sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Saguinus fuscicollis* criados em cativeiro

Nome dos autores: Taianara Tocantins Gomes Almeida¹. Ednaldo da Silva Filho¹. Maria Vivina Barros Monteiro². Aline Amaral Imbeloni³. Wellington Bandeira da Silva³. Frederico Ozanan Barros Monteiro¹

1. Programa de Pós-graduação de Saúde e Produção Animal da Amazônia. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém. PA. Brasil.

2. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará. Castanhal. PA. Brasil.

3. Centro Nacional de Primatas. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Ananindeua. PA. Brasil.

Autor correspondente: Taianara Tocantins Gomes Almeida

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) / Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA). Avenida Presidente Tancredo Neves. Nº 2501. Bairro: Terra Firme CEP: 66.077-830. Belém-Pará-Brasil. Telefone: +55 91 32105261. Fax +55 91 32105256. E-mail: tai.nutri@hotmail.com

Cabeçalho: **Efeitos da dieta com glúten em *Saguinus fuscicollis***

Número de tabelas: 4

Número de figuras: 2

Resumo

Introdução: O trigo, centeio, cevada e aveia podem desencadear respostas autoimunes em primatas não humanos. Objetivou-se avaliar variáveis hematológicas, massa corporal, temperatura e a consistência das fezes em *Saguinus fuscicollis* com dieta contendo glúten.

Métodos: Selecionou-se 10 animais adultos, submetidos a 30 dias de dieta com glúten. Eles foram avaliados durante três períodos (60 dias de aclimatação, 30 dias de período experimental e 15 dias de recuperação) que incluíram: coletas de sangue, mensuração da massa e temperatura corporal, e avaliação da consistência das fezes.

Resultados: A atividade das enzimas alanina e aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e as concentrações de glicose sofreram alterações importantes. Hemácias, hematócrito, hemoglobina globular média e concentração de hemoglobina globular média tiveram diferenças entre os machos.

Conclusão: A dieta com glúten aumentou a frequência de diarreia e alterou alguns parâmetros hematológicos. Assim, sugere-se que alimentos com trigo, centeio ou cevada não façam parte da alimentação desses animais.

Palavras chave: Tamarin; Hematologia; Alimentação; Plasma Sanguíneo.

Introdução

Alimentos derivados do trigo, centeio, cevada e aveia podem desencadear respostas autoimunes mediante à sensibilidade ao glúten, caracterizadas por alterações que danificam o revestimento do epitélio gastrointestinal [21]. O glúten consiste em uma mistura complexa de polipeptídios nos cereais relatados, podendo ser constituído por gliadinas e gluteninas no trigo e por hordeínas, secalinas e aveninas na cevada, centeio e aveia,

respectivamente. Esse grupo de proteínas é denominado de prolaminas, devido ao grande conteúdo de prolina e glutamina nas sequências de aminoácidos [19, 15].

Em humanos, a sensibilidade ao glúten desencadeia uma enteropatia hereditária, denominada Doença Celíaca (DC), caracterizada pela presença de inflamação e atrofia das vilosidades no trato gastrointestinal, principalmente no intestino delgado. Os sinais clínicos clássicos são: diarreia crônica, distensão abdominal, flatulência, anemia ferropriva, osteoporose de início precoce, hipocalcemia, assim como deficiência de ácido fólico e vitaminas lipossolúveis [7; 15].

Em primatas, Bethune et al. [4] estudaram o macaco rhesus como modelo de sensibilidade ao glúten e observaram sintomas de DC, incluindo diarreia crônica, esteatorreia, lesões intestinais e anticorpos anti-gliadina. Entretanto, quando os animais foram submetidos à dieta livre de glúten, os quadros clínicos, histológicos e sorológicos foram revertidos. Outro estudo, realizado em macaco rhesus para testar a reação ao glúten, observou-se que todas as manifestações do quadro histopatológico se assemelharam à DC e concluíram que esta espécie pode ser um modelo para estudar as lesões no intestino [10].

As manifestações clínicas relacionadas ao glúten, em primatas humanos e não humanos, podem desencadear alterações nas variáveis hematológicas. Uma vez que, a desidratação provocada pela diarreia pode causar um desequilíbrio hidroeletrolítico e alterar valores hematológicos e bioquímicos. A alimentação com glúten também pode aumentar a permeabilidade intestinal, o que predispõe ao risco de infecções devido a destruição da mucosa intestinal. Este mecanismo pode refletir nos exames de hemograma e de bioquímica sérica [17].

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta das variáveis hematológicas e bioquímicas, massa corporal, variação de temperatura retal e a qualidade das fezes em machos e fêmeas de *Saguinus fuscicollis* alimentados com dieta contendo glúten.

Material e Métodos

Todo procedimento experimental foi registrado junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (SISBIO/ICMBIO protocolo N° 47969-1) e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (CEUA/IEC, protocolo N° 17/2015).

Animais e delineamento experimental

Foram selecionados 10 *Saguinus fuscicollis* (cinco machos e cinco fêmeas). Todos os indivíduos pertenciam a colônia de reprodução do Centro Nacional de Primatas (CENP, Ananindeua, Pará, Brasil) e foram mantidos em gaiolas que mediam aproximadamente 1,5m de largura, 2,00m de altura e 3,00m de comprimento.

O protocolo de alimentação utilizando teve duração total de 105 dias, conforme esquematizado na Figura 1. O período de aclimação teve duração de 60 dias e os animais foram alimentados com dieta sem glúten (DSG), caracterizando um período de quarentena dos animais. O período experimental teve duração de 30 dias e os animais foram alimentados com dieta com glúten (DCG). Em seguida, os animais passaram por um período de recuperação de 15 dias onde foram alimentados com DSG. As composições das dietas estão dispostas na Tabela 1.

Inserir aqui figura 1.

Inserir aqui tabela 1.

Para as avaliações clínicas e coletas de sangue todos os indivíduos foram capturados e contidos individualmente por um assistente usando luvas de couro. A massa

corporal foi determinada utilizando-se balança Eletrônica Digital de Alta precisão com capacidade de 40Kg (Filizola LTDA, São Paulo, SP, Brasil). A avaliação clínica foi realizada por técnicas semiológicas e a temperatura corporal foi aferida introduzindo-se na ampola retal o termômetro clínico digital, modelo BD Basic (Becton Dickinson S.A, Cidade do México, México).

Durante o período experimental e de recuperação também foram avaliadas as consistências das fezes, totalizando 45 dias de observação deste parâmetro. Três indivíduos treinados intercalavam os cuidados dos animais e realizaram avaliação das fezes diariamente, sendo classificadas em três scores: 1) normal; 2) amolecida 3) diarreica. Além de ser avaliado presença de sangue nas fezes.

As coletas sanguíneas e avaliações foram realizadas em quatro períodos. Sendo a coleta 1 feita no 60° dia, ao final do período de aclimatação- DSG. A coleta 2 foi realizada no 75° dia, demonstrando o quadro dos animais na primeira quinzena do período experimental- DCG. A coleta 3 ocorreu no 90° dia, referindo o estado dos animais na segunda quinzena do período experimental- DCG. A coleta 4, foi realizada no último dia (105°) de confinamento, em que refletiu a condição de saúde dos animais no período de recuperação – DSG.

Para o hemograma e exames bioquímicos foram coletados 3 ml de sangue a partir da veia femoral, utilizando seringas, agulhas e tubos estéreis com e sem EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Após as coletas, as amostras foram refrigeradas e imediatamente remetidas ao laboratório para realização do hemograma e da bioquímica.

O hemograma completo foi realizado utilizando o contador automático Cell Dyn Ruby (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada contando 100 células em esfregaços sanguíneos corados pelo panótico rápido (NEWPROV Produtos para Laboratório LTDA, Pinhais/PR, Brasil).

Para as determinações bioquímicas o sangue foi deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo e centrifugado a 2.000G durante 10 minutos. Os soros obtidos foram congelados a -20°C até a realização das análises. As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando Kits comerciais (Doles® e Labtest®), usando o analisador bioquímico automatizado BS-120 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics®, Germany). Foram feitas as dosagens de glicose, proteínas totais, albumina, lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, colesterol, ureia, creatinina e determinação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT).

Análises Estatísticas

Os registros das fezes foram analisados em três períodos (1° quinzena, 2° quinzena e 3° quinzena) e submetidos ao teste qui-quadrado para comparar as proporções dos tipos de fezes. Foram realizadas comparações entre os períodos e gêneros por meio do teste qui-quadrado através do PROC FREQ. As características massa corporal, temperatura retal e variáveis hematológicas foram submetidas ao teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov através do PROC UNIVARIATE. Em seguida, as comparações entre sexos e períodos de coletas foram realizadas através dos testes de Análise de Variância de Medidas Repetidas para os parâmetros com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para os parâmetros sem distribuição normal através do PROC GLM e PROC NPAR1WAY, respectivamente. As características massa corporal e temperaturas retais foram correlacionadas com todas as variáveis hematológicas através do PROC CORR. Todos os procedimentos foram realizados pelo programa SAS (Versão livre - University Edition). Para todas as análises foi determinado o nível de significância de 0,05.

Resultados

Durante o período de aclimatação de 60 dias, percebeu-se que um animal do sexo feminino apresentou perda de massa corporal, variações de temperatura retal e não se alimentava de forma suficiente, portanto, foi excluída da amostra para não aumentar a variação experimental. Dessa forma os resultados observados e coletados durante todos os dias de estudo foram de cinco machos e quatro fêmeas.

A Figura 2A representa os registros da consistência das fezes diárias de cada animal durante o período experimental e de recuperação (45 dias), divididas em três quinzenas. As duas primeiras quinzenas representaram o período experimental - DCG e a última representa o período de recuperação - DSG. Observou-se maior concentração de fezes amolecidas e diarreicas nas duas primeiras quinzenas de observação, período experimental DCG ($P < 0,05$). Quando observamos os últimos 15 dias (período de recuperação- DSG), as proporções se inverteram, aumentando ($P < 0,05$) a concentração de fezes normais e diminuindo as diarreicas. A Figura 2B apresenta as proporções de fezes entre machos e fêmeas em todas as quinzenas. Na comparação entre as fezes do período experimental – DCG e (primeira e segunda quinzenas) com as fezes do período de recuperação – DSG (terceira quinzena) detecta-se diferença significativa, em que a presença de fezes amolecidas e diarreicas foram mais frequentes no período de DCG em relação ao período DSG. Em todos os períodos tanto machos quanto fêmeas tiveram as mesmas frequências de tipo de fezes, apresentando comportamento intestinal iguais ($p > 0,05$). Não foi observado a presença de sangue nas fezes durante todo experimento.

Inserir aqui figura 2.

Na tabela 2 estão descritas as médias e desvios padrões da característica temperatura retal em grau Celsius ($^{\circ}\text{C}$) e massa corporal (Kg) tomadas durante as quatro coletas. Observamos que as médias das temperaturas retais entre os machos e fêmeas não diferiram ($P>0,05$) dentro de cada coleta e entre as coletas. Quanto a massa corporal, observou-se que não houve diferença ($P>0,05$) entre machos e fêmeas ao longo das quatro coletas. Entretanto, quando são comparadas as médias das massas corporais entre as coletas, observamos que houve um aumento ($P<0,05$) na coleta 1 até a coleta 2, ou seja, durante os quinze primeiros dias do período experimental - DCG. Contudo, observamos que da coleta 2 para a coleta 3 houve uma diminuição significativa ($P<0,05$) da massa corporal, ou seja, na segunda quinzena do período experimental - DCG. Observamos que durante o período de recuperação - DSG, os animais ganharam massa corporal em relação ao período de aclimação - DSG.

Inserir aqui Tabela 2.

Na tabela 3 estão os resultados dos parâmetros hematológicos referentes aos 4 períodos de coletas, DSG e DCG. Na primeira coleta (DSG) os valores de hemácias e hematócrito foram maiores nos machos ($p<0,05$). Após a introdução da DCG observou-se que os valores de hemácias e hematócrito apresentaram uma redução, sendo esta significativamente menor para os machos na última quinzena, representando a fase de recuperação. Enquanto o VGM teve comportamento inverso, aumentando ($p<0,05$) nos machos na última quinzena de observação (DSG – fase de recuperação). Os demais parâmetros do hemograma não sofreram nenhuma influência das duas dietas entre os sexos e entre as coletas.

Inserir aqui tabela 3.

Na tabela 4 estão representados os valores dos parâmetros bioquímicos. Nos machos, a atividade da AST reduziu ($p < 0,05$) entre a primeira e a última coleta, enquanto a concentração de glicose aumentou ($p < 0,05$) nos mesmos períodos. Em ambos os sexos, a atividade da ALT aumentou significativamente após o início da DCG permanecendo elevada no período de recuperação. Os demais parâmetros bioquímicos não se alteraram em ambos os sexos e entre as coletas.

Inserir aqui tabela 4.

Discussão

Nos animais deste experimento as temperaturas não diferiram entre os períodos alternados de dietas com e sem glúten. E não houve estado febril em nenhum animal, corroborando com as diretrizes clínicas formuladas por Rubio-Tapia et al. [16] para tratamento e diagnóstico de DC em humanos, em que a febre não é considerada um sinal clínico de diagnóstico ou rastreio para a doença. Segundo Andrade [2] a temperatura corpórea é um indicador de estresse ambiental e sanidade dos animais. Assim a ausência de processo febril nos animais refletiu a boa aclimação ao período experimental. O que se confirma com os valores de leucócitos dentro da normalidade no decorrer do experimento, sem significância entre machos e fêmeas.

A diarreia em animais de cativeiro, pode ser de origem multifatorial, desde agentes infecciosos, terapia com antibióticos, desordens nutricionais, distúrbios metabólicos, fatores psicogênicos, como transporte e quarentena, e ainda o tipo de dieta [3]. No presente

trabalho a introdução do glúten na dieta dos animais pode explicar a maior frequência de fezes diarreicas encontradas no período de DCG. Comportamento intestinal semelhante tem sido descrito para humanos após a introdução dos cereais na dieta, com instalação gradual de diarreia, distensão abdominal, anorexia, atraso de crescimento, atrofia muscular, hipotonia, irritabilidade e vômitos. Esta situação clínica é caracterizada nos humanos como DC [12].

Catassi et al. [5] estudaram 3 babuínos adultos que apresentavam diarreia crônica e hereditária e tiveram dieta a base de glúten durante toda a vida de cativeiro. Eles foram submetidos a um período de 6 meses de DSG e após essa monitorização todos tiveram a diarreia cessada. Assim como os animais deste estudo, em que no período de recuperação, DSG, não tiveram episódios diarreicos. Ao passo que a retirada do glúten da alimentação de crianças e adultos humanos com sinais de alergia ao glúten tem demonstrado a remissão nos sintomas como dor de cabeça, dermatites e alterações gastrointestinais. E o tratamento de dieta sem glúten é a única terapêutica eficaz na doença celíaca, conduzindo a melhoria sintomática em algumas semanas [1]

Ravetta et al. [14] defende que na dieta de vida livre de calitriquídeos não há alimentos fonte de glúten. Ressaltando assim a suposta inabilidade enzimática para digestão deste nutriente e a relação da presença de sinais clínicos, como perda de massa corporal e diarreia, com essa introdução alimentar no animal cativo. E ainda que em PNH sob cuidados humanos 10 a 15% apresentam diarreia recorrente, sendo esta uma importante condição de morbidade e mortalidade devido doenças entéricas.

Bethune et al. [4], avaliaram por 10 meses 83 primatas da espécie *Macaca mulatta*, adultos de ambos os sexos, alternando a alimentação em 3 tratamentos: DCG, dieta com baixa carga e DSG. Tais autores observaram que nas primeiras semanas de dieta com baixo teor de glúten já houve remissão do quadro diarreico dos animais e após 8 semanas da retirada total (DSG) nenhum animal apresentava qualquer sintoma. No presente estudo

observou-se ausência de diarreia a partir do segundo dia da retirada da DCG, independente do sexo dos animais. Convergindo com autores que testaram a DCG e DSG também em humanos infantis, em que a retirada total do glúten cessou a diarreia e outros sintomas e sua reintrodução causou desequilíbrio imunológico maior do que o início da doença, com uma reação alérgica ainda mais forte [18,8].

Kuehnel et al. [9] rastreou a sensibilidade ao glúten em 6 animais, *Saguinus oedipus* e *Callithrix jacchus*. Eles foram testados com DCG por 6 meses, depois ficaram 6 meses sem glúten na alimentação e depois por mais 2 semanas DCG. Corroborando com os resultados deste estudo detectaram intensa diarreia no período com glúten, além de mal estar geral, atrofia muscular, baixa atividade e alopecia caudal. Estes autores observaram ainda que no tratamento sem glúten todos os sintomas cessaram e no período de volta a DCG detectaram também que todos os animais voltaram a apresentar diarreia, atestando a nocividade do glúten na alimentação desses animais.

Sintomas extra intestinais devem ser rastreados na suspeita de DC, assim neste estudo algumas variáveis do hemograma (hemácias, hematócrito, VGM, HGM e CHGM) tiveram alterações significativas. E conforme a progressão do tratamento alimentar, indicando predisposição a quadros de anemia. Isso pode ser justificado pela deficiência absorptiva que a alimentação com glúten causa nos enterócitos comprometendo a absorção de nutrientes e consequente diarreia. Na DC, a anemia por deficiência de ferro é multifatorial, sendo por anorexia, que resulta na ingestão reduzida do ferro, por perda de ferro devido trocas rápidas de células epiteliais que foram lesadas, ou por sangue oculto intestinal pelo dano à mucosa. Estudo com humanos adultos anêmicos encontrou prevalência de alergia ao glúten em 12%, e esses pacientes eram mais jovens, tinham mais episódios de diarreia e maior duração da anemia do que aqueles que não apresentavam a doença [11]. Foi evidenciando ainda que o colesterol plasmático pode refletir o risco de desenvolver DC, pois quando a anemia se instala

devido à má absorção da DC, o colesterol plasmático mostrou-se significativamente mais baixo quando comparados a adultos com anemia por outras causas [11].

Em primatas, manifestações clínicas similares a doença celíaca também tem sido descrita como síndrome do emagrecimento progressivo (SEP), com relatos de taxa de aproximadamente de 60% em animais de cativeiro. Esta síndrome tem a infecção intestinal como uma das principais alterações histopatológicas observadas, atrelada a perda severa de massa corporal e alopecia caudal, podendo cursar ao óbito [9]. Na SEP a lesão do intestino delgado não tem como causa primária processo infeccioso, mas está associada a má absorção e aumento da secreção de água e íons para o lúmen do intestino delgado e consequentemente diarreia.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, ALT e AST são transaminases liberadas na circulação quando há apoptose do hepatócito ou alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática em processo de lesão ainda reversível [13]. Baseado nesse conceito, após a fase de aclimatação, os animais demonstram acelerado morte de células hepáticas e a fase de recuperação não foi suficiente para estes fatores reduzirem, mantendo-se alta.

A fosfatase alcalina (FA) aumentada sugere lesão hepática e pode aumentar com elevação da atividade das células ósseas. E há evidências claras que a DC em humanos tenha impacto no desenvolvimento da osteoporose [6]. Esse foi um dos parâmetros mais afetados pela presença de glúten na dieta, tendo um grande declínio na DCG e rápida recuperação com a retirada do glúten.

Em conclusão, a DCG influenciou na consistência das fezes e na massa corporal dos animais. Além disso, essa dieta influencia em algumas variáveis do hemograma e da bioquímica clínica. Dessa forma, dietas com base em trigo, centeio ou cevada em primatas de cativeiro representam risco a saúde desses animais.

Referências

- 1.Almeida FB, Cabral SAAO, Alencar MCB, Sousa JBG, Cabral BAG. Adaptação nutricional diante da doença celíaca desencadeada pela intolerância ao glúten. *Rev Bras Edu Saude*. 2016;6:01-04.
- 2.Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Criação e manejo de primatas não-humanos. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2002.
- 3.Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2007;40:346-334.
- 4.Bethune MT, Borda JT, Ribka E, Liu M, Phillippi-Falkenstein K, Jandacek RJ, Doxiadis GGM, Gray GM, Khosla C, Sestak K. A non- human primate model for gluten sensitivity. *Plos one*. 2008;3:E1614.
- 5.Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, Gelfond D, Puppa E, Sferruzza A, Fasano A. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann Med*. 2010;42:530-538.
- 6.Costa, MJC. Interpretação de exames bioquímicos para nutricionista. São Paulo: Editora ATHENEU; 2008.
- 7.Gama e Silva TS, Furlanetto TW. Diagnostico de doença celíaca em adultos. *Ver Ass Med Bras*. 2010;56:122-126.
- 8.Jericho H, Sansotta N, Guandalini S. Extra-intestinal Manifestations of Celiac Disease: Effectiveness of the Gluten Free Diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;32:52-56.
- 9.Kuehnel F, Mietsch M, Buettner T, Vervuert I, Ababneh R, Einspanier A. The influence of gluten on clinical and immunological status of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Med Primatol*. 2013;42:300-309.
- 10.Mazumdar K, Alvarez X, Borda JT, Dufour J, Martin E, Bethune MTB, Khosla C, Sestak K. Visualization of Transepithelial Passage of the Immunogenic 33-Residue Peptide from a-2 Gliadin in Gluten-Sensitive Macaques. *Plos one*. 2010;5:e10228.
- 11.Murray JA. Serodiagnosis of celiac disease. *Clin Lab Med*. 1997;17:445-463.
- 12.Nobre SR, Silva T, Cabral JEP. Doença celíaca revisitada. *J Port Gastreterol*. 2007;14:184- 193.
- 13.Otovic P, Smith S, Hutchinson E. The use of glucocorticoids in marmoset wasting syndrome. *J Med Primatol*. 2015;44:53–59.
- 14.Ravetta AL, Calouro AM, Messias MR. Avaliação do Risco de Extinção de *Saguinus weddelli weddelli* (Deville, 1849) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio, 2015. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7252-mamiferos-saguinus-weddelli-weddelli-sagui-preto.html/>. Acessado 15 de Junho, 2016.
- 15.Real A, Comino I, Lorenzo L, Mercha F, Humanes JG, Gimenez MJ, Casado MAL, Torres MI, Cebolla A, Sousa C, Barros F, Pisto F. Molecular and Immunological Characterization

- of Gluten Proteins Isolated from Oat Cultivars That Differ in Toxicity for Celiac Disease. *Plos One*. 2012;7:e4835.
16. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:1538-1544.
 17. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10:1–12.
 18. See JA, Kaukinen K, Makharia GK, Gibson PR, Murray JA. Practical insights into gluten-free diets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:580–591.
 19. Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*. 2002;53:947-958.
 20. Sipahi AM, Freitas IN, Lordello MLL, Damião AOMC. Celiac disease in adult. *Rev Bras Medicina*. 2001;34:430-434.
 21. Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:497-506.

Tabela 1: Composições das dietas com e sem glúten.

Horário	DIETA SEM GLÚTEN (DSG)	DIETA COM GLÚTEN (DCG)
	Aclimação (60 dias) Recuperação (15 dias).	Experimental (30 dias)
10:00h	50 g de ração Megazoo P25 (Rações Megazoo, Betim, Minas Gerais, Brasil) 160 kcal, 25% de proteína, 65% de carboidrato, 10% de lipídio. 300 mL de suco de fruta sem adição de açúcar;	25 g de bolo (165 kcal, 90% carboidrato, 7,5% de proteína, 2% de lipídio) ou pão umedecidos com 10 mL de leite sem lactose; 300 mL de suco de fruta sem adição de açúcar;
12:00h	150 g de mix de frutas (maçã, banana, abacaxi, melão) com suplemento vitamínico e mineral completo;	50 g de ração Megazoo P25 (Rações Megazoo, Betim, Minas Gerais, Brasil);
15:00h	150 g de mix de fruta com suplemento vitamínico e mineral completo.	150 g de mix de frutas com suplemento vitamínico, 15 g de farinha de aveia 15 g de farinha de trigo (100 kcal);

Suco de frutas era ofertado em dias alternados no mesmo horário que as frutas;

Durante todo experimento o consumo de água era disponibilizado *ad libidum*.

Tabela 2. Descrição das temperaturas retais (°C) e massa corporal (Kg) de machos e fêmeas de *Saguinus fuscicollis*, durante as coletas de sangue com dieta com glúten (DCG) e sem glúten (DSG).

Sexo	Temperatura retal			
	Coleta 1 DSG	Coleta 2 DCG	Coleta 3 DCG	Coleta 4 DSG
Machos	40,46 ±0,27	40,06 ±0,73	40,28 ±0,59	40,72 ±0,43
Fêmeas	40,43 ±0,44	40,58 ±0,32	40,33 ±0,64	40,78 ±0,40
Machos	40,44 ±0,33	40,29 ±0,61	40,30 ±0,57	40,74 ±0,39
Fêmeas				
Massa corporal				
Macho	0,449 ±27	0,503 ±39	0,478 ±39	0,464 ±12
Fêmea	0,433 ±0,20	0,509 ±0,28	0,478 ±0,61	0,466 ±0,40
Machos	0,441 ^C ±0,26	0,505 ^A ±0,33	0,478 ^B ±0,46	0,465 ^{BC} ±0,26
Fêmeas				

Letras diferentes na mesma linha indicam $p < 0,05$.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros hematológicos de *Saguinus fuscicollis* sob influência de dietas com e sem glúten em cativeiro.

Parâmetros (Unidades)	Sexo	Coleta 1 DSG	Coleta 2 DCG	Coleta 3 DCG	Coleta 4 DSG
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Macho	7,6 ^{Aa} ±0,4	7,2 ^{Aab} ±0,3	6,5 ^{ab} ±1,6	6,4 ^b ±0,5
	Fêmea	6,0 ^B ±1,3	6,3 ^B ±0,3	6,8±0,2	6,4±0,5
Hemoglobina (g/dL)	Macho	15,2±0,9	14,5±0,7	13,5±3,1	13,8±0,8
	Fêmea	12,4±2,7	12,9±0,9	14,0±1,3	13,4±0,5
Hematócrito (%)	Macho	50,8 ^a ±2,4	47,7 ^{Aab} ±1,6	42,3 ^b ±10,5	44,7 ^b ±2,8
	Fêmea	42,4±8,9	44,0 ^B ±2,9	45,6±3,0	44,1±1,7
VGM (fl)	Macho	66,9 ^{Bb} ±1,3	66,4 ^b ±1,4	65,0 ^b ±1,4	69,8 ^a ±0,9
	Fêmea	70,6 ^{Aa} ±6,2	69,8 ^{Aa} ±5,4	66,7 ^b ±4,3	68,6 ^{ab} ±4,5
HGM (Pg)	Macho	20,0 ^b ±0,4	20,2 ^b ±0,3	20,9 ^{ab} ±0,4	21,5 ^a ±0,5
	Fêmea	20,7±1,8	20,4±1,6	20,4±1,8	20,8±1,6
CHGM (g/dL)	Macho	30,0 ^b ±0,6	30,4 ^b ±0,6	32,1 ^a ±1,1	30,8 ^b ±0,6
	Fêmea	29,2 ^b ±0,3	29,2 ^b ±0,2	30,6 ^a ±0,8	30,2 ^a ±0,5
RDW (%)	Macho	12,9 ^B ±0,6	14,7±0,8	14,7±0,6	13,9±0,4
	Fêmea	15,7 ^A ±3,3	15,9±1,3	15,0±2,0	14,4±1,5
Leucócitos (x10 ³ /μL)	Macho	4,36±2,05	9,02±4,02	5,22±1,27	6,88±2,16
	Fêmea	5,10±3,02	8,52±4,09	8,22±3,10	6,87±5,09
N.Seg (x10 ³ /μL)	Macho	2,35±1,91	5,44±3,38	2,68±0,88	3,93±1,44
	Fêmea	3,31±2,4	5,24±2,18	5,05±2,51	3,72±2,21
Linfócitos (x10 ³ /μL)	Macho	1,59±0,62	2,95±1,20	2,06±0,30	2,39±0,83
	Fêmea	1,33±1,98	2,32±2,03	2,43±1,63	2,23±2,08
Monócitos (x10 ³ /μL)	Macho	0,35±0,24	0,46±0,31	0,36±0,25	0,47±0,25
	Fêmea	0,55±0,52	0,87±0,31	0,59±0,23	0,79±0,73
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	Macho	0,0±0,0	0,02±0,02	0,04±0,05	0,01±0,02
	Fêmea	0,0±0,0	0,03±0,07	0,01±0,02	0,00±0,00
Basófilos (x10 ³ /μL)	Macho	0,05 ^A ±0,05	0,13±0,12	0,06±0,05	0,04±0,04
	Fêmea	0,00 ^B ±0,01	0,00±0,04	0,13±0,10	0,10±0,12
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Macho	380,2±171,4	453,0±63,2	369,2±95,2	411,8±45,1
	Fêmea	632,3±244,1	568,3±124,5	469,3±97,7	366,2±317,6
MPV (fl)	Macho	8,5 ^c ±0,7	9,9 ^b ±0,4	10,8 ^b ±0,6	12,2 ^a ±0,5
	Fêmea	9,0 ^b ±0,7	9,8 ^b ±1,2	11,6 ^a ±0,6	11,8 ^a ±1,2

VGM: Volume Globular Médio; HGM: Hemoglobina Globular Média; CHGM: Concentração de Hemoglobina Globular Média; RDW: Coeficiente de Variação Eritrocitário; N. Seg: Neutrófilo segmentado; MPV: Volume Plaquetário Médio.

Letras maiúsculas indicam comparação entre sexos.

Letras minúsculas indicam comparação entre as dietas.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de *Saguinus fuscicollis* submetidos a dietas com glúten (DSG) e com glúten(DCG).

Parâmetros (Unidade)	Sexo	Coleta 1 Aclimação DSG	Coleta 2 1 ^o s 15 dias DCG	Coleta 3 2 ^o s 15 dias DCG	Coleta 4 Recuperação DSG
HDL (mg/dL)	Macho	76,60 ±21,33	69,80 ±21,46	70,00 ±17,83	101,50 ±10,61
	Fêmea	104,25 ±23,54	71,50 ±9,11	69,50 ±13,53	79,33 ±13,28
Triglicerídeo (mg/dL)	Macho	172,40 ±34,67	259,40 ±91,53	202,75 ±44,30	215,00 ±36,72
	Fêmea	186,50 ±40,14	228,75 ±59,67	174,25 ±24,31	266,67 ±47,25
ALT (U/L)	Macho	66,40 ±11,82 ^b	71,40 ±11,97 ^a	86,60 ±7,37 ^a	104,50 ±4,95 ^a
	Fêmea	57,75 ±7,41 ^b	74,25 ±7,59 ^a	80,25 ±4,99 ^a	79,67 ±8,96 ^a
AST (U/L)	Macho	70,20 ±23,61 ^a	58,40 ±21,23 ^{ab}	31,80 ±10,38 ^b	23,50 ±16,26 ^b
	Fêmea	84,75 ±7,76	71,75 ±21,98	46,50 ±10,21	23,33 ±20,50
Creatinina (mg/dL)	Macho	0,90 ±0,10	0,83 ±0,18 ^A	0,95 ±0,44	1,03 ±0,30
	Fêmea	0,78 ±0,13	0,42 ±0,38 ^B	0,72 ±0,08	0,84 ±0,12
FA (U/L)	Macho	251,60 ±14,77 ^a	238,80 ±136,25 ^a	9,00 ±8,43 ^b	359,00 ±0,00 ^a
	Fêmea	332,50 ±106,23 ^a	288,67 ±87,18 ^a	10,00 ±20,00 ^b	118,67 ±143,97 ^a
GGT (U/L)	Macho	2,00 ±1,58 ^B	4,40 ±2,30 ^A	4,00 ±1,22	10,00 ±8,49
	Fêmea	5,50 ±3,11 ^A	2,50 ±2,89 ^B	5,50 ±1,91	5,33 ±3,06
Glicose (mg/dL)	Macho	204,60 ±40,15 ^b	304,80 ±82,76 ^a	224,80 ±76,82 ^{ab}	301,67 ±49,41 ^a
	Fêmea	164,75 ±53,64	374,25 ±109,98	330,50 ±103,71	328,00 ±103,12
PT (mg/dL)	Macho	7,42 ±0,34	8,33 ±0,63	8,12 ±0,31	8,43 ±0,00
	Fêmea	7,08 ±0,48	8,02 ±0,89	8,39 ±0,36	8,32 ±0,44
Albumina (mg/dL)	Macho	3,25 ±0,33	3,99 ±0,38	3,84 ±0,14	2,13 ±2,28
	Fêmea	2,98 ±0,72	3,53 ±0,06	3,92 ±0,21	4,07 ±0,18
Ureia (mg/dL)	Macho	27,63 ±3,55	24,06 ±5,85	26,36 ±14,28	29,28 ±4,36
	Fêmea	18,78 ±2,50	26,18 ±3,21	22,10 ±3,82	20,93 ±7,13

HDL: lipoproteína de alta densidade; ALT: enzima alanina aminotransferase; AST: enzima aspartato aminotransferase; FA: fosfatase alcalina e GGT: gama glutamil transferase; PT: proteínas totais.

Figura 1

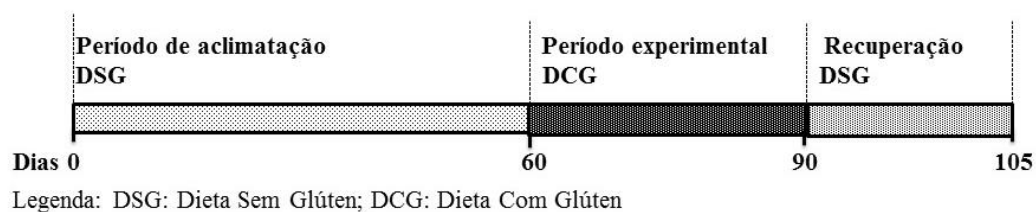


Fig 1. Protocolo de alimentação com duração total de 105 dias. Período de aclimação teve duração de 60 dias e os animais foram alimentados com DSG. Período experimental teve duração de 30 dias e os animais foram alimentados com DCG. Período de recuperação de 15 dias onde foram alimentados com DSG.

Figura 2

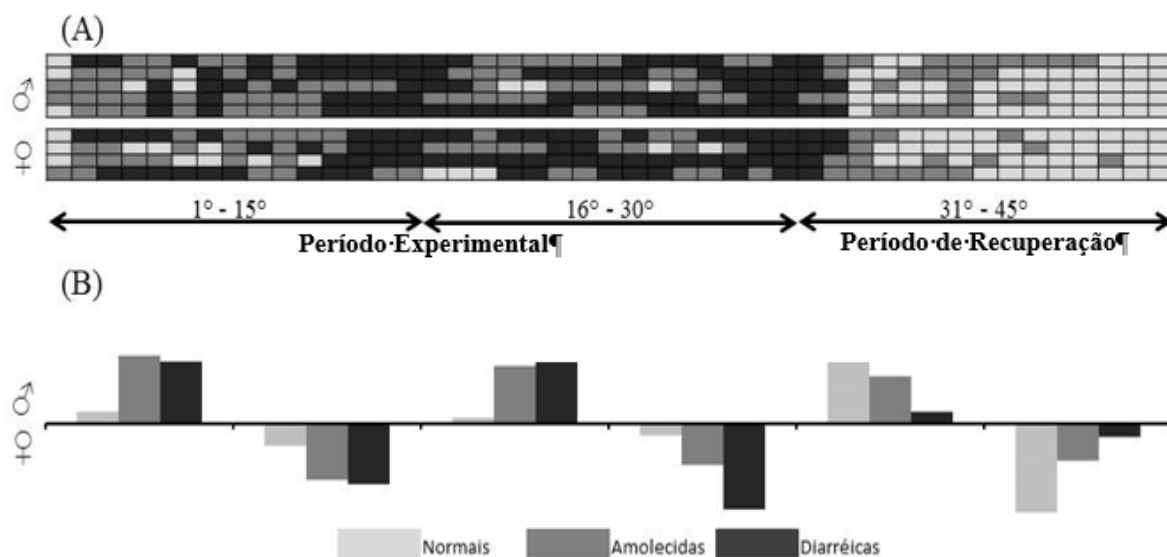


Fig. 2. Demonstrativo das fezes de machos (♂) e fêmeas (♀) de *Saguinus fuscicollis* ao longo do período experimental e de recuperação. (D) Demonstra as proporções de tipos de fezes por sexo a cada 15 dias de observação.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Em relação ao perfil das variáveis hematológicas, as hemácias (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e coeficiente de variação eritrocitária (RDW) foram diferentes para machos e fêmeas. Na medição de atividade da Gama Glutamil Transferase (GGT), os machos diferiram de forma significativa. Os demais parâmetros não apresentaram significância entre os sexos.

A dieta com glúten influenciou na consistência das fezes e na massa corporal dos animais. Além disso, essa dieta influencia em algumas variáveis do hemograma e da bioquímica clínica. Dessa forma, dietas com base em trigo, centeio ou cevada representam risco à saúde desses animais de cativeiro.

Portanto, estes resultados contribuem de forma positiva para abrangência do uso de hemogramas e bioquímicos como valores de referências para melhor avaliação clínica, estabelecendo uma acurácia na interpretação dos exames e intervenção veterinária.

5. REFERÊNCIAS

- AIMEE, M. Feeding strategies in sympatric red howler monkeys (*Alouatta seniculus*), saddleback tamarins (*Saguinus fuscicollis*) and squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*), in the pacaya-samiria national reserve, Peru. *The plymouth student scientist*. v.6, p.4-19, 2013.
- ARAÚJO, H.M.C. ARAÚJO, W. M. C. BOTELHO, R.B.A. ZANDONADI, R.P. Doença celíaca, hábitos, práticas alimentares e qualidade de vida. *Revista de Nutrição*. v.23, p.467-474. 2010.
- BETHUNE, M. T. BORDA, J. T. RIBKA, E. LIU, M. PHILLIPPI-FALKENSTEIN, K. JANDACEK, R. J. DOXIADIS, G. G. M. GRAY, G. M. KHOSLA, C. SESTAK, K. A non-human primate model for gluten sensitivity. *Plosone*. v.3, E1614, 2008.
- CINTRA, L. Estudo clínico laboratorial e anatomopatológico dos órgãos linfohematopoiéticos na síndrome do emagrecimento progressivo dos calitriquídeos mantidos em cativeiro. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
- FELINTO, V. T. Análise da Rotulagem quanto a presença de glúten em Chocolates. Monografia de especialização. Universidade de Brasília- Centro de Excelência em Turismo. Brasília, 2008.
- HEYMANN, E. W. BUCHANAN- SMITH, H. M. The behavioural ecology of mixed-species troops of callitrichine primates. *Cambridge Philosophical Societ, United Kingdom*. v. 75, p. 169–190. 2000.
- KUEHNEL, F. MIETSCH, M. BUETTNER, T. VERVUERT, I. ABABNEH, R. EINSPANIER, A. The influence of gluten on clinical and immunological status of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J. Med. Primatol*. 42: 300-3009, 2013.
- LUDVIGSSON, J. F. LEFFLER, D. A. BAI, J. C. BIAGI, F. FASANO, A. GREEN, P. H. R. HADJIVASSILIOU, M. KAUKINEN, K. KELLY, C.P. LEONARD, J. N. LUNDIN, K. E. A. MURRAY, J. A. SANDERS, D. S. WALKER, M. M. ZINGONE, F. CIACCI, C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut - British Society of Gastroenterology* v. 62. P. 43–52, 2013
- MARIETTA, E.V. DAVID, C.S. MURRAY, A. Important Lessons Derived from Animal Models of Celiac Disease. *International Reviews of Immunology*, 30:197-206, 2011.
- NOBRE, S. R. SILVA, T. CABRAL, J.E.P. Doença Celíaca Revisada. *Jornal Português de Gastreterologia*. v.14, 2007.
- RAVETTA, A. L. CALOURO, A. M. MESSIAS, M. R. Avaliação do Risco de Extinção de *Saguinus weddelli weddelli* (Deville, 1849) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. *ICMBio*, 2015.
- RÉDEL, G. P. Celiac Disease. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. v.6, p. 296-297, 2008.

RYLANDS, A.B. MITTERMEIER, R.A. *Saguinus fuscicollis ssp. weddelli*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2008.

RYLANDS, R. A. MITTERMEIER, J. S. SILVA. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*. The Zoological Society of London. v.46. p.11–24, 2012.

SMITH, A. C. Interspecific differences in prey captured by associating saddleback (*Saguinus fuscicollis*) and moustached (*Saguinus mystax*) tamarins. *Journal of zoology*. v.251, p.315-324. 2000.

STONE, A. Responses of squirrel monkeys to seasonal changes in food availability in an eastern amazon forest. *American Journal Primatology*.v.69, p.142-57, 2007.

VERDU, E. F. GALIPEAU, H. J. JABRI, B. Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nature reviews - Gastroenterology & Hepatology*. v.12, p.497–506, 2015.

ANEXOS

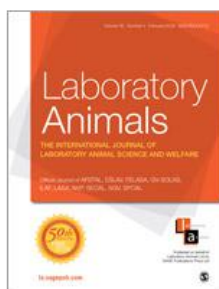
A-ANEXO I: **NORMAS PARA SUBMISSÃO À REVISTA *LABORATORY ANIMALS* PRETENDIDA PARA O ARTIGO 1: PARÂMETROS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE *Saguinus fuscicollis* CRIADOS EM CATIVEIRO.**

B-ANEXO II: **NORMAS PARA SUBMISSÃO À REVISTA *JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY* PRETENDIDA PARA O ARTIGO 2: EFEITOS DA DIETA COM GLÚTEN SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE *Saguinus fuscicollis* CRIADOS EM CATIVEIRO.**

C- ANEXO III: **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO DE ÉTICA DE NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO EVANDRO CHAVAS. PROTOCOLO N° 17/2015.**

D-ANEXO IV: **AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA - SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE – SISBIO. PROTOCOLO N° 47969-1.**

ANEXO I



Laboratory Animals

The international journal of laboratory animal science and welfare

2015 Impact Factor: 1.553

2015 Ranking: 50/161 in Zoology | 30/138 in Veterinary Sciences

2016 Release of Journal Citation Reports, Source: 2015 Web of Science Data

Published in Association with [Laboratory Animals Limited](#)

Editor-in-Chief

[Beat Riederer](#)

8.4 Manuscript preparation

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3 cm for left and right hand margins and 5 cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point.

8.4.1 Your title, keywords and abstracts: helping readers find your article online

The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting SAGE's Journal Author Gateway Guidelines on How to Help Readers Find Your Article Online.

Title page

The first page should contain the full title of the manuscript, a short title, the initials and last names of all the authors and their and affiliations, the department(s) and the institution(s) where the work was carried out; and the name, postal and email addresses and telephone and fax number of the author responsible for all communications about the manuscript and proofs.

The title should be concise, informative and must not be unnecessarily punctuated. The short title should be no more than six words long.

Abstract

An unstructured abstract of no more than 250 words (or no more than 200 words for Short Reports) and a list of up to five key words must accompany all Working Group Reports, Review Articles, Original Articles, and Short Reports. Letters to the Editor do not require an abstract. Ideally one of the key words should be replacement, reduction or refinement.

Headings

The first heading after the Abstract (usually Introduction) is omitted. Where appropriate, the remainder of the paper should be arranged under the headings Animals, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References.

Tables

Tables must be prepared using the Table feature of the word processor. Tables should not duplicate information given in the text, should be numbered in the order in which they are mentioned in the text, and should be given a brief title. Tables should each appear on a separate page at the end of the manuscript as part of the text file. Vertical rules and/or background shading should not be used. The legend of a table should be concise and enable the reader to understand the data without excessive reference to the text.

8.4.2 Corresponding author contact details

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Academic affiliations are required for all co-authors.

8.4.3 Guidelines for submitting artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's Manuscript Submission Guidelines. Figures supplied in colour will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from SAGE after receipt of your accepted article.

8.4.4 Guidelines for submitting supplemental files

This journal is able to host approved supplemental materials online, alongside the full-text of articles. Supplemental files will be subjected to peer-review alongside the article. For more information please refer to SAGE's Guidelines for Authors on Supplemental Files.

8.4.5 English language editing services

Non-English speaking authors who would like to refine their use of language in their manuscripts might consider using a professional editing service. Visit English Language Editing Services on our Journal Author Gateway for further information.

8.4.6 References

General

1. Reference numbers have full points in the reference list.
2. Please ensure that publications are referenced in the order in which they appear in the text.
3. Journal titles should be abbreviated according to the standard in the Index Medicus. If unsure, please check for any inconsistencies within reference lists. For STM journals, please refer also to the following: <http://scieng.library.ubc.ca/coden/>.
4. Do not separate initials with spaces or full points, but add a full point after last initial before the title.
5. Up to three authors may be listed. If more, then list the first three authors and represent the rest by et al. Fewer author names followed by et al. is also acceptable. Where et al. is used, it should always be upright, not italic in both references and textual citations.
6. Last Names containing de, van, von, De, Van, Von, de la, etc. should be listed under D and V respectively. List them as: De Roux DP and not Roux DP, de. When cited in the main text without the first name, use capitals for De, Van, Von, De la, etc. (Van Dijk, year)
7. Names containing Jr or II should be listed as follows: • Author Last Name Initial Jr (year) • Author Last Name Initial II (year)

2. Text citations

Please use superscript numerals after the punctuation (STM) or numbers in square brackets (HSS), and check that it corresponds to the correct number in the reference list.

3. Reference styles

Book

1. Huff D. How to lie with statistics. 4th ed. London: Penguin, 1991, p.51.

Chapter in book

1. Huff D and Black TL. Comprehensive statistics. In: Miller C and Smith H (eds) How to lie with statistics. 4th ed. London: Penguin, 1991, pp.51–55.

Journal article

1. Ludbrook J, Miller T and Russel A. Musculo-venous pumps in the human lower limb. *Am Heart J* 1966; 71: 635–641.
2. Araki C, Black TL, Patberg FT, et al. Significance of calf muscle pump function in venous ulceration. *J Vasc Surg* 1994; 20: 872–879.

Journal article published ahead of print

1. Ludbrook J. Musculo-venous pumps in the human lower limb. *Am Heart J*. Epub ahead of print 12 June 2011. DOI: 10.1177/095443271167940.

Website

1. Smith JR. Choosing your reference style. *Online Referencing* 2(3), <http://orj.sagepub.com> (2003, accessed 12 October 2008).

2. National Center for Professional Certification. Factors affecting organizational climate and retention, www.cwla.org/programmes/triechmann/2002fbwfiles (2002, accessed 10 July 2010). Conference paper 1. Peters J. Musculo-venous pumps in the human lower limb. In: ASME conference on automatic transmissions (ed A O'Brien), Pisa, Italy, 29 May–2 June 2003, paper no. GE1234, pp.4–10. New York: ASME.

Thesis/dissertation

1. Clark JM. Referencing style for journals. PhD Thesis, University of Leicester, UK, 2002.

Patent and patent applications

1. Smith ST. Referencing styles for journals – a new method. Patent 12346-ZH, USA, 2011.

2. Jones P. Referencing styles for journals – a new method. Patent application 12346-ZHA, USA, 2011.

Report (published/unpublished)

1. MacDonald S. The state of social welfare in the UK. Report, University of Durham, UK, June 2011.

2. Citigroup Ltd. How to make your money work for you. Report for the Department of Finance. Report no. 123345, 13 June 2011. Oxford: OUP

SAE/JSAE etc. papers

1. Clark JM. A new exhaust gasket manifold for powertrains. SAE paper 2002-0101234, 2002.

Newspaper/magazine

1. Clark JM. Referencing style for journals. *The Independent*, 21 May 2006, p.10. Package insert (medical etc.) 1. Eisai Inc. Aloxi (package insert). New York: Esai Inc, 2008.

Manual (automotive etc.)

1. Fiat. Driver's manual, Fiat Uno 4-litre diesel model, December 2010.

Standard

1. ISO 27799:2008. Information security management in health.

ANEXO II



Journal of Medical Primatology

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Preston A. Marx

Impact Factor: 0.819

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 73/133 (Veterinary Sciences); 103/154 (Zoology)

Online ISSN: 1600-0684

Author Guidelines

Effective with the 2011 volume, *Journal of Medical Primatology* will be published in an online-only format. All normal author benefits and services remain in place e.g. authors will continue to be able to order print reprints of articles if required. Furthermore, there will be no cost to authors for the publication of colour images in the online-only edition. Please see the author instructions for full details.

Print subscription and single issue sales are available from Wiley's Print-on-Demand Partner. To order online click through (<http://www.sheridan.com/LPM/Wiley>) to the ordering portal from the journal's subscribe and renew page on WOL.

General Observations

Only original papers written in American or British style will be considered; both styles cannot be used in the same manuscript.

Submit your manuscript online at:

<http://mc.manuscriptcentral.com/jmp> (<http://mc.manuscriptcentral.com/jmp>).

Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. Support can be contacted by clicking the 'Get Help Now' link which appears at the top right of every ScholarOne Manuscripts page.

All manuscripts are subject to editorial review. All submissions will be anonymously reviewed by 1 or more experts in the subject field. *Journal of Medical Primatology* requires all authors to suggest three reviewers that have published in the same area as the manuscript, preferably within the past 5 years. Author and co-authors must not have published with any of the suggested reviewers for 3 years or more. Suggested reviewers may not be affiliated with the same institution as the author or co-authors and must be active researchers in the field of research in the manuscript. Non-adherence may cause delays in review of the manuscript. Complete mailing addresses and email addresses must be provided for all three reviewers. Middle name initials are mandatory. Manuscripts should be submitted online only at <http://mc.manuscriptcentral.com/jmp> (<http://mc.manuscriptcentral.com/jmp>). Upon submission of a manuscript all co-authors should also be registered with correct e-mail addresses. The manuscript should be double-spaced with at least 25mm (1") margins. All pages must be numbered in sequence beginning with the title page.

Arrangement

Title Page

The title page should contain the complete article title, names and affiliations of all authors, institution(s) at which the work was performed with city, state, or country, acknowledgments of funding, name, address, telephone number, fax number for all correspondence, a running head of not more than 48 characters, and the total number of text figures and tables.

Key Words

Key words are needed for indexing purposes; a list of 3-10 words *not used in the title* should be provided.

Abstract

An abstract of no more than 150 words should summarize in general terms but not in detail the major findings and conclusions. The abstract should be structured under the four headings: Background, Methods, Results and Conclusions. The abstract serves in lieu of a concluding summary and should be intelligible without reference to the rest of the paper.

Text

Text should follow the format: Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and Acknowledgments. Acknowledgments must be terse. Accreditation by professional organizations should not be listed, nor should adherence to animal welfare laws be stated. It is assumed that all authors and institutions are in compliance with ethical standards and their national laws and regulations. Subheadings and paragraph titles should be used whenever possible. All abbreviations must be defined at first mention. Proprietary drug names must be followed by the name and address (town and state) of the firm in brackets. American measuring units must be accompanied by metric translation. All numbers under ten have to be spelled out except when used in comparisons with another, higher number, e.g., 8 of 12, but three of eight. Use only numbers as superscripts in tables; do not use symbols such as asterisks, daggers, or letters. Do not use the symbol '#' for number; use only the word 'number', 'No.', or 'N'. The terms *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, etc. must be in italics. All species names must be in italics.

Materials and Methods

Humane Care Guidelines

Papers will be accepted for publication only if the animals in the research were cared for and

used humanely. The **FIRST** sub-section in the Materials and Methods section must be 'Humane Care Guidelines'. For studies using client-owned animals (ie. Zoo's, wildlife conservation etc), a statement indicating that they demonstrate a high standard (best practice) of veterinary care. For research conducted in the USA, the Materials and Methods must include a statement that Institutional Animal Care and Use Committee approval was obtained. Research performed outside the United States must conform to the guidelines of that country and a statement to this effect must be added to the materials and methods. Generally, humane care and use will be evaluated on the following:

a) AALAS 'Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals' (which is based on the U.S. Government 'Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training') and b) comply with National standards, such as the United States Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals (Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, Office of Laboratory Animals, National Institutes of Health, RKL. 1, Suite 1050, MSC 7982, 6705 Rockledge Drive, Bethesda, MD 20892-7982 USA); the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, National Academy Press, Washington D.C., 1996, or subsequent revisions), and the Animal Welfare Act and subsequent amendments. Unique animal identifiers and location of animals used must be provided. Names such as animal A, B, etc. or animal 1, 2, etc are not permitted.

References

References should include only those publications cited in the text. They must be arranged alphabetically and then numbered consecutively. In text, reference numbers only must be placed in brackets, citations by name and year are not acceptable. All references must follow the Index Medicus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) style, citing in sequence the author's surname(s), or initial(s), title of the article, abbreviated journal name, year of publication, and volume number inclusive of page.

Examples

a) *Journal*

Glosser JW: Responsibility of the regulator to the regulated community. *J Med Primatol* 1990; 19:1-8.

b) *Chapter in a book or proceedings*

Muchmore E: Hepatitis surveillance standards for hepatitis studies in a chimpanzee colony. In: *The Standardization of Animals to Improve Biomedical Research, Production and Control*. XVIth IABS Congress. Kalter & Hennessen (eds). Karger: Basel 13-21, 1980.

c) *Book*

Socha WW, Ruffié J: *Blood Groups of Primates: Theory, Practice, Evolutionary Meaning*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1983

References in Articles

We recommend the use of a tool such as Reference Manager (<http://www.refman.com/> (<http://www.refman.com/>)) for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp> (<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>)

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp> (<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>)

Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each table should be in a separate file, with titles making them self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: At the Editor's discretion clinical photographs, photomicrographs, line drawings and graphs will be published as figures. All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

ANEXO III



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47968-1	Data da Emissão: 08/04/2016 09:26	Data para Revalidação*: 07/06/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: TAIANARA TOCANTINS GOMES ALMEIDA	CPF: 624.513.593-15
Título do Projeto: Influência do glúten na expressão gênica de BETA defensiva e receptor Toll like 5 séricos em <i>Saguinus fuscicollis wedelli</i>	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 06.200.001/0001-01

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Submissão do Projeto ao CEPF e CEUA	03/2015	04/2015
2	Coleta de dados	04/2015	05/2015
3	Análise de dados	05/2015	07/2015
4	Redação da dissertação de mestrado	05/2015	09/2015
5	Defesa do trabalho para banca examinadora	09/2015	09/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO cobre o pesquisador titular e os membros de sua equipe de necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.bama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação de legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso e componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ggen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso de infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	PALUO HENRIQUE GOMES DE CASTRO	APOIO TÉCNICO	251.854.452-34	1548771 SSP/PA	Brasileira
2	Wellington Bandeira da Silva	APOIO TÉCNICO	083.105.267-64	507935-8 MB-RJ	Brasileira
3	Frederico Ozanan Barros Monteiro	COLABORADOR	484.752.843-15	94029004946 SSP-CE	Brasileira
4	Ednaldo da Silva Filho	COLABORADOR	576.778.912-88	2621754 SSP/PA	Brasileira
5	Marta Vivina Barros Monteiro	COLABORADORA	515.827.885-72	88865385 SSP-CE	Brasileira
6	ALINE ASSIOL IMBELLONI	APOIO TÉCNICO	803.885.71267	4888179 P. CIVIL/PA	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	DESCRIÇÃO DO LOCAL	TIPO
1	ANANINDEIA	PA	CENTRO NACIONAL DE PRIMATAS	Forn de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73775741



Página 1/3



Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47989-1	Data da Emissão: 08/04/2016 09:25	Data para Revalidação*: 07/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: TAIANARA TOCANTINS GOMES ALMEIDA	CPF: 624.513.593-15
Título do Projeto: Influência do glúten na expressão gênica de BETA defensina e receptor Toll like 5 sérios em <i>Saguinus fuscicollis wedelli</i>	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Saguinus fuscicollis wedelli</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primates)	Captura manual
3	Método de marcação (Primates)	Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZONIA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73775741



Página 2/3

ANEXO IV

CEUA



CERTIFICADO n° 21/2015

Certificamos que o projeto intitulado “Influência do glúten na expressão gênica de β – defensina e toll like 5 séricos em *Saguinus fuscicollis wedelli*”, protocolo n° 17/2015, sob a responsabilidade de Frederico Ozanan Barros Monteiro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC, em reunião de 28/04/2015.

Vigência do Projeto	01/08/2015 a 01/12/2016			
Espécie /linhagem	<i>Saguinus Fuscicollis wedelli</i>			
N° de animais	5	5	-	Total: 10
Peso	350 a 500g	350 a 500g	-	
Idade	24 a 36 meses	24 a 36 meses	-	
Sexo	Masculino	Feminino	-	
Origem	Biotério do CENP/IEC			


De acordo com Orientação Técnica n° 5, de 27 de abril de 2015 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 16 de julho de 2015.


 Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
 CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS


 Livia Medeiros Neves Casseb
 Coordenadora da CEUA