

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**VANESSA SOUZA ALTINO**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS NÃO INVASIVOS PARA MONITORAR O ESTRESSE  
EM PACAS (*Cuniculus paca*) CRIADAS EM CATIVEIRO**

**ILHÉUS – BAHIA  
2018**

**VANESSA SOUZA ALTINO**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS NÃO INVASIVOS PARA MONITORAR O ESTRESSE  
EM PACAS (*Cuniculus paca*) CRIADAS EM CATIVEIRO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Produção e Comportamento Animal

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Selene Siqueira da Cunha Nogueira

**ILHÉUS – BAHIA  
2018**

A468

Altino, Vanessa Souza.

Validação de métodos não invasivos para monitorar o estresse em pacas (*Cuniculus paca*) criadas em cativeiro / Vanessa Souza Altino.– Ilhéus, BA: UESC, 2018.

xiv, 114f. :il.; anexos.

Orientador: Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Animais – Comportamento alimentar. 2. Bem-estar dos animais. 3. Glicocorticóides. 4. Cortisol. 5. Pacas. 6. Comportamento animal. 7. Comportamento estereotipado. 8. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. 9. Animais silvestres em cativeiro. 10. Nutrição. 11. Stress (Fisiologia). I. Título.

CDD 591.53

**VANESSA SOUZA ALTINO**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS NÃO INVASIVOS PARA MONITORAR O ESTRESSE  
EM PACAS (*Cuniculus paca*) CRIADAS EM CATIVEIRO**

Ilhéus – BA, 26/02/2017

---

Prof. Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho  
UESC/DCAA  
(Orientador)

---

Prof. Dra. Selene Siqueira da Cunha Nogueira  
UESC/DCB  
(Co-orientadora)

---

Prof. Dr. Yvonnick Le Pendu  
UESC/DCB

---

Dra. Stella Guedes Calazans  
UESC/DCB

---

Prof. Dr. Vanner Boere Souza  
UFSB/IHAC

---

Prof. Dra. Elena Lucia Anna Malpezzi-Marinho  
UESC/DCB

**ILHÉUS – BAHIA**

**2018**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus sobrinhos Gabriel, Miguel e Maria Julia.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família que aqui quero representar pela minha irmã Bianca, sobrinho Gabriel e mãe Benezina, pela compreensão de minha ausência durante esses quatro anos e pelas expressões de carinho à distância.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho, meu orientador, e a Profa. Dra. Selene Siqueira da Cunha Nogueira, minha co-orientadora, pela orientação, ensinamento transmitido, extrema paciência, confiança e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Cesar Andrade por ter me apresentado à zootecnia de animais silvestres, ainda na graduação, e por ter me incentivado a sair do meu “país”, a Amazônia, para fazer doutorado na Universidade Estadual de Santa Cruz.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, pela concessão da bolsa de doutorado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche na Bélgica.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo financiamento à pesquisa.

Agradeço à Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, representado pelo Prof<sup>o</sup>. Dr. Jérôme Bindelle, como também aos funcionários e bolsista pelos meses que acompanhei seus experimentos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, em especial ao secretário Eduardo e estagiários, por sempre estarem dispostos em ajudar a resolver as burocracias.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pelos ensinamentos, críticas e sugestões.

Agradeço aos funcionários, bolsistas e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal (LabNut) e Laboratório de Nutrição e Alimentação de Peixes (Aquanut) pela realização de algumas análises e pela amizade.

Agradeço aos funcionários, bolsistas e colaboradores do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), UNESP Jaboticabal, em especial o coordenador do grupo, Prof<sup>o</sup>. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, a pós-doc Mar Roldan Romero e ao doutorando David Javier Galindo Huamán pela realização das análises de metabólitos e glicocorticoides e toda paciência e amizade de todos.

Agradeço aos meus colegas da Pós-graduação e de outros programas de Pós-graduação, em especial à Deise Costa, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Etologia Aplicada, Carol, Danilo, Diego, José, Julie, Laise, Letícia, Lorena, Pedro, Rafael, Rogério, Stella, Thaise e Zara pelo companheirismo e ajuda nas horas difíceis e momentos de tensão.

Agradeço aos demais amigos que até agora, durante minha vida acadêmica e fora dela, me estimularam a seguir na caminhada apesar das imensas dificuldades.

Agradeço a Ednilson Domingos da Costa Ribeiro, o Deni, tratador dos animais do Laboratório de Etologia Aplicada pela dedicação e respeito aos nossos animais e por sua disposição em ajudar a todos do laboratório em seus experimentos.

Um especial agradecimento às pacas, objetos de estudo de minha tese.

## VALIDAÇÃO DE MÉTODOS NÃO INVASIVOS PARA MONITORAR O ESTRESSE EM PACAS (*Cuniculus paca*) CRIADAS EM CATIVEIRO

### RESUMO

Medidas fisiológicas podem ser utilizadas para avaliar as condições de criação dos animais, pois em ambiente com bem-estar empobrecido, normalmente ocorre elevação da produção de glicocorticoides produzidos pelas glândulas adrenais e que posteriormente são excretados nas fezes na forma de metabólitos. O incremento desses metabólitos, contudo, não é exclusivo de situações aversivas. Por isso, recomenda-se a análise de dados comportamentais para a correta interpretação das medidas fisiológicas. A hipótese do estudo foi que era possível monitorar a atividade da glândula adrenal de paca (*Cuniculus paca*) por meio da concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes (MGCF) e que, sob estresse agudo, haveria alteração na expressão de comportamentos, consumo de alimento e digestibilidade dos nutrientes na espécie. Foram usados quatro machos adultos que foram submetidos ao teste de desafio do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) exógeno mantidos em gaiola de metabolismo, distribuídos em delineamento quadrado latino (4x4). Foram utilizados quatro tratamentos: sem manejo; injeção intramuscular de solução salina; injeção intramuscular de ACTH baixo (0,18 mL ACTH) e injeção intramuscular de ACTH alto (0,37 mL ACTH). Amostras de fezes e dos alimentos consumidos foram coletadas e analisadas para determinar os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes. Adicionalmente, foi medida a concentração de MGCF. Ao longo de todo período experimental os animais foram gravados continuamente para que fosse possível realizar a comparação das proporções de tempo gasto nos padrões comportamentais de atividade alimentar, exploratório, inativo, conforto e pacing. Por meio de ensaio imunoenzimático, usando anticorpo para cortisol, verificou-se um pico na concentração de MGCF, nas fezes coletadas no dia seguinte após aplicação do tratamento ACTH alto. Além disso, determinou-se a concentração média basal para MGCF em 36,0 ( $\pm 11,7$ ) ng/g de fezes secas, sem variação na excreção de MGCF ao longo das horas do dia. No dia de aplicação dos tratamentos, as pacas permaneceram mais inativas ( $60,1 \pm 27,5\%$ ,  $P < 0,001$ ) e desprenderam menos tempo com a alimentação ( $13,5 \pm 19,0\%$ ,  $P < 0,001$ ) em relação aos outros dias de observação ( $33,9 \pm 21,9\%$  e  $39,4 \pm 10,6\%$ , respectivamente). Contudo, não verificou-se variação no consumo de matéria seca (MS) e digestibilidade de nutrientes ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Observamos porém que todas as pacas consumiram uma quantidade inferior de nitrogênio (N) digestível ao recomendado para a espécie. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao processo de empatia: animais que passaram por ambos os tratamentos controle (sem manejo e solução salina), apresentaram médias similares de consumo alimentar e digestibilidade dos nutrientes em relação aos animais submetidos a estresse agudo causado pelo ACTH. Conclui-se que é possível usar a concentração de MGCF, utilizando análise imunoensaio enzimático (EIA) com anticorpo cortisol, para monitoramento não invasivo do estresse na paca. Pode-se usar também a proporção de tempo gasto em alimentação e inatividade, como indicadores de estresse para a paca.

**Palavras-chave:** bem-estar animal, corticosterona, cortisol, cuniculidae, etologia aplicada



**VALIDATION OF A NON-INVASIVE METHOD TO MONITOR STRESS IN PACA**  
**(*Cuniculus paca*)**

**ABSTRACT**

Physiological measures can be used to evaluate the breeding conditions of the animals, because in an environment with poor welfare, there is usually an increase in the production of glucocorticoids produced by the adrenal glands and which are later excreted in the feces in the form of metabolites. The increment of these metabolites, however, is not exclusive of aversive situations. Therefore, it is recommended the analysis of behavioral data for the correct interpretation of physiological measures. The study hypothesis was that it was possible to monitor the activity of the paca adrenal gland (*Cuniculus paca*) through the concentration of glucocorticoid metabolites in feces (MGCF) and that, under acute stress, there would be changes in the expression of behavior, food consumption and digestibility of nutrients in the species. Four adult males were submitted to the exogenous adrenocorticotrophic hormone (ACTH) challenge test maintained in a metabolism cage, distributed in a Latin square (4x4) design. Four treatments were used: unhandled; intramuscular injection of saline solution; intramuscular injection of ACTH is low (0.18 mL ACTH) and intramuscular injection of ACTH high (0.37 mL ACTH). Samples of feces and food consumed were collected and analyzed to determine the digestibility coefficients of nutrients. Additionally, the FGCM concentration was measured. Throughout the experimental period the animals were recorded continuously so that it was possible to compare the proportions of time spent in behavioral patterns of food activity, exploratory, inactive, comfort and pacing. Through an enzyme immunoassay using antibody to cortisol, a peak in the concentration of MGCF in the feces collected the next day after application of the high ACTH treatment was found. In addition, the mean baseline concentration for MGCF was determined at 36.0 ( $\pm 11.7$ ) ng/g of dry feces, without variation in MGCF excretion over the hours of the day. During the day of application of treatments, the pacas were observed more time inactive ( $60.1 \pm 27.5\%$ ,  $P < 0,001$ ) and less time feeding ( $13.5 \pm 19.0\%$ ,  $P < 0,001$ ) in relation to the other days of observation ( $33.9 \pm 21.9\%$  and  $39.4 \pm 10.6\%$ , respectively). However, there was no variation in the consumption of dry matter (DM) and nutrient digestibility ( $P > 0.05$ ) between treatments. But we noticed that all of the pacas consumed a lower amount of digestible N recommended for the species. This was probably due to the process of empathy: animals that have passed through the two control treatments (unhandled and saline solution), presented similar averages of food intake and digestibility of nutrients of animals submitted to acute stress caused by the injection of two doses of ACTH. We conclude that it is possible to use the concentration of FGCM, using EIA with cortisol antibody, for non-invasive monitoring of stress in the paca. We can also use the proportion of time spent on food and inactivity, as indicators of stress for the paca.

**Keywords:** animal welfare, applied ethology, corticosterone, cortisol, breeding of wild animals.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA. 1. Fezes e cecotrofo de pacas (A - fezes no formato de cíbala; B - cecotrofo).....22

### Artigo Científico II

**Fig. 1.** Curve of parallelism with the corticosterone antibody. The continuous line represents the dilutions of the standard curve and the dashed line represents the pool dilution curve of the samples. ....54

**Fig. 2.** Curve of parallelism with the cortisol antibody. The continuous line represents the dilutions of the standard curve and the dashed line represents the pool dilution curve of the samples. Standard curve was  $y = -0.0349x + 3.0247$ ,  $R^2 = 0.944$  and for the dilutions of fecal samples with ACTH high was  $y = -0.0333x + 3.4587$ ,  $R^2 = 0.977$ . ....54

**Fig. 3.** Means ( $\pm$  standard error) of the increase (%) in the concentration of fecal glucocorticoid metabolite (FGCM) samples of the paca previous and after the treatments unhandled, saline, ACTH low (0.18 mL of ACTH) and ACTH high (0.37 mL of ACTH) by the corticosterone EIA .....55

**Fig. 4.** Means ( $\pm$  standard error) of the increase (%) in the concentration of glucocorticoid metabolites in fecal samples (FGCM) of the paca previous and after the treatments unhandled, saline, ACTH low(0.18 mL of ACTH) and ACTH high (0.37 mL of ACTH) by the cortisol EIA. ....56

**Fig. 5.** Mean ( $\pm$  standard errors) of FGCM concentration along the day using EIA with antibody to cortisol in the pacas samples collected before challenge day.....57

**Fig. 6.** Mean ( $\pm$  S.E.) of the percentage of behavioral patterns inactivity and feeding observed

in pacas from 8:00 h to 9:00 h ( $n = 16$ ). Different letters above columns of the same behavioral pattern show differences between observational days by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

.....58

### **Artigo Científico III**

Figura 1. Efeito das pacas sobre a média ( $\pm$ erro padrão) do coeficiente de digestibilidade de quatro nutrientes. CDs: coeficientes de digestibilidade; CDPB: coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEE: coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDFDN: coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CDFDA: coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido. Diferenças significativas entre os coeficientes de digestibilidade são identificadas com letras diferentes (a-b).....77

**LISTA DE TABELAS****Artigo Científico II**

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1</b> Description of behaviours patterns observed for the pacas..... | 52 |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|

**LISTA DE TABELAS****Artigo Científico III**

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Composição bromatológica (% na matéria seca, a não ser quando especificado) dos ingredientes e da dieta ..... | 74 |
| Tabela 2. Consumo diário (média.±DP) dos nutrientes, base de matéria seca em pacas. ....                                | 76 |
| Tabela 3. Coeficiente de digestibilidade dos nutrientes e energia bruta em pacas. ....                                  | 76 |

## SUMÁRIO

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                     | <b>15</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                   | <b>17</b> |
| 2.1 Objetivo Geral.....                                                     | 17        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                             | 17        |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                        | <b>18</b> |
| 3.1 Características da paca ( <i>Cuniculus paca</i> ) .....                 | 18        |
| 3.2 Criação de paca em cativeiro .....                                      | 19        |
| 3.3 Alimentação e nutrição da paca .....                                    | 21        |
| <b>4. ARTIGO CIENTÍFICO I .....</b>                                         | <b>23</b> |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                     | <b>25</b> |
| <b>BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE .....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>VALIDAÇÃO DO MONITORAMENTO ENDÓCRINO NÃO INVASIVO.....</b>               | <b>29</b> |
| <b>MONITORAMENTO DE COMPORTAMENTOS INDICADORES DE ESTRESSE .....</b>        | <b>31</b> |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                           | <b>32</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                     | <b>33</b> |
| <b>5. ARTIGO CIENTÍFICO II.....</b>                                         | <b>42</b> |
| <b>5.1 Introduction.....</b>                                                | <b>45</b> |
| <b>5.2 Materials and methods .....</b>                                      | <b>47</b> |
| 5.2.1 <i>Animals and housing conditions</i> .....                           | 47        |
| 5.2.2 <i>ACTH challenge and sample collection</i> .....                     | 48        |
| 5.2.3 <i>Hormone extraction and enzyme immunoassay</i> .....                | 49        |
| 5.2.4 <i>Enzyme immunoassay validation and hormonal determination</i> ..... | 50        |
| 5.2.5 <i>Observational data collection</i> .....                            | 51        |
| <b>5.3 Results .....</b>                                                    | <b>53</b> |
| 5.3.1 <i>Biochemical validation of EIA</i> .....                            | 53        |
| 5.3.2 <i>ACTH Challenge</i> .....                                           | 55        |

|                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3.3 Behavioral responses to stress.....                      | 57         |
| 5.4 Discussion .....                                           | 58         |
| 5.5 Conclusion .....                                           | 60         |
| References.....                                                | 62         |
| <b>6. ARTIGO CIENTÍFICO III .....</b>                          | <b>69</b>  |
| 6.1 INTRODUÇÃO.....                                            | 72         |
| 6.2 MARERIAL E MÉTODOS .....                                   | 73         |
| 6.2.1 Local de estudo, animais e procedimentos .....           | 73         |
| 6.2.2 Ensaio de digestibilidade e análises bromatológicas..... | 74         |
| 6.2.3 Análise estatística .....                                | 75         |
| 6.3 RESULTADOS .....                                           | 75         |
| 6.4 DISCUSSÃO.....                                             | 77         |
| 6.5 CONCLUSÃO .....                                            | 80         |
| REFERÊNCIAS.....                                               | 81         |
| <b>7. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>                              | <b>84</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                       | <b>85</b>  |
| <b>ANEXO I .....</b>                                           | <b>90</b>  |
| <b>ANEXO II.....</b>                                           | <b>91</b>  |
| <b>ANEXO III.....</b>                                          | <b>107</b> |

## INTRODUÇÃO

Tem a percepção que as necessidades básicas e o bem-estar dos animais criados em cativeiro não são suficientemente atendidos (NIMON; BROOM, 2001). Porém, o nível de estresse pode ser avaliado por meio da interpretação de alterações dos comportamentos funcionais, como vocalização, agressividade, ingestão de água e alimentos sólidos, padrão de sono e níveis de atividade (SQUIRES, 2003). Outra forma de avaliar o estresse é por meio de interpretações de medidas endócrinas (MILLSPAUGH; WASHBURN, 2004).

A exposição dos animais a estímulos estressores, como a perseguição por um predador ou a competição com um coespecífico, normalmente ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), estimulando a produção de hormônios glicocorticoides pelo córtex adrenal, cortisol ou corticosterona (SAPOLSKY, 2002). Os glicocorticoides (GC) produzidos pela glândula adrenal estão envolvidos na mobilização de energia para os músculos, preparando o animal para a resposta de “luta ou fuga” (SAPOLSKY, 1983). Simultaneamente os glicocorticoides suprimem temporariamente os sistemas imunológico, reprodutivo e digestivo até o agente estressor seja reduzido ou eliminado (SQUIRES, 2003).

A coleta de medidas endócrinas requer que os animais sejam capturados e imobilizados para que o sangue seja coletado, o que provoca um estresse agudo afetando os parâmetros fisiológicos que se pretende monitorar. Por este motivo, foi proposto um método de monitoramento da atividade adrenal considerado não invasivo: a determinação da concentração dos metabólitos dos glicocorticoides nas fezes (MGCF). Para o seu uso efetivo, é preciso que o método seja validado para cada espécie (TOUMA; PALME, 2005). É necessário que seja comprovado que a concentração dos MGCF daquela espécie reflete a atividade da glândula adrenal. O método já foi validado em animais domésticos de produção, como boi (PALME et al., 1999; MÜLLEDER et al., 2003), ovelha (LEXEN et al., 2008), cavalo (MÖSTL et al., 1999; JAKUBOWSKA et al., 2010) e galinha (RETTENBACHER et al., 2004; KJAER et al., 2011). Também há estudos que validaram esta técnica para monitorar o estresse em animais selvagens tanto em vida livre quanto em cativeiro: coruja (*Strix occidentalis caurina*) (WASSER et al., 1997), chimpanzé (*Pan troglodytes*) (WHITTEN et al., 1998), hienas (*Crocuta crocuta*) (GOYMANN et al., 1999), macaco prego (*Cebus apella nigrurus*) (LYNCH et al., 2002), marta (*Mustela vison*) (HANSEN et al., 2007; MALMKVIST et al., 2011) cateto (*Pecari tajacu*) (NOGUEIRA et al., 2011; CORADELLO et al., 2012).



Para a paca (*Cuniculus paca*), no entanto, ainda não foi validado o uso da concentração MGCF para monitorar o estresse.

A carne da paca é a mais apreciada entre as dos mamíferos silvestres neotropicais (REDFORD; ROBINSON, 1991; NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999; GOMES et al., 2013). Por ser considerada uma importante fonte de proteína animal para populações tradicionais que habitam florestas e seu entorno, existe a proposta da criação dessa e de outras espécies neotropicais para reduzir a pressão da caça (NOGUEIRA; NOGUEIRA-FILHO, 2011). Nos criadouros, são comumente alojadas em pares, mas esse manejo não é o mais adequado tendo em vista a necessidade de construir recintos para cada casal, o que eleva os custos de produção (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999). Uma alternativa para resolver este problema seria alojá-las em grupos de um macho e três a cinco fêmeas, seguindo a metodologia descrita por Smythe e Brown de Guanti (1995). Nos últimos 10 anos, alguns produtores têm criado a paca nos mesmos recintos que cutias (*Dasyprocta* spp.), visando reduzir custos com instalações e manejo. No entanto, não se sabe quais são as consequências deste tipo de manejo sobre o bem-estar de pacas e cutias criadas em cativeiro.

Diante da necessidade de encontrar mecanismos que avaliem as condições de bem-estar animal nas criações de pacas, pretendeu-se com este estudo validar o método não invasivo de monitoramento da atividade adrenal por meio dos metabólitos de glicocorticoides fecais e verificar a influência do estresse induzido sobre o consumo de alimentos e digestibilidade dos nutrientes. O aumento na concentração de glicocorticoides, contudo, não é exclusivo de situações adversas. Um dos efeitos do enriquecimento ambiental, por exemplo, é a promoção da atividade em animais e, conseqüentemente, leva ao incremento de glicocorticoides (DAWKINS et al., 2004). Dawkins (2008), destaca que é necessário que observações comportamentais sejam analisadas em conjunto com os dados fisiológicos para a interpretação correta das medidas hormonais. Por este motivo, pretendeu-se nesse estudo também identificar potenciais comportamentos indicadores de estresse para a espécie.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Validar o monitoramento não invasivo do estresse na paca (*Cuniculus paca*) por meio da concentração dos metabolitos de glicocorticoides nas fezes e da expressão de comportamentos indicadores de estresse.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar se a atividade adrenal da paca pode ser mensurada pela concentração de metabólitos de glicocorticoides em suas fezes.
- Identificar comportamentos indicadores de estresse em pacas submetidas ao estresse agudo.
- Avaliar o efeito do estresse induzido em pacas sobre o consumo alimentar e digestibilidade de nutrientes.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Características da paca (*Cuniculus paca*)

A paca é uma animal que possui corpo robusto e notadamente musculoso (COLLET, 1981; SILVA, 1984) tendo o comprimento de 60 a 82 cm e peso de 6,3 a 10,0 kg, podendo chegar até 12,0 kg em cativeiro (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999). Pacas possuem pelos grossos e curtos com coloração no dorso que varia do pardo escuro até o marrom claro, possuindo de três a cinco linhas pontilhadas brancas ao longo da lateral do corpo e, no ventre, apresentam pelos de cor branca. Há a presença de dois pares de mamas, sendo um na região peitoral e o segundo par na região inguinal (AUGUSTO et al., 2002).

É classificada no filo Chordata, classe Mammalia, subclasse Theriiformes, infraclasse Holotheria, ordem Rodentia, subordem Hystricognatha, família Cuniculidae, gênero *Cuniculus* e espécie *Cuniculus paca* (WILSON; REEDER, 2005). São descritas cinco subespécies *C. p. paca*, *C. p. quanta*, *C. p. mexicana*, *C. p. nelsoni* e *C. p. virgata* (WILSON; REEDER, 2005). Na literatura científica, a espécie também é nomeada com o sinônimo *Agouti paca*. Desde 1984, contudo, um parecer oficial da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN), a família Cuniculidae e gênero *Cuniculus* foram considerados substitutos válidos para Agoutidae e *Agouti*, respectivamente (CORBET; HILL, 1991).

A paca distribui-se do sudeste do México ao norte da Argentina, ocupando toda a América Central, Trinidad e Tobago, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Paraguai, norte da Argentina e foi introduzida em Cuba e na Argélia (PÉREZ, 1992; EISENBERG; REDFORD, 1999). É encontrada desde o nível do mar até 2000 metros de altitude (BOTELLO et al., 2005). A espécie ocupa preferencialmente as florestas tropicais, subtropicais, mas pode ocorrer em manguezais e florestas decíduas (MONDOLFI, 1972; MATAMOROS, 1982; SILVA, 1984; PÉREZ, 1992; MONTES, 2005; ZUCARATTO et al., 2010). Usualmente, procura áreas florestadas próximas a cursos d'água, como rios, lagoas e riachos (EMMONS, 1990; AQUINO et al., 2009). Também é encontrada em áreas de vegetação secundária, pastagens e culturas agrícolas. Nessas áreas é considerada uma praga por consumir produtos agrícolas, como o cacau no sul da Bahia (LOBÃO; NOGUEIRA-FILHO, 2011).

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) classifica a espécie na

categoria de Menor Preocupação (*Least Concern*) na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção pela ampla distribuição e presumível grande população (EMMONS, 2016). Em algumas regiões, contudo, sua abundância diminuiu devido à caça excessiva e desmatamento (RIBEIRO et al., 2017).

As pacas possuem hábitos crepusculares e noturnos e abrigam-se em tocas onde passam o dia e saem apenas à noite para buscar alimento (MONDOLFI, 1972; SILVA, 1984; PÉREZ, 1992). A audição e o olfato são bem desenvolvidos, porém não enxergam muito bem. Em geral, a paca é descrita como animal solitário, podendo ser encontrada algumas vezes em pares (SMYTHE; BROWN DE GUANTI, 1995). Existem relatos, contudo, de pacas vivendo em grupos em vida livre (BECK-KING et al., 1999; NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999; FIGUEROA-DE LEÓN et al., 2016). Adicionalmente, Lima et al. (2018) mostraram que as pacas têm repertório vocal compatível com o de espécies que vivem em grupos. Apresentam comportamento territorial (SMYTHE, 1987) e a comunicação olfativa tem papel significativo na espécie (PÉREZ, 1992). O macho urina na fêmea para marcá-la assim como o filhote. Qualquer indivíduo cujo cheiro não seja familiar ao casal é atacado, pois essa espécie não tolera a presença de intrusos em seu território (PÉREZ, 1992).

Em cativeiro, Smythe et al., 1991 observaram que o primeiro estro fértil ocorre aos oito meses de idade, quando as pacas possuem 5 a 6 kg, e foi a mesma idade em que os machos atingem a maturidade sexual, com peso por volta dos 8 kg. O ciclo estral dura 30 a 40 dias, com quatro etapas (proestro, estro, metaestro e diestro) e o estro dura apenas um dia (GUIMARÃES et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2005). A gestação pode durar de 135 a 155 dias (SMYTHE; BROWN DE GUANTI, 1995; NOGUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2008; MAYOR et al., 2013). O peso médio das fêmeas ao primeiro parto varia de 6,5 a 7,5 kg e acontece aos 12 meses de idade (GONZÁLEZ; AUGUSTO, 2002). Essa espécie é poliéstrica e aparentemente não apresenta estacionalidade reprodutiva, ou seja, a reprodução ocorre durante todo o ano, podendo ocorrer dois partos por ano, sendo um filhote por parição (SMYTHE; BROWN DE GUANTI, 1995; GUIMARÃES et al., 2008). Guimarães et al., (2008) concluíram que pacas não apresentam anestro lactacional apresentando o primeiro estro em média 25,6 dias pós-parto (Desvio Padrão = 8,8).

### **3.2 Criação de paca em cativeiro**

A criação comercial da paca pode se tornar uma alternativa de diversificação da produção em áreas onde a zootecnia tradicional é limitada por razões edafológicas e/ou

climáticas, como o sul da Bahia (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 2000). Nessa região, a espécie é considerada praga agrícola e é perseguida pelos produtores por consumir cacau (LOBÃO; NOGUEIRA-FILHO, 2011). Nestes casos, a legislação brasileira (Lei 5.197 de 1967, de Proteção à Fauna, Brasil, 1967) autoriza a captura destes animais para serem destinados a criadouros comerciais e, com isso, reduzir o conflito fauna-homem. Por outro lado, a paca destaca-se entre as espécies de mamíferos neotropicais em razão da apreciação de sua carne que resulta em preços de mercado elevados (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999).

Geralmente inicia-se a criação com um casal em cada baia e à medida que se adquirem mais pacas, grupos podem ser formados. Para isso, Perez-Torres (1996) recomenda que esses grupos sejam formados por um macho e quatro a seis fêmeas e que tenham, mais ou menos, a mesma idade. Nesse caso, é comum ocorrer infanticídios e para evitá-los o produtor deve isolar as fêmeas para parição (PEREZ-TORRES, 1996). Essa prática, no entanto, causa o aumento dos gastos com instalações e manejo, além de haver a perda do estro pós-parto, o que pode resultar no aumento do intervalo entre partos. O conjunto dessas ocorrências reduz a viabilidade econômica da criação da espécie. Para aproveitar o estro pós-parto e diminuir o infanticídio foi estabelecida metodologia de formação de grupos de pacas a partir de filhotes nascidos em cativeiro (SMYTHE; BROWN DE GUANTI, 1995). Resumidamente, os filhotes passam o dia com suas mães e à noite são agrupados em uma baia. Aos 30 dias de idade os filhotes são desmamados e passam a conviver em grupos mistos até os seis meses de vida, quando então são formados grupos de um macho e três a cinco fêmeas (SMYTHE; BROWN DE GUANTI, 1995). Com os grupos formados dessa maneira, as fêmeas podem parir nas baias, sem a ocorrência de infanticídios e poderão ser fecundadas logo no primeiro estro pós-parição (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999).

Para reduzir ainda mais os custos, estão sendo feitas tentativas por alguns produtores para o estabelecimento de colônias de pacas. Em uma destas criações, localizada em Camaçari na Bahia, as colônias são compostas por três a cinco machos e 16 a 20 fêmeas mantidas em baias de 20-30 m<sup>2</sup> (ALTINO, observação pessoal). Na mesma criação, o produtor, além de colônias, mantém pacas em casais e em grupos de um macho e três a cinco fêmeas. Em entrevista com os funcionários da criação, esses se mostraram satisfeitos com o sistema de colônia para criação de pacas, em especial pela redução no uso de mão de obra nas atividades rotineiras de limpeza das instalações. Apesar do responsável técnico manter o registro individual da produção de filhotes de cada fêmea, não houve o cuidado do registro das condições em que cada uma delas era mantida, impossibilitando a avaliação comparativa entre

os sistemas de produção adotados naquela criação (casais, grupos e colônias). O mesmo foi verificado em outros criadores comerciais localizados em Minas Gerais e Santa Catarina, que também adotam a criação de pacas em grupos e colônias (NOGUEIRA-FILHO, observação pessoal).

Para o estabelecimento de um sistema de produção, além de dados sobre produtividade e custos de produção, é preciso considerar aspectos do bem-estar animal. Quando criados de forma inadequada, os animais podem sofrer de estresse crônico, sendo afetados a reprodução e outros aspectos produtivos, como consumo alimentar e digestão dos nutrientes além do comprometimento de seu sistema imunológico, levando ao aparecimento de doenças (SQUIRES, 2003). O consumidor também está cada vez mais preocupado com as condições em que são mantidos os animais de produção, promovendo alterações na legislação brasileira e de outros países, especialmente da União Europeia, o que levou ao aumento da consciência da necessidade de monitorar e reduzir o estresse nos animais (BROOM, 2011).

### **3.3 Alimentação e nutrição da paca**

Cerca de 84% da dieta das pacas em vida livre é composta por frutas, seguido por folhas (7,3%) e fibras - porções fibrosas de plantas, além de traços de insetos (DUBOST; HENRY, 2016). Em cativeiro, são alimentadas com frutas, folhas, raízes, milho em grão e ração comercial formulada para coelhos (NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA, 1999). A alimentação de um plantel de pacas em cativeiro pode se tornar o item mais oneroso dentre os custos variáveis da atividade.

O fato de consumirem principalmente frutos, que muitas vezes estão disponíveis sazonalmente em vida livre, desestimula a criação desta espécie em cativeiro (EMMONS, 1987; SMYTHE; BROWN DE GUANTI, 1995). Por outro lado, o ceco da paca é bastante desenvolvido, podendo conter cerca de 65% a 74% do conteúdo da digesta e corresponder a 15% do peso corpóreo (HARGADEN; SINGER, 2012). Adicionalmente, as pacas costumam realizar o comportamento de cecotrofia cujo processo envolve a ingestão de um tipo peculiar de excremento produzido no ceco (cecotrofo), o qual é lambido pelo animal diretamente do ânus (SABATINI; PARANHOS DE COSTA, 2001). O cecotrofo da paca apresenta textura pastosa e coloração clara, sendo ingeridos por elas cerca de meia hora após a alimentação e durante o seu momento de descanso (Figura 1) (SABATINI; PARANHOS DE COSTA, 2001). Este comportamento também ocorre em lagomorfos, como o coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*), as lebres (*Lepus spp.*) e em alguns roedores, como capivaras (*Hydrochoerus*

*hydrochaeris*), porquinhos-da-índia (*Cavia aprea*), ratão-do-banhado (*Myocastor coypus*), entre outros (HIRAKAWA, 2001). Uma vez privados da ingestão de cecotrofo, esses animais podem apresentar digestão reduzida de fibras, aumento da excreção de minerais, hipovitaminoses e perda de peso (HARGADEN; SINGER, 2012).

Como relatado no parágrafo anterior, lagomorfos e roedores histricomorfos como a paca são dotados de microbiota que degrada fibras por meio de processos fermentativos no ceco e no cólon proximal, resultando na formação do cecotrofo (BROWN-UDDENBERG et al., 2004). Estes processos resultam na síntese de ácidos graxos de cadeia curta, que são posteriormente absorvidos na mucosa do ceco e do cólon (RÉMÉSY; DEMIGNÉ, 1976). Este processo explica a capacidade relativamente elevada da paca de digerir alimentos ricos em fibra alimentar que foram superiores aos de coelhos e similares aos encontrados em *caecatus* (*Pecari tajacu*) e capivaras (MATTOS, 2015). Adicionalmente, devido ao comportamento de cecotrofia, a proteína microbiana produzida no ceco é aproveitada por meio da cecotrofia, o que reduz suas exigências proteicas, que são inferiores às do coelho doméstico (NOGUEIRA-FILHO et al., 2016). Estes resultados indicam a possibilidade do uso de produtos e coprodutos agrícolas ricos em fibra na alimentação da paca em cativeiro, o que pode reduzir seus custos de produção e aumentar a viabilidade econômica da atividade.

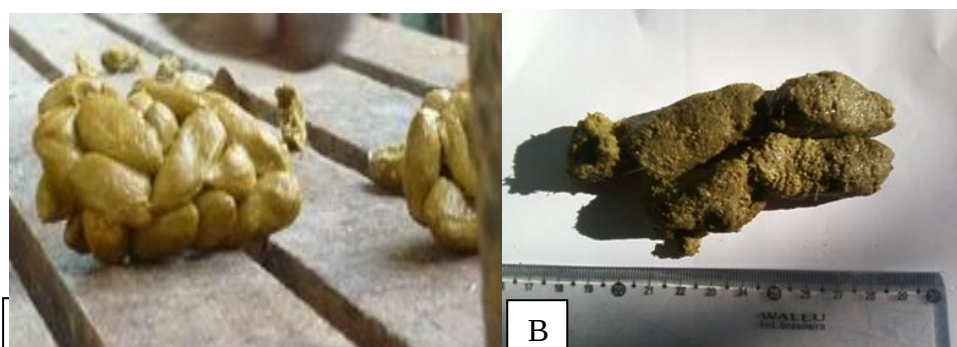


FIGURA. 1. Fezes e cecotrofo de pacas (A - fezes no formato de cíbala; B - cecotrofo).

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO I**

### **MONITORAMENTO NÃO INVASIVO DO ESTRESSE EM ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO**



## **Monitoramento não invasivo do estresse em animais silvestres mantidos em cativeiro**

**Vanessa Souza Altino<sup>1</sup>, Sergio Luiz Gama Nogueira-Filho<sup>1\*</sup>**

**& Selene Siqueira da Cunha Nogueira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Etologia Aplicada, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil. Endereço: UESC/ Laboratório de Etologia Aplicada Rodovia Jorge Amado km 16, Ilhéus, Bahia CEP: 45662-900. Vanessa Souza Altino: van\_altino@zootecnia.com.br; Selene Siqueira da Cunha Nogueira: selene@uesc.br; Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho: slgnogue@uesc.br

\*Autor correspondente: Sérgio Nogueira-Filho; Email: slgnogue@uesc.br

**Abstract. Non-invasive monitoring of stress in captive wild animals.** In recent decades, concerns about the welfare of captive-bred animals have intensified and, in parallel, measures addressed to evaluating the effects of an artificial environment and animal welfare are in demand. One way to assess animal stress is to perform noninvasive monitoring by evaluating the concentration of glucocorticoid metabolites in samples of feces. This technique is safe, convenient and practical, because there is no need to immobilize the animals, and feces collection is part of the daily routine adopted in captive breeding, so it hardly disturbs the subjects. The evaluation, however, needs to be interpreted with caution, because a rise in the concentration of glucocorticoid metabolites is not always related to poor welfare. For instance, positive behaviors such as play, copula and environmental enrichment can also increase glucocorticoid production by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In addition, animals with chronic stress may become habituated to their conditions and present a low production of glucocorticoid. Therefore, besides monitoring physiology, it is advisable to analyze behavioral responses to assess stress. The emergence or increase in the occurrence or frequency of behavior that is potentially indicative of stress, such as pacing and other stereotyped behaviors, may denote poor animal welfare. Therefore, in this paper we reviewed the methods used for non-invasive monitoring of physiological stress in Neotropical animals kept in captivity and highlighted the gaps to stimulate further research.

**Keywords:** abnormal behavior, animal welfare, fecal glucocorticoids, HPA axis, stereotyped behavior.

**Resumo.** Nas últimas décadas a preocupação com o bem-estar de animais criados em cativeiro foi intensificada e, paralelamente, houve aumento da demanda por estudos relacionados à avaliação do bem-estar desses animais. Uma das maneiras de avaliar o estresse dos animais é realizar o monitoramento não invasivo por meio da quantificação da concentração de metabólitos de glicocorticóides em amostras de fezes. Esta técnica é conveniente porque causa pouca perturbação aos animais durante a coleta das amostras, pois não há necessidade de imobilização dos animais; além disso, a coleta diária das fezes faz parte da rotina dos animais criados em cativeiro. A elevação na concentração de metabólitos de glicocorticoides, contudo, nem sempre está relacionada ao bem-estar empobrecido. Alguns exemplos confirmam que comportamentos positivos ao bem-estar dos animais, tais como brincadeira, cópula e o uso de enriquecimento ambiental também estimulam a produção e a elevação de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Além disso, animais com estresse crônico também podem se habituar às condições do ambiente e apresentarem baixa produção de glicocorticoides. Dessa forma, além do monitoramento fisiológico, é recomendada a análise das respostas comportamentais para acessar o estresse. O aparecimento ou aumento na ocorrência ou frequência de comportamentos potencialmente indicadores de estresse, como *pacing* e outros comportamentos estereotipados, podem denotar bem-estar empobrecido. Nesse artigo, portanto, foi feita uma revisão sobre métodos usados para monitoramento não invasivo do estresse, em animais neotropicais criados em cativeiro, destacando as lacunas no conhecimento atual, para estimular novos estudos que determinem ferramentas para o monitoramento do bem-estar desses animais.

**Palavras-chave:** bem-estar animal, comportamento anormal, comportamento estereotipado, eixo HPA, glicocorticoide fecal.

## INTRODUÇÃO

A manutenção de animais silvestres em cativeiro tem provocado debate. Enquanto em alguns artigos científicos são apresentados argumentos e dados favoráveis à atividade (CHALLENGER & MACMILLAN, 2014; FÀBREGAS *et al.*, 2015; GREENE *et al.*, 2016), outros autores discordam da proposta de manter espécies não domesticadas em zoológicos e são ainda mais contrários ao confinamento desses animais como animais de estimação e para

produção de carne, couro e outros produtos (MCPHEE, 2004; MOCKRIN *et al.*, 2005; ARAKI *et al.*, 2007). Além da questão ética, se devemos ou não usar animais em benefício da espécie humana (MINTEER & COLLINS, 2013), existe a preocupação quanto ao bem-estar de animais silvestres mantidos em instalações comerciais (INTERNATIONAL ACADEMY OF ANIMAL WELFARE SCIENCE, 1992; NOGUEIRA *et al.*, 2011a; MINTEER & COLLINS, 2013). O estresse causado pelo cativeiro pode levar a inúmeras alterações tanto fisiológicas como comportamentais (MASON, 1991), que podem resultar em danos à saúde, dificuldades para reprodução e redução na produtividade, o que afeta a viabilidade da atividade (SQUIRES, 2003; NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA, 2004).

A carne de animais neotropicais ainda é a principal fonte de proteína animal para populações que vivem dentro e no entorno das florestas (ISAAC *et al.*, 2015; VAN VLIET *et al.*, 2016). Por esse motivo, alguns conservacionistas propuseram a criação de algumas espécies ainda não domesticadas, como o caititu (*Pecari tajacu*) e a paca (*Cuniculus paca*) em áreas onde a zootecnia tradicional é limitada pelas condições locais (CHARDONNET *et al.*, 2002; NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA, 2004). Tanto a caça quanto a destruição do hábitat para expansão da fronteira agrícola tem causado o declínio de algumas populações de espécies silvestres (ANTUNES *et al.*, 2016; BENÍTEZ-LÓPEZ *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017), por outro lado, algumas dessas espécies adaptam-se facilmente ao cativeiro (NOGUEIRA & NOGUEIRA-FILHO, 2011). A produção desses animais em cativeiro, portanto, pode ser um mecanismo para conservação da biodiversidade, por reduzir a pressão de caça de animais em vida livre uma vez que proporciona outra alternativa de renda em detrimento do tráfico e caça ilegal, ao mesmo tempo que atende às necessidades humanas por proteína animal (NOGUEIRA & NOGUEIRA-FILHO, 2011).

Para alcançar o sucesso na atividade é necessário que sejam estabelecidos sistemas de produção que promovam e monitorem o bem-estar desses animais. Para isso é preciso estabelecer formas de monitoramento não invasivo do estresse dessas espécies, que permitam a avaliação contínua do bem-estar animal e assim viabilizar a adequação das práticas adotadas nessas criações quando detectadas condições não propícias. Dessa forma, no presente artigo tivemos como objetivo principal rever os estudos sobre métodos não invasivos para monitorar o bem-estar de animais neotropicais mantidos em cativeiro e estimular a execução de novos estudos na área.

## BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE

O bem-estar de um indivíduo diz respeito às suas tentativas de lidar com seu ambiente (BROOM, 1986). Bem-estar, portanto, refere-se a todos os mecanismos de enfrentamento às condições do ambiente envolvendo mecanismos fisiológicos, comportamentais e imunológicos que são coordenados pelo cérebro. O animal pode conseguir ou não sucesso nesses processos de adaptação e seu bem-estar podendo ser medido e classificado de muito bom a muito pobre (BROOM, 2011). Uma das formas de medir o bem-estar animal é por meio de concentrações hormonais. Em resposta a um estímulo estressor, o hipotálamo é estimulado à produzir o hormônio liberador de corticotrofina. Este, por sua vez, estimula a parte anterior da hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico que, por sua vez, estimula a liberação de glicocorticoides (cortisol e/ou corticosterona) pelo córtex adrenal (LANE, 2006). Os glicocorticoides induzem a gliconeogênese e a lipólise (THUN & SCHWARTZ-PORSCHKE, 1994). Durante um evento de estresse agudo, portanto, a ação dos glicocorticoides inibe o acúmulo de glicose e disponibiliza energia ao indivíduo para as respostas de ‘luta ou fuga’ em resposta ao evento estressor (WILSON & REEDER, 2005). Simultaneamente os glicocorticoides modelam temporariamente os sistemas imunológico, reprodutivo e digestivo até que o agente estressor seja reduzido ou eliminado (SQUIRES, 2003).

A produção dos glicocorticoides é controlada por meio de um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativa: o córtex adrenal cessa a secreção de glicocorticoides quando seus níveis se elevam. Em situações de estresse crônico, contudo, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) é continuamente estimulado e os níveis de cortisol mantêm-se constantes prejudicando o animal. Esse prejuízo ocorre porque os glicocorticoides aceleram o catabolismo, degradando proteínas, promovendo a utilização da energia disponível para as respostas do animal ao agente estressor (GRAEFF, 2003). Os glicocorticoides promovem também a elevação da concentração de glicose no sangue, além de possuir um efeito anti-inflamatório, que reduz as respostas às lesões teciduais (MORMÈDE *et al.*, 2007). Adicionalmente, em animais jovens, os glicocorticoides podem afetar o crescimento (MOBERG, 2000), provavelmente, devido ao decréscimo da incorporação de proteínas no tecido muscular e inibição da secreção dos hormônios de crescimento.

Como a secreção de glicocorticoides aumenta com o estresse, a concentração

plasmática destes hormônios pode ser usada como parâmetro para monitoramento da atividade adrenal (MORTON *et al.*, 1995; MÖSTL & PALME, 2002). Para a coleta de amostras do sangue, no entanto, há necessidade de contenção do animal, que por si só é um agente estressor, elevando a concentração de glicocorticoides no plasma, afetando desse modo os resultados da investigação (BAUER *et al.*, 2008). Por este motivo, técnicas de monitoramento endócrino não invasivo, que dispensam a contenção, estão sendo propostas, tais como aquelas que avaliam a concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes, na urina e na saliva dos animais. Para a coleta de amostras de urina e saliva, contudo, também é necessária a contenção e, por esse motivo, não são as mais indicadas para animais silvestres e não serão discutidas nessa revisão.

Por outro lado, a técnica mais usual empregada para monitoramento não invasivo do estresse em espécies silvestres é a determinação da concentração de metabólitos de glicocorticoides em amostras de fezes. Para a coleta dessas amostras não há necessidade de contenção e os metabólitos de glicocorticoides nas fezes são relativamente estáveis por até 72 horas (ABÁIGAR *et al.*, 2010). Adicionalmente, as excretas coletadas podem ser preservadas indefinidamente por congelamento (WASSER *et al.*, 2000; MILLSPAUGH & WASHBURN, 2004; PALME, 2005). O monitoramento do estresse por meio da concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes é possível porque, após sua ação nas células-alvo, os glicocorticoides são desassociados de seus receptores e inativados, tanto pelas células-alvo quanto pelo fígado (NORRIS & CARR, 2007). Em seguida, são eliminados na bile e lançados nas fezes e/ou na urina, a depender da espécie (TAYLOR, 1971; BUSO & RUIZ, 2011). Existe, portanto, um intervalo de tempo entre a circulação dos hormônios no sangue e o aparecimento dos metabólitos hormonais nas fezes. A duração desse intervalo depende da taxa de passagem no intestino dos animais (PALME *et al.*, 1996). Em geral, o tempo para eliminação se aproxima ao tempo do trânsito gastrointestinal e da posição no intestino onde a bile é excretada até o reto, sendo que este período pode variar de 12 a 24 horas para mamíferos com fermentação pré-gástrica e de 24 a 48 horas para animais de ceco funcional (PALME *et al.*, 1996). No caso de aves, como papagaios, o trânsito é comparativamente mais rápido, entre 3-9 horas após o estímulo estressor agudo (FERREIRA *et al.*, 2015). Dessa forma, esse atraso deve ser levado em consideração quando se pretende avaliar o efeito do estresse agudo causado por determinadas práticas de manejo, como captura, contenção, transporte e pesagem dos animais, por exemplo.

### VALIDAÇÃO DO MONITORAMENTO ENDÓCRINO NÃO INVASIVO

Antes de sua excreção, os glicocorticoides passam por alterações metabólicas tanto no trato hepato-intestinal, quanto pela atividade da microflora presente no trato gastrointestinal, que varia de espécie para espécie (DANISZOVÁ *et al.*, 2017). Devido às diferenças no metabolismo e na excreção dos glicocorticoides entre as espécies, o método de monitoramento endócrino precisa ser previamente validado, antes de ser usado para confirmar que a concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes de fato reflete a atividade adrenal naquela espécie em que se pretende usar a metodologia (SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996; TOUMA & PALME, 2005). O método normalmente utilizado para a validação fisiológica é o teste de desafio com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (WASSER *et al.*, 2000; GOYMANN, 2005; TOUMA & PALME, 2005). Neste desafio, o ACTH exógeno é administrado visando causar a ativação da atividade adrenocortical e, consequentemente, elevar a liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal na corrente sanguínea (WHITTEN *et al.*, 1998; WASSER *et al.*, 2000; HEISTERMANN *et al.*, 2006). Caso sejam detectadas mudanças no nível dos metabólitos de glicocorticoides nas amostras de fezes coletadas após a aplicação do ACTH exógeno, confirma-se que é possível monitorar, de forma indireta, as concentrações de esteroides no sangue, permitindo o uso desse tipo de monitoramento não invasivo do estresse para aquela espécie.

Durante o desafio de ACTH, as fezes dos animais são coletadas e, podem ser congeladas para análises posteriores. Depois de descongeladas, as amostras de fezes devem passar pelo processo de extração hormonal para retirar a maior quantidade de hormônio. Existem vários protocolos de extração que são baseados na natureza lipídica dos hormônios. A maioria desses protocolos consiste na dissolução dos metabólitos em solventes orgânicos, álcoois e éteres, soluções aquosas ou técnicas mistas (PALME *et al.*, 1996). Após a extração, a quantificação dos hormônios pode ser realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIA) estabelecida por YALOW & BERSON, (1960). A análise é baseada no uso de um agente ligante específico e de hormônios radioativos como traçadores (THORELL & LARSON, 1978). A desvantagem desse tipo de análise é a necessidade dos laboratórios terem autorização para o uso de rastreadores radioisotópicos, além do preço elevado do equipamento para detecção de cintilação gama e beta.

Alternativamente, a quantificação dos hormônios pode ser realizada por imunoensaio

enzimático (EIA - *enzyme immunoassays*). Nessa metodologia, utilizam-se anticorpos específicos para hormônios esteroides não metabolizados ou conjugados esteroides metabolizados (LASLEY & KIRKPATRICK, 1991; MUNRO *et al.*, 1991; CZEKALA *et al.*, 1994). Como os EIAs não utilizam radioatividade, não há necessidade de autorizações especiais, os equipamentos são comparativamente mais baratos e os reagentes são fáceis para preparar, estáveis e de validade mais longa do que os usados para o método RIA.

No início da aplicação da técnica de monitoramento de glicocorticoides (GC) nas fezes, foram utilizados vários solventes como metanol, etanol e propanol, com várias concentrações ou utilizando técnicas de extração mistas (PALME *et al.*, 2013). Mas, atualmente, a maioria dos pesquisados utiliza metanol com a concentração de 80% para a extração de metabólitos de GC em mamíferos, enquanto que em aves prevalece o uso de metanol na concentração de 60% (TOUMA & PALME, 2005; PALME *et al.*, 2013;). A utilização de metanol 80% é relativamente simples e produz a melhor recuperação de metabólitos em muitas espécies estudadas (MÖSTL & PALME, 2002; CORADELLO *et al.*, 2012; PALME *et al.* 1996, 2005, 2013). A maioria dos estudos utiliza a razão 10:1, ou seja, para cada 0,1 g de amostra seca de fezes é adicionado 1mL de solvente (o procedimento padrão é pesar 0,5 g de fezes secas e adicionar metanol com concentração de 80%) (GRAHAM *et al.*, 2001; CORADELLO *et al.*, 2012; PALME *et al.*, 2013).

Antes da aplicação da técnica em uma nova espécie, no entanto, é necessário fazer a validação bioquímica para verificar se o EIA é capaz de medir a concentração dos metabólitos de GC nas fezes (TOUMA & PALME, 2005). Para isso, verifica-se a similaridade imunogênica entre os antígenos padrão (com concentração conhecida) e o antígeno a ser dosado nas amostras através do ensaio de paralelismo (TOUMA & PALME, 2005). O *pool* do extrato das amostras é diluído em série como também o antígeno padrão, os dados obtidos passam pela transformação log-logit e a inclinação da curva desse *pool* é comparada com a da curva do antígeno padrão. Caso seja observado paralelismo a técnica é bioquimicamente validada (TOUMA & PALME, 2005).

Vários estudos foram realizados com objetivo de validar os métodos de medição dos metabólitos de glicocorticoides na excreta de diversas espécies de animais domésticos, como ovelhas (*Ovis aries*), bovinos (*Bos taurus*), suínos (*Sus scrofa*) e galinhas (*Gallus domesticus*) (PALME *et al.*, 1996; MÖSTL *et al.*, 1999). Poucos estudos, contudo, foram feitos com animais neotropicais, como saguis (*Callithrix jachus*) (SOUSA & ZIEGLER, 1998), caititus (*Pecari*

*tajacu*) (CORADELLO *et al.*, 2012), queixadas (*Tayassu pecari*) (NOGUEIRA-FILHO *et al.*, 2012) e papagaios (*Amazona aestiva*) (FERREIRA *et al.*, 2015). Para diversas outras espécies neotropicais usualmente mantidas em cativeiro, como capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), paca (*Cuniculus paca*) e cutia (*Dasyprocta* spp.), ainda precisam ser feitos testes de validação.

#### MONITORAMENTO DE COMPORTAMENTOS INDICADORES DE ESTRESSE

O aumento na concentração de glicocorticoides em amostras de fezes não é exclusivo de situações aversivas. Um dos objetivos da técnica de enriquecimento ambiental, por exemplo, é a promoção do aumento de comportamentos exploratórios para diminuir a inatividade dos animais e neste processo há um incremento de glicocorticoides (DAWKINS *et al.*, 2004). NOGUEIRA *et al.*, (2011b), por exemplo, verificaram incremento na concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes de queixadas após a introdução de enriquecimento ambiental devido ao aumento no comportamento de brincadeira. Por outro lado, deve ser considerado que a elevação de cortisol pode estar associado ao incremento de taxas de comportamentos anormais, o que seria considerado um sintoma de estresse (CARLSTEAD & BROWN, 2005). É preciso, portanto, que paralelamente às coletas de fezes para determinação da concentração de metabólitos de glicocorticoides, seja feita a coleta e análise de dados comportamentais para a interpretação mais correta das medidas hormonais, como recomendado por DAWKINS *et al.*, (2004). Dessa forma, a quantificação de comportamentos estereotipados e outros potencialmente indicativos de estresse (BPIS do inglês: *behaviour potentially indicative of stress, sensus* (FERREIRA *et al.*, 2016)) provê uma medida complementar para a interpretação dos resultados após o monitoramento não invasivo do estresse de animais silvestres.

Poucos estudos decreveram BPIS para animais silvestres neotropicais mantidos em cativeiro. A pterofagia é um exemplo clássico de comportamento anormal observado em papagaios (*Amazona* spp.) mantidos em condições de bem-estar empobrecido (GASKINS *et al.*, 2011). Para caititus foi descrito o aumento no comportamento de vigilância e redução no comportamento exploratório (NOGUEIRA *et al.*, 2011a). Para queixadas foi verificado que o bater de dentes e a vocalização denominada “grunhido” estão relacionados com o estresse (NOGUEIRA *et al.*, 2016). Capivaras, por sua vez, apresentam o comportamento de congelamento (*freezing*), no qual se mantêm paralizadas até que possam definir uma estratégia de fuga efetiva, observando-se apenas movimentos de respiração em situações de perigo (NOGUEIRA, observação pessoal).



Outro comportamento anômalo frequente em animais em confinamento é a estereotipia, definida como padrão comportamental repetitivo, relativamente invariável, com nenhuma função biológica ou objetivo aparente (MASON, 1991). Alguns autores sugerem que o comportamento estereotipado é um mecanismo de enfrentamento para reduzir o estresse crônico ou para promover ao animal alguma forma de controle sobre o ambiente (BOISSY *et al.*, 2007; MASON *et al.*, 2007). O comportamento estereotipado (*pacing*) foi observado em arara-azul-de-lear que também expressaram outro comportamento anômalo, o de arrancar as próprias penas (AZEVEDO *et al.*, 2016). Também foram observados comportamentos estereotipados em outras espécies de animais Neotropicais: ema (*Rhea americana*), que apresentaram *pacing* (AZEVEDO *et al.*, 2010); cairara (*Cebus olivaceus*) que além do *pacing* andavam em círculo (TÁRANO & LÓPEZ, 2015); e o *pacing* em onça (*Panthera onca*, SELLINGER & HA, 2005).

Outro aspecto a ser observado é a estratégia ou estilo de enfrentamento que está ligado à forma como os indivíduos reagem e adaptam-se a uma situação ou ambiente estressor (KOOLHAAS *et al.*, 1999, 2010). A resposta de enfrentamento atuaria como minimizador do estresse (KOOLHAAS *et al.*, 1999) e vários termos são usados para caracterizar essas estratégias, sendo um exemplo os termos “proativo” e “reativo”. O enfrentamento proativo é caracterizado pelas tentativas do animal em escapar ou remover o estresse (resposta *fight-or-flight*) e a baixa sensibilidade às mudanças no meio ambiente, enquanto que no enfrentamento reativo os animais não mostram sinais de reação negativa, apresentam baixos níveis de comportamento de agressão, tendência em apresentar o comportamento de *freezing*, mostrar baixa atividade em resposta a desafios e elevada sensibilidade à mudança ambiental (SEAMAN *et al.*, 2002; KOOLHAAS *et al.*, 2010). Os indivíduos proativos também tendem a ter menor estimulação do eixo HPA e consequentemente, menor produção de glicocorticoides, quando comparados com animais reativos (TOUMA *et al.*, 2008; KOOLHAAS *et al.*, 2010). Dessa forma, é preciso que mais estudos sejam feitos para identificar os comportamentos que possam ser monitorados para avaliação do bem-estar de animais neotropicais mantidos em cativeiro.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de monitoramento do estresse por meio não invasivo é uma necessidade para fornecer mais conforto aos animais, ao mesmo tempo em que permite a avaliação do ambiente e manejo em que o animal está submetido. No entanto, deve ser levado em consideração que concentrações elevadas de metabólitos de glicocorticoides nas fezes não é

sempre um reflexo de bem-estar empobrecido; é necessário que paralelamente às coletas de fezes, seja feita a coleta e análise de dados comportamentais para a interpretação correta das medidas fisiológicas. Essas duas técnicas em conjunto podem ser usadas como ferramentas para o monitoramento não invasivo do estresse de animais neotropicais mantidos em cativeiro, proporcionando assim uma boa prática de monitoramento para interferir o menos possível na rotina dos animais.

### *Agradecimentos*

VSA recebeu bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, no. 001/2014). Também agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, no. 88881.119854/2016-01 para SSCN e no. 88881.119838/2016-01 para SLGNF) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (8647/2015) pelo apoio a esse estudo.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abáigar, T.; Domené, M. A. & Palomares, F. 2010. Effects of fecal age and seasonality on steroid hormone concentration as a reproductive parameter in field studies. **European Journal of Wildlife Research**, 56(5), 781–787. <https://doi.org/10.1007/s10344-010-0375-z>
- Antunes, A. P.; Fewster, R. M.; Venticinque, E. M.; Peres, C. A.; Levi, T.; Rohe, F. & Jr, G. H. S. 2016. Empty forest or empty rivers? A century of commercial hunting in Amazonia. **Science Advances**, 2(October), 1–14.
- Araki, H.; Cooper, B. & Blouin, M. S. 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. **Science**, 318(100), 100–103. <https://doi.org/10.1126/science.1145621>
- Azevedo, C. S.; Caldeira, J. R.; Faggioli, A. B. & Cipreste, C. F. 2016. Effects of different environmental enrichment items on the behavior of the endangered Lear's Macaw (*Anodorhynchus leari*, Psittacidae) at Belo Horizonte Zoo, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, 24(September), 204–210.
- Azevedo, C. S.; Ferraz, J. B.; Tinoco, H. P.; Young, R. J. & Rodrigues, M. 2010. Time-activity

budget of greater rheas (*Rhea americana*, Aves) on a human-disturbed area: The role of habitat, time of the day, season and group size. **Acta Ethologica**, 13(2), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10211-010-0080-7>

Bauer, B.; Palme, R.; Machatschke, I. H.; Dittami, J. & Huber, S. 2008. Non-invasive measurement of adrenocortical and gonadal activity in male and female guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). **General and Comparative Endocrinology**, 156(3), 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.03.020>

Benítez-López, A.; Alkemade, R.; Schipper, A. M.; Ingram, D. J.; Verweij, P. A.; Eikelboom, J. A. J. & Huijbregts, M. A. J. 2017. The impact of hunting on tropical mammal and bird populations. **Science**, 356, 180–183.

Boissy, A.; Manteuffel, G.; Jensen, M. B.; Moe, R. O.; Spruijt, B.; Keeling, L. J.; ... Aubert, A. 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. **Physiology and Behavior**, 92(3), 375–397. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.02.003>

Broom, D. M. 1986. Indicators of Poor Welfare. **British Veterinary Journal**, 142(6), 2–4. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-0007193586901090/first-page-pdf>

Broom, D. M. 2011. A History of Animal Welfare Science. **Acta Biotheoretica**, 59(2), 121–137. <https://doi.org/10.1007/s10441-011-9123-3>

Busso, J. M. & Ruiz, R. D. 2011. Excretion of steroid hormones in rodents : An Overview on Species Differences for new biomedical animal research models. In D. Kandarakis (Ed.), *Contemporary aspects of endocrinology* (pp. 375–396). INTECH Open Access Publisher, Contemporary.

Carlstead, K. & Brown, J. L. 2005. Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. **Zoo Biology**, 24(3), 215–232. <https://doi.org/10.1002/zoo.20050>

Challender, D. W. S. & MacMillan, D. C. 2014. Poaching is more than an enforcement problem. **Conservation Letters**, 7(5), 484–494. <https://doi.org/10.1111/conl.12082>

- Chardonnet, P.; Des Clers, B.; Fisher, J. R.; Gerhold, R.; Jori, F.; Lamarque, F.; ... Lamarque, F. 2002. The value of wildlife. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, 21(1), 15–51. <https://doi.org/10.20506/rst.21.1.1323>
- Coradello, M. A.; Morais, R. N.; Roper, J.; Spercoski, K. M.; Massuda, T.; Nogueira, S. S. C. & Nogueira-Filho, S. L. G. 2012. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 43(2), 275–282. <https://doi.org/10.1638/2011-0046.1>
- Czekala, N. M.; Lance, V. A. & Sutherland-Smith, M. 1994. Diurnal urinary corticoid excretion in the human and gorilla. **American Journal of Primatology**, 34(1), 29–34. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350340107>
- Daniszová, K.; Mikula, O.; Macholán, M.; Pospíšilová, I.; Vošlajerová Bímová, B. & Hiadlovská, Z. 2017. Subspecies-specific response to ACTH challenge test in the house mouse (*Mus musculus*). **General and Comparative Endocrinology**, 252, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.06.023>
- Dawkins, M. S.; Edmond, A.; Lord, A.; Solomon, S. & Bain, M. 2004. Time course of changes in egg-shell quality, faecal corticosteroids and behaviour as welfare measure in laying hens. **Animal Welfare**, 13, 321–327.
- Fàbregas, M. C.; Fosgate, G. T. & Koehler, G. M. 2015. Hunting performance of captive-born South China tigers (*Panthera tigris amoyensis*) on free-ranging prey and implications for their reintroduction. **Biological Conservation**, 192, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.09.007>
- Ferreira, J. C. P.; Fujihara, C. J.; Fruhvald, E.; Trevisol, E.; Destro, F. C.; Teixeira, C. R.; ... Palme, R. 2015. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). **Plos One**, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145909>
- Ferreira, R. G.; Mendl, M.; Wagner, P. G. C.; Araujo, T.; Nunes, D. & Mafra, A. L. 2016. Coping strategies in captive capuchin monkeys (*Sapajus* spp.). **Applied Animal Behaviour Science**, 176(January), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.12.007>
- Gaskins, L. A.; Acvb, D.; Bergman, L.; Acvb, D.; Gaskins, L. A.; Acvb, D.; ... Acvb, D. 2011.

Surveys of avian practitioners and pet owners regarding common behavior problems in psittacine birds surveys of avian practitioners and pet owners regarding common behavior problems in psittacine birds. **BioOne Research Evolved**, 25(2), 111–118.

Goymann, W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1046, 35–53. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.005>

Graeff, F. G. 2003. Bases biológicas do transtorno de estresse Biological basis of posttraumatic stress disorder. **Medicina**, 25(Supl I), 21–24.

Graham, L. H.; Schwarzenberger, F.; Möstl, E.; Galama, W. & Savage, A. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, 20(DECEMBER), 227–236. <https://doi.org/10.1002/zoo.1022>

Greene, D. U.; Gore, J. A. & Stoddard, M. A. 2016. Reintroduction of the endangered Perdido Key beach mouse (*Peromyscus polionotus trissyllepsis*): fate and movements of captive-born animals. **Florida Scientist**, 79(1), 1–13.

Heistermann, M.; Palme, R. & Ganswindt, A. 2006. Response to novel food and the role of social influences in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) and Goeldi's Monkeys (*Callimico goeldii*). **American Journal of Primatology**, 68(11), 257–273. <https://doi.org/10.1002/ajp>

Isaac, V. J.; Almeida, M. C.; Giarrizzo, T.; Deus, C. P.; Vale, R.; Klein, G. & Begossi, A. 2015. Food consumption as an indicator of the conservation of natural resources in riverine communities of the Brazilian Amazon. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, 87(4), 2229–2242. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140250>

Koolhaas, J. M.; de Boer, S. F.; Coppens, C. M. & Buwalda, B. 2010. Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 31(3), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.001>

Koolhaas, J. M.; Korte, S. M.; De Boer, S. F.; Van Der Vegt, B. J.; Van Reenen, C. G.; Hopster, H.; ... Blokhuis, H. J. 1999. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23(7).

[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)

Lane, J. 2006. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals? **Animal Welfare**, 15, 331–342.

Lasley, B. & Kirkpatrick, J. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids 121 121. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 22(1), 23–31.

Mason, G.; Clubb, R.; Latham, N. & Vickery, S. 2007. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? **Applied Animal Behaviour Science**, 102(3–4), 163–188. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.041>

Mason, J. G. 1991. Stereotypies: a critical review. **Animal Behaviour**, 41(6), 1015–1037.

McPhee, M. E. 2004. Generations in captivity increases behavioral variance: Considerations for captive breeding and reintroduction programs. **Biological Conservation**, 115(1), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00095-8)

Millspaugh, J. J. & Washburn, B. E. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: Considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, 138(3), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.002>

Minteer, B. A. & Collins, J. P. 2013. Ecological ethics in captivity: Balancing values and responsibilities in zoo and aquarium research under rapid global change. **ILAR Journal**, 54(1), 41–51. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt009>

Moberg, G. P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In J. Moberg & G. Mench (Eds.), *The Biology of Animal Stress* (pp. 1–21). Oxon/New York, UK/USA: CABI Publishing.

Mockrin, M. H.; Bennett, E. L. & Labruna, D. T. 2005. Wildlife farming: a viable alternative to hunting in Tropical forests? In *WCS Working Paper* (Vol. 23). New York: Wildlife Conservation Society.

Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; ... Veissier, I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, 92(3), 317–339.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>

Morton, D. J. E.; Anderson, C. M.; Foggin, M.; Kock, M. & Tiran, E. 1995. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. **The Veterinary Record**, 136, 60–63.

Möstl, E.; Messmann, S.; Bagu, E.; Robia, C.; Plame, R. & Palme, R. 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, 46(10), 621–631. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.1999.00256.x>

Möstl, E. & Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, 23(1–2), 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00146-7)

Munro, C.; Stabenfeldt, G.; Cragun, J. R.; Addiego, L. A.; Overstreet, J. W. & Lasley, B. L. 1991. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, 37(6), 838–844.

Nogueira-Filho, S.; Carvalho, H. & Silva, H. 2012. Stress assessment in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). **Suiform**, (August). Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Sergio\\_Nogueira-Filho/publication/287487680\\_Stress\\_assessment\\_in\\_white-lipped\\_peccaries\\_Tayassu\\_pecari/links/5676b3e008ae502c99d2ccc5.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sergio_Nogueira-Filho/publication/287487680_Stress_assessment_in_white-lipped_peccaries_Tayassu_pecari/links/5676b3e008ae502c99d2ccc5.pdf)

Nogueira-Filho, S. L. G. & Nogueira, S. S. C. 2004. Captive Breeding Programs as an Alternative for Wildlife Conservation in Brazil. In K. Silvius, R. Bodmer, & J. Fragoso (Eds.), *People in Nature: Wildlife Mangement and Conservation in Latin America* (1st ed., Vol. 1, pp. 171–190). Nova York: Press, Columbia University.

Nogueira, S. S. C.; Calazans, S. G.; Costa, T. S. O.; Peregrino, H. & Nogueira-filho, S. L. G. 2011. Effects of varying feed provision on behavioral patterns of farmed collared peccary (Mammalia , Tayassuidae ). **Applied Animal Behaviour Science**, 132(3–4), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.002>

Nogueira, S. S. C. & Nogueira-Filho, S. L. G. 2011. Wildlife farming: An alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? **Biodiversity and**

**Conservation**, 20(7), 1385–1397. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0047-7>

Nogueira, S. S. C.; Soledade, J.; Pompéia, S. & Nogueira-Filho, S. 2011. The effect of environmental enrichment on play behaviour in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). **Animal Welfare**, 20(4), 505–514.

Nogueira, S. S. da C.; Lacerda, Z.; Magalhães, P. S. M.; Neto, J. P. da S.; Abreu, S. A.; Peregrino, H.; ... Lima, S. G. C. 2016. The use of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) vocalizations as welfare indicator. **Suiform Soundings**, 15, 77–85.

Norris, D. O. & Carr, J. A. 2007. Synthesis, metabolism, and actions of bioregulators. In D. O. Norris (Ed.), *Vertebrate Endocrinology* (pp. 46–105). Sandi Diego, USA: Elsevier Academic Press.

Palme, R. 2005. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1046, 75–80. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.007>

Palme, R.; Fischer, P.; Schildorfer, H. & Ismail, M. N. 1996. Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, 43, 43–63.

Palme, R.; Rettenbacher, S.; Touma, C.; El-Bahr, S. M. & Möstl, E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1040, 162–171. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.021>

Palme, R.; Touma, C.; Arias, N.; Dominchin, M. F. & Lepschy, M. 2013. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, 100(9–10), 238–246.

Ribeiro, V. M. F.; Satrapa, R.; Diniz, J. V. A.; Fêo, H. B.; Flórez, L. M. M.; SatrapaSATRAPA, R. A. & Oba, E. 2017. Synchronization of estrus in paca (*Cuniculus paca* L.): possible impacts on reproductive and productive parameters. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 54(1), 27–35. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.107807>

Schwarzenberger, F.; Möstl, E.; Palme, R. & Bamberg, E. 1996. Faecal steroid analysis for



non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, 42(1–4), 515–526. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01561-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01561-8)

Seaman, S. C.; Davidson, H. P. B. & Waran, N. K. 2002. How reliable is temperament assessment in the domestic horse (*Equus caballus*)? **Applied Animal Behaviour Science**, 78(2–4), 175–191. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00095-3)

Sellinger, R. L. & Ha, J. C. 2005. The effects of visitor density and intensity on the behavior of two captive jaguars (*Panthera onca*). **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 8(4), 233–244. [https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0804\\_1](https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0804_1)

Sousa, M. B. C. & Ziegler, T. E. 1998. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. **American Journal of Primatology**, 46(2), 105–117.

Squires, E. J. 2003. **Applied animal endocrinology**. (CAB International, Ed.) (1st ed.). Wallingford, UK: Squires, Eli James. <https://doi.org/10.1079/9780851995946.0000>

Tárano, Z. & López, M. C. 2015. Behavioural repertoires and time budgets of semi-free-ranging and captive groups of wedge-capped capuchin monkeys, *cebus olivaceus*, in zoo exhibits in Venezuela. **Folia Primatologica**, 86(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000381397>

Taylor, W. 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. **Vitam. Horm.**, 29, 201–285.

Thorell, J. & Larson, S. 1978. Radioimmunoassay and related techniques. In *Methodology and Clinical Applications* (p. 289). Saint Louis, USA: Mosby Company.

Thun, R. & Schwartz-Porsche, D. 1994. Nebennierenrinde. In F. Döcke (Ed.), *Nebennierenrinde* (1st ed., pp. 309–356). Jena Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag.

Touma, C.; Bunck, M.; Glasl, L.; Nussbaumer, M.; Palme, R.; Stein, H.; ... Landgraf, R. 2008. Mice selected for high versus low stress reactivity: A new animal model for affective disorders. **Psychoneuroendocrinology**, 33(6), 839–862. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.03.013>

Touma, C. & Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and

birds: The importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1046(0), 54–74. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.006>

Van Vliet, N.; Cornelis, D.; Beck, H.; Lindsey, P.; Nasi, R.; Lebeck, S.; ... Jori, F. 2016. Meat from the wild: extractive uses of wildlife and alternatives for sustainability. In R. MATEO, B. ARROYO, & J. T. GARCÍA (Eds.), *Current trends in wildlife research*. (p. 293). Suíça: Springer.

Wasser, S. K.; Hunt, K. E.; Brown, J. L.; Cooper, K.; Crockett, C. M.; Bechert, U.; ... Monfort, S. L. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. **General and Comparative Endocrinology**, 120(3), 260–275. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7557>

Whitten, P. L.; Brockman, D. K. & Stavisky, R. C. 1998. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American Journal of Physical Anthropology**, Suppl 27, 1–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1998\)44:1<57::AID-AJP5>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1998)44:1<57::AID-AJP5>3.0.CO;2-W)

Wilson, D. E. & Reeder, D. A. M. 2005. **Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Yalow, R. S. & Berson, S. A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **Obesity Research**, 4(6), 583–600. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1996.tb00274.x>

## **5. ARTIGO CIENTÍFICO II**

### **COMPLEMENTARY NON-INVASIVE TOOLS FOR STRESS ASSESSMENT IN PACA (*Cuniculus paca*)**

**Complementary non-invasive tools for stress assessment in paca (*Cuniculus paca*)**

Vanessa Souza Altino<sup>1</sup>, Selene Siqueira da Cunha Nogueira<sup>1</sup>, Letícia Guerra Aldrigui<sup>1</sup>, Mar Roldan Romero<sup>2</sup>, José Maurício Barbanti Duarte<sup>2</sup>, Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Etologia Aplicada, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brazil.

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Correspondence to: Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho, E-mail: slgnogue@uesc.br, Telephone: +557336805522

**Abstract**

Physiological measures can be used to assess the conditions in which animals are reared because normally the production of glucocorticoides rise in conditions of poor welfare produced by the adrenal glands which subsequently are excreted in the feces in the form of metabolites. However The increment of these metabolites, is not exclusive of aversive situations. Therefore, the analysis of behavioral data for the correct interpretation of the hormonal action is recommended. In this study we tested the hypothesis that it is possible to assess the activity of the adrenal gland of paca (*Cuniculus paca*) through the concentration of fecal glucocorticoid metabolites (FGCM) and by the alteration in the expression of behavior of pacas. For these purposes, were used four adult males who kept in cages of metabolism. The pacas were submitted to a challenge test adrenocorticotrophic hormone (ACTH) exogenous in a randomized latin square design (4x4). The four treatments were used:

unhandled; intramuscular injection of saline solution; intramuscular injection of low ACTH (0.18 mL ACTH) and intramuscular injection of high ACTH (0.37 mL ACTH). Feces samples were collected to measure concentration of FGCM. In addition, images of the animals were continuously recorded to compare the time spent with feeding, exploratory, inactive, comfort and pacing behavior due to treatments and days of observation. By immunoenzyme assay using antibody to cortisol, there was a peak in the concentration of FGCM, in feces collected in the day following application of high ACTH treatment. Moreover, we determined the average concentration baseline to FGCM in  $36.0 (\pm 11.7)$  ng/g of dry feces, without variation in the excretion of FGCM along the hours of the day. During the day of application of treatments, the pacas spent more time inactive ( $60.1 \pm 27.5\%$ ,  $P < 0.001$ ) and less time feeding ( $13.5 \pm 19.0\%$ ,  $P < 0.001$ ) in relation to the other days of observation ( $33.9 \pm 21.9\%$  and  $39.4 \pm 10.6\%$ , respectively). We conclude that it is possible to use the concentration of FGCM, using EIA with cortisol antibody, for non-invasive monitoring of stress in the paca as well as the of the proportion of time spent on food and inactivite.

**Keywords:** animal welfare, corticosterone, cortisol, cuniculidae, enzyme immunoassays.

## 5.1 Introduction

Captive breeding of wild animals has provoked debate. There are some scientific papers that either favor (e.g. Challender and MacMillan, 2014; Fàbregas et al., 2015; Greene et al., 2016) or disagree with the proposal to breed wild species in zoos, wildlife reserves, ranching and wildlife farming. Besides most ethical issues surrounding zoo and other commercial and non-commercial conservation facilities, there is a general agreement that the maintenance of wild animals in captivity raises animals welfare concerns (e.g. International Academy of Animal Welfare Sciences, 1992; Clubb and Mason, 2003; Minter and Collins, 2013). The stress caused by captive conditions might lead to repetitive stereotypic behavior poor health, and breeding difficulties, which certainly hamper the activity.

In the Neotropical forests, where game meat is the principal source of animal protein (Isaac et al., 2015; Van Vliet et al., 2016), some conservation innovators (Chardonnet et al., 2002; Nogueira and Nogueira-Filho, 2011) pointed out the farming of some wild mammals as an alternative sustainable management strategy to avoid overhunting that threaten some species, such as the paca (*Cuniculus paca*). This rodent is hunted for food throughout its range (Emmons, 2016). Over-hunting for their meat and destruction of its natural habitats has caused population decline in some parts of its range (Ribeiro et al., 2017). Therefore, the farming can be viewed as a mechanism to promote biodiversity conservation, while satisfying human needs.

In the first commercial farms, the paca was usually breed in couples due to the solitary habits of the species, living in monogamous pairs during reproductive periods (Emmons, 2016; Emmons and Feer, 1997; Patton, 2015). Smythe (1987) and Smythe and Brown de Guanti (1995), Smythe (1987) and Smythe and Brown de Guanti (1995), proposed to breed the paca in groups, of one male and three to five females, for most farmers of this species. More recently, some farmers are breeding the composed colonies of three to five males and 16 to 20

females in 20-30 m<sup>2</sup> pens (Altino, personal observation). However, the effect of such practices on the welfare of paca is unknown.

The animal welfare can be accessed through the concentration of fecal glucocorticoid metabolite (FGCM). In response to stress, there is an increase in the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in the pituitary, which stimulates the production of glucocorticoids, mainly corticosterone or cortisol, depending on the species, in the adrenal glands (Sapolsky, 2002). The glucocorticoids are then released into the bloodstream and reach the organs. Then, glucocorticoids are metabolized in the liver and kidneys and their metabolites are eliminated from the body in feces and urine (Brownie, 1992; Taylor, 1971). The measurement of FGCM is considered a non-invasive practice because there is no need to handle animals to collect feces is relatively easy to test (Palme et al., 1999; Touma et al., 2004), and is particularly advantageous in wild animals such as paca because it does not need to contain the animals. However, the FGCM must be validated physiologically in each species because the metabolism and excretion of steroid hormones vary substantially between species (Schwarzenberger et al., 1996; Palme, 2005; Pereira et al., 2006;). This validation is usually performed through the ACTH challenge test. In this test the adrenal glands are stimulated by applying artificial ACTH, as described for the common marmoset (*Callithrix jacchus*, Sousa and Ziegler, 1998), collared peccary (*Pecari tajacu*, Coradello et al., 2012), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*, Nogueira-Filho et al., 2012), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*, Bashaw et al., 2016).

Hormonal measures alone, are not enough to evaluate welfare (Dawkins, 2008, 2003). In some species, as laying hens (Dawkins et al., 2004) and collared peccaries (Nogueira et al., 2011), increases in FGCM were observed in response to stimuli of positive behavioral activities. Increase in abnormal behavior rates is considered a symptom of chronic stress (Carlstead and Brown, 2005).

Dawkins et al. (2004) and Dawkins, (2008), is highlighted the need to include behavioral observations associated with hormone measurements to assess stress. Therefore, in this study we aimed to validate that measurement of FGCM in pacas provides a feasible and non-invasive way to assess the endogenous adrenal activity. We also aimed to identify behavioral patterns potentially indicative of stress to provide non-invasive complementary tools to evaluate the welfare of paca.

## 5.2 Materials and methods

### 5.2.1 Animals and housing conditions

The study was conducted at Laboratório de Etologia Aplicada, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brazil. The protocol for this experiment was approved by Ethics Committee on Animal Use of UESC (Protocol nº 004/2015).

Four adult males paca weighing  $7.0 \pm 0.5$  kg (mean  $\pm$  standard deviation) and aged about 3 years were used in this study. All of them were born and reared in captivity and used to human proximity. The animals were housed individually in metabolism cages (1.2 m long, 0.8 m wide and 0.8 m high) provided with fecal and urine collectors, burrow, feeder and water through. There were 30 days of acclimatization to the experimental conditions previous to the beginning of the study.

During acclimatization and the experimental periods, each animal was fed with 80 g of pelleted food for rabbits, 100 g of banana (*Musa* ssp.), 120 g of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and 200 g of mango (*Mangifera indica*) supplied once a day at 8:00 h in the morning. The mango was supplied to avoid ascorbic acid deficiency because, apparently, the paca is unable to synthesize ascorbic acid (Laska et al., 2003). Protein and energy levels of the diet (9.3% CP and 17.5 MJ/kg on dry matter basis) met the requirements of crude protein and crude energy of adult pacas described by Nogueira-Filho et al. (2016). Water was supplied *ad libitum*.



### 5.2.2 ACTH challenge and sample collection

All individuals were submitted to four treatments during four different experimental phases using a Latin square design ( $4 \times 4$ ). The successive treatments were: unhandled (first control) - the paca was not captured; saline (second control) – the individual was captured with a net and received an intramuscular injection of 2.0 mL of saline solution (0.9%); ACTH low dosage – the paca was captured and received an intramuscular injection of 0.18 mL of a synthetic ACTH analogue (human use, tetracosactide, Synacthen® Depot; ampule 1mg/1mL; Novartis Pharma S/A, Nürnberg, Germany) diluted with saline solution to 2.0 mL; ACTH high dosage – the paca was captured and received 0.37 mL of a synthetic ACTH analogue which was also dissolved in saline solution to 2.0 mL. As injections were applied between 7am and 7:30 am

ACTH dosages were based on the indicated human recommendations (1.0 mg/70 kg, (Harper et al., 1976; Bercovici et al., 2005) and adjusted for paca by allometric extrapolation, taking in to account the metabolic weight of each paca (metabolic weight = body mass<sup>0.75</sup>). We used two dosages of ACTH, because no information on the proper dosages to stimulate the glucocorticoid production by the paca's adrenal glands in the consulted literature. The unhandled and saline treatments were applied to evaluate the effects of capture, restraining, and injection on the excretion fecal glucocorticoid metabolites (FGCM) samples of the paca. To inject the saline and ACTH treatments, each animal was captured with a net and kept restrained on a table. ACTH was applied in the upper thigh (biceps femoris) using a 3.0 mL syringe and 25 mm x 7 mm needle. In the challenge day tests, we began to perform the handle and injection procedures at 7:30 h AM and lasted around four minutes for each individual.

We collected the feces samples every three hours between 6 a.m. and 6 p.m. Unfortunately, due to logistic conditions, we could not collect samples between 6 p.m. and 6

a.m. After collection, we weighed the feces samples and stored them in properly identified plastic bags they are stored in a freezer at -20° C. At the end of the experimental phases, we lyophilized, homogenized, and grounded these samples in a ball mill (Marconi, Mod. MA 350), stored theses in identified plastic bags and stored again in a freezer at -20°C for further analyses.

Each experimental phase lasted eight consecutive days. To avoid interference of the previous treatment in the following period, we added seven interval days between each phase. In animals with functional cecum as the paca (Smythe and Brown de Guanti, 1995), the excretion of glucocorticoid metabolites usually occur between 24 and 48 hours after an acute stressor stimulus (Palme et al., 1996). Therefore, we considered these 14 days (seven days after treatments plus seven additional days) a sufficient interval for the concentration of fecal glucocorticoid metabolite samples return back to the basal levels.

### *5.2.3 Hormone extraction and enzyme immunoassay*

The extraction and measurement of glucocorticoid metabolites were carried out at the Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) at Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP Jaboticabal), according to the methodology described by Graham et al., (2001). Steroids were extracted by adding 5.0 mL of 90% methanol (10% water) to ~0.5 g of dried feces, vortexed for 30 seconds, followed by shaking for 12 hours on a horizontal shaker (Mod. AP22® - Phoenix Ltda - Araraquara Brazil), and vortexed again for 10 seconds. Then, the tubes were centrifuged at 1,500 rpm for 20 minutes. The supernatant (containing hormones and metabolites) was placed in identified plastic tubes and stored at -20°C until assay. We adjusted the volume of the methanol to the same proportion as the weight of the sample (0.25 g of sample in 2.5 mL of methanol) for samples that did not have sufficient material. This adjustment was performed in

just 11% of the analyzed samples (N= 178).

The concentration of FGCM was measured using two different enzyme immunoassays (EIAs). We used two antibodies: polyclonal antibody for corticosterone (CJM006, 1:15,000 dilution) and a corticosterone-HRP conjugate (1:15,000 dilution) obtained from Ms. Coralie Munro (California University, Davis, California, USA). Cross-reactivity for the corticosterone antibody was corticosterone 100%, desoxycorticosterone 14.25%, tetrahydrocorticosterone 0.90%, 11-deoxycortisol 0.03%, prednisone <0.01%, prednisolone 0.07%, cortisol 0.23%, cortisone <0.01%, progesterin 2.65%, testosterone 0.64%, estradiol 17b <0.01% (Daniszová et al., 2017); polyclonal antibody for cortisol (R4866, 1:8,500 dilution) and a cortisol-HRP conjugate (1:20,000 dilution). In addition, the cross-reactivity for the cortisol antibody was 100 % with cortisol, 9.9 % with prednisolone, 6.3 % with prednisone, and 5.0 % with cortisone (Young et al., 2004).

#### *5.2.4 Enzyme immunoassay validation and hormonal determination*

We validated each EIA by testing its specificity to determine whether paca fecal extracts contained FGCM would bind to the antibody in each EIA in a way comparable to its standard. Specificity was determined by a parallelism assay between the standard antigen and the antigens present in extracts (Touma and Palme, 2005). For this assay, a pooled sample from fecal extracts from the three days after injections of the highest dose of ACTH was prepared and serially diluted (1:1 in EIA buffer) from 1:2 to 1:33554432. The slopes of the curves of these samples were then compared to the of the standard kit curve (1:2 to 1:256 dilution). Using these data, appropriate dilution for samples in each assay was identified by determining what dilution produced close to 50% sample binding for the pool.

For assay precision assessment, intra- and inter-assay coefficients of variation (CV%) were calculated. For intra-assay CV, all samples were assayed in duplicate and reanalyzed if

the coefficient of variation between duplicates exceeded 10%. While inter-assay CV was estimated from concentrations of a high (30% of binding) and low control (70% of binding) run in each assay.

The immunoenzymatic assay was carried out on the NUNC plates (Thermo Scientific), which were coated with 50 mL of antibody diluted in a coating buffer (0.05 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) and stored for about 15 hours at 4°C. Unbound antibodies were rinsed away with a wash solution (0.15 M NaCl, 0.05%). Then, 50 µl of the dilutions of each sample, dilutions of the standard curve, and the controls high and low (diluted with EIA buffer) were added to each well. After that, the corresponding HRP conjugate was added for the corticosterone or cortisol assays and incubated for two hours (to corticosterone) or one hour (to cortisol) at 24°C. Subsequently, the plates were washed, 100 mL of the ABTS solution was added to each well, and the plates were placed on a shaker until the white wells arrived at an optical density of 0.7. Absorbance was measured under 405 nm light with the plate reader (Multiskan Ascent–Thermo Scientific). FGCM concentrations are expressed as ng per g of dry feces.

### *5.2.5 Observational data collection*

During all experimental phases, we recorded the images of the animals using cameras (Citrox, CX-1620), infrared lens, and digital image recorder (DVR Stand Alone Greatek GTK- DVR08A). We selected the images recorded between 8 a.m. and 9 a.m. of four days of the experimental phases: 1) pre-challenge day - the day immediately before handle and further treatments procedures; 2) challenge day - the day of handle and injection of treatments; and 3) post-challenge day - the following day after treatments procedures; 4) 7<sup>th</sup> day – seventh day after the challenge day. Therefore, for each phase of the experiment, we analyzed 16 hours of recording. The experiment had 4 phases because we used Latin Square Delineation 4x4 (4 phases with 4 repetitions). Multiplying the 16 hours by the 4 phases we had a total of 64 hours

of recording analyzed.

We used the focal animal sampling method (Altmann, 1974) and we registered the behavioral records through the software CowLog (version 3.0.2). CowLog is a program which provides an electronic timer that allows to calculate the time spent in each of four behavioral categories that we used: feeding, comfort, exploratory, and potentially indicative of stress (Table 1).

**Table 1** Description of behaviours patterns observed for the pacas

| Behavioral categories                        | Description                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Feeding<sup>1</sup></b>                   |                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Food intake</i>                           | The animal gets and chews feed.                                                                                                                                                                          |
| <i>Water intake</i>                          | The animal drinks the water from the trough                                                                                                                                                              |
| <b>Comfort<sup>1</sup></b>                   |                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Rub muzzle</i>                            | Sitting on the hind legs, the paca passes the ventral region of the anterior limbs (a hairless region) on the muzzle, in the direction from eyes to the rhinarium.                                       |
| <i>Lick</i>                                  | Lying in the sternal position or sitting, the animal licks the ventral aspect of the anterior or posterior legs, the lateral of the dorsum and the previous legs, repeating this movement several times. |
| <b>Exploratory<sup>1</sup></b>               |                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Exploratory acts</i>                      | The paca sniffs the floor and air. While sniffing, move around in the cage and in the lair or lean its paws on the bars, stretching its body                                                             |
| <b>Potentially indicative of stress</b>      |                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Pacing<sup>2</sup></i>                    | Stereotypic behavior consisting of the repetitive walking of an individual in the exact same pattern (either back and forth or in circle).                                                               |
| <i>Inactivity<sup>3</sup></i>                |                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Lying in lateral position<sup>1</sup></i> | Fully stretched body with the sides of the head, neck and back supported on the floor.                                                                                                                   |
| <i>Lying in sternal position<sup>1</sup></i> | Ventral region supported on the floor, the hind limbs next to the body and the anterior limbs parallel and stretched forward, leaning on the floor; the head may be supported on the floor or raised.    |
| <i>Sitting position<sup>4</sup></i>          | Animal is sitting with front legs extended and hind legs curved.                                                                                                                                         |

<sup>1</sup>Following Sabatini and Costa (2001).

<sup>2</sup>Following Poirier and Bateson (2017).

<sup>3</sup>Following Less et al. (2012).

<sup>4</sup>Following Rehn et al. (2014).

### 5.2.6 Statistical analysis

As the excretion rate was quite variable among individuals, a daily average of FGCM concentrations was calculated for each individual in each experimental phase. Furthermore, due to the high inter-individual variability in basal levels, each individual was considered as its own control by expressing each concentration as percentage of the basal value verified in the pre-challenge day, following Palme et al. (1999). Then we compared the proportion of concentration increase (%) of FGCM using ANOVA for repeated measures, followed by Tukey post-hoc tests when appropriate, considering days of sample collection and treatments as independent variables, for both corticosterone and cortisol antibodies EIAs. We used the same statistical model to compare the proportion of time spent per behavioral pattern considering treatments and the day of observation (pre-challenge day, challenge day, post-challenge day, and 7<sup>th</sup> day) as independent variables. We determined the mean basal level concentration of FGCM, using EIA with antibody to cortisol, in the samples collected during the five days immediately before the injection of treatments (pre-challenge day). We compared the mean concentration along the day using ANOVA for repeated measures, considering the hour of collection as independent variable. Prior to all analyses, we applied the Lilliefors test for testing the normal distribution of data. In all these analyzes we used the software Statistica (7.0, StatSoft, Tulsa, OK, USA) and considered a  $P < 0.05$  as significant.

## 5.3 Results

### 5.3.1 Biochemical validation of EIA

In the corticosterone assay, the standard curve was expressed by the linear equation:

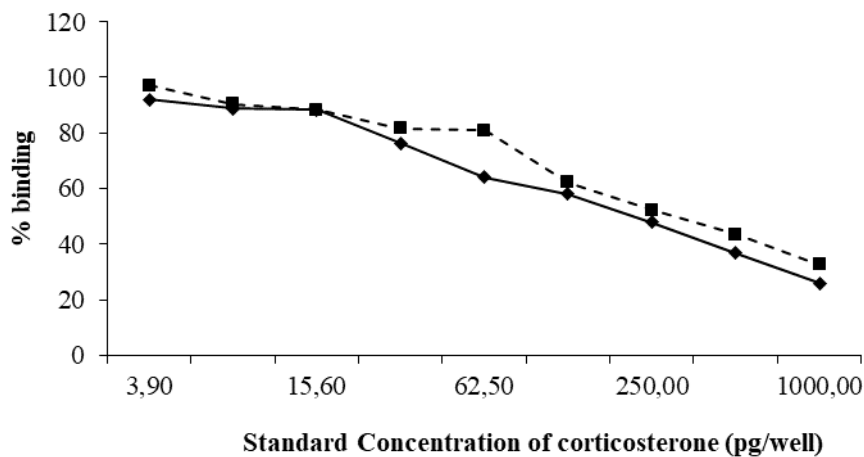
$$y = -0.0338x + 3.9657 (R^2 = 0.97, P = 1.156e - 06)$$

The dilutions of the pool of fecal samples with *ACTH high* was expressed by the linear

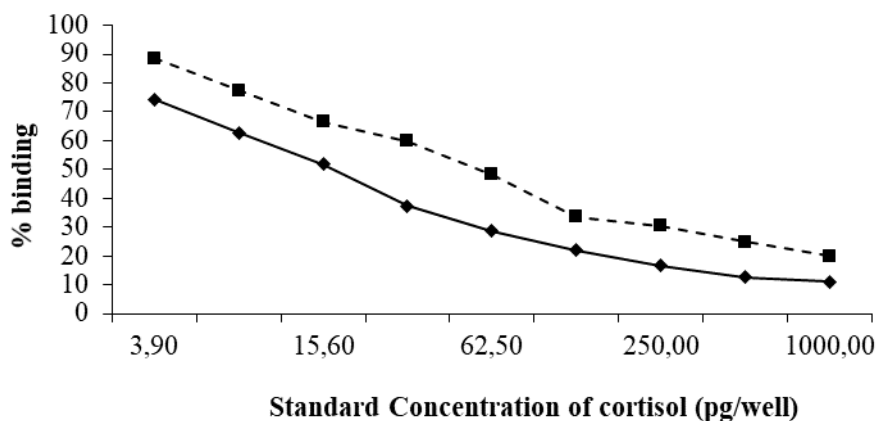
equation:

$$y = -0.035x + 4.2392 \quad (R^2 = 0.95, P = 8.484e - 06)$$

There was an immunogenic similarity between the standard antigen of corticosterone with the fecal extract for the paca ( $r_{\text{Pearson}} = 0.98$ ,  $P = 0.01$ ). That is there was parallelism between the two curves, biochemically validating the analysis (Fig. 1). There was also immunogenic similarity between the standard antigen of cortisol antibody assay with the fecal extract for the paca ( $r_{\text{Pearson}} = 0.99$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 2). This parallelism test also showed that the best dilution for the paca samples was 1:8, when this dilution promoted a binding percentage near 50% of the standard curve.



**Fig. 1.** Curve of parallelism with the corticosterone antibody. The continuous line represents the dilutions of the standard curve and the dashed line represents the pool dilution curve of the samples.



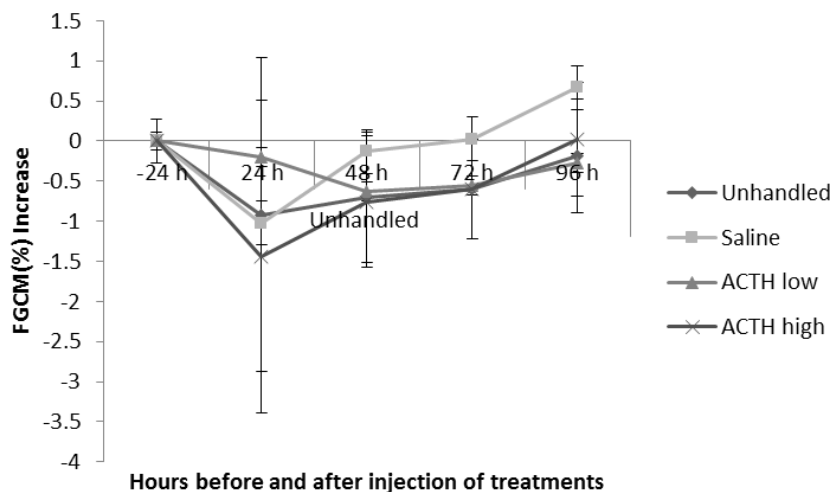
**Fig. 2.** Curve of parallelism with the cortisol antibody. The continuous line represents the dilutions of the standard curve and the dashed line represents the pool dilution curve of the samples. Standard curve was  $y = -0.0349x + 3.0247$ ,  $R^2 = 0.944$  and for the dilutions of fecal samples with ACTH high was  $y = -0.0333x + 3.4587$ ,

$R^2 = 0.977$ .

### 5.3.2 ACTH Challenge

The intra-assay coefficient of variation was less than 10% for all samples analyzed for both antibodies. With the antibody for corticosterone ( $n = 7$  plates), the inter-assay CV for the high (30% binding) and low (70% binding) concentrations were  $4.4 (\pm 3.7) \%$  (mean  $\pm$  standard deviation) and  $15.3 (\pm 4.9) \%$ , respectively. For the EIA with cortisol antibody ( $n = 9$  plates), the inter-assay CV for the high (30% binding) and low (70% binding) concentrations were  $11.1 (\pm 8.9) \%$  and  $11.4 (\pm 4.6) \%$ , respectively

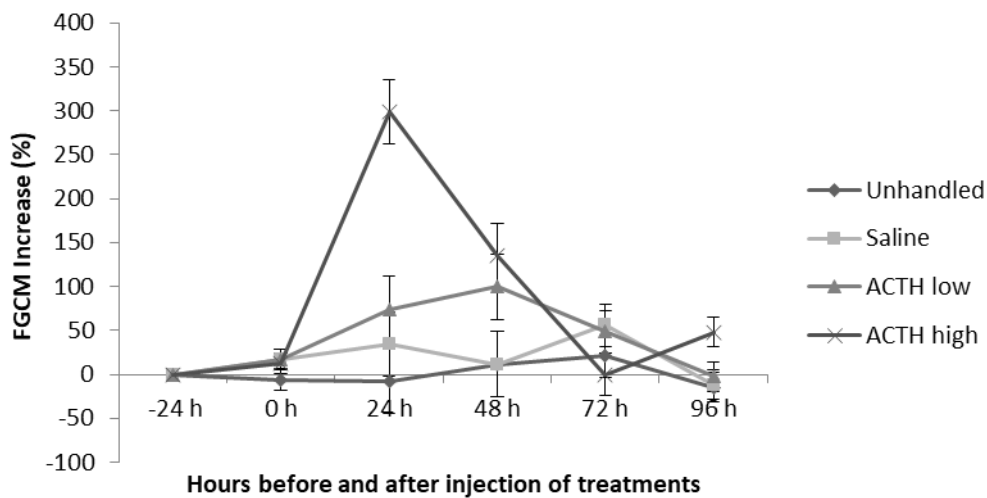
When used the antibody for corticosterone (corticosterone EIA), the statistical model showed no interaction between treatments and sample collection day in the concentration increase (%) of FGCM among treatments ( $F = 0.11$ ,  $P = 0.99$ ), days (Fig. 3). There were also no isolated effects of treatments ( $F = 0.12$ ,  $P = 0.95$ ) nor sample collection day ( $F = 0.58$ ,  $P = 0.63$ ) in the concentration of fecal glucocorticoid metabolites of paca in the days after the injection of treatments. The mean concentration of FGCM was  $261.9 (\pm 11.6)$  ng/g of dry feces, ranging from 249.0 to 278.1-ng/g of dry feces collected in days before the injection of treatments (pre-challenge day) and remain the same during the other collection days with a mean of  $260.6 (\pm 13.5)$  ng/g of dry feces.



**Fig. 3.** Means ( $\pm$  standard error) of the increase (%) in the concentration of fecal glucocorticoid metabolite (FGCM) samples of the paca previous and after the treatments unhandled, saline, ACTH low (0.18 mL of ACTH) and ACTH high (0.37 mL of ACTH) by the corticosterone EIA

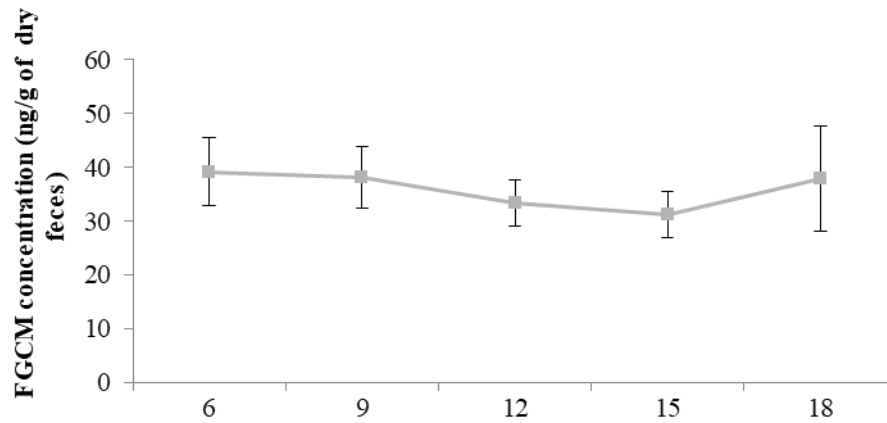


When used the antibody for cortisol (cortisol EIA), the statistical model showed an interaction between treatments and sample collection day in the concentration increase (%) of FGCM among treatments ( $F = 6.54$ ,  $P < 0.0001$ ). The post-hoc test showed that the highest mean ( $\pm$  standard error) concentration increase occurred 24 hours after the injection of the treatment ACTH high, despite the high inter-individual variability ( $299 \pm 124\%$ ) (Fig. 4). At 72 hours after the challenge day all treatments converged for concentration levels like the pre-challenge day (-24 h) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Means ( $\pm$  standard error) of the increase (%) in the concentration of glucocorticoid metabolites in fecal samples (FGCM) of the paca previous and after the treatments unhandled, saline, ACTH low(0.18 mL of ACTH) and ACTH high (0.37 mL of ACTH) by the cortisol EIA.

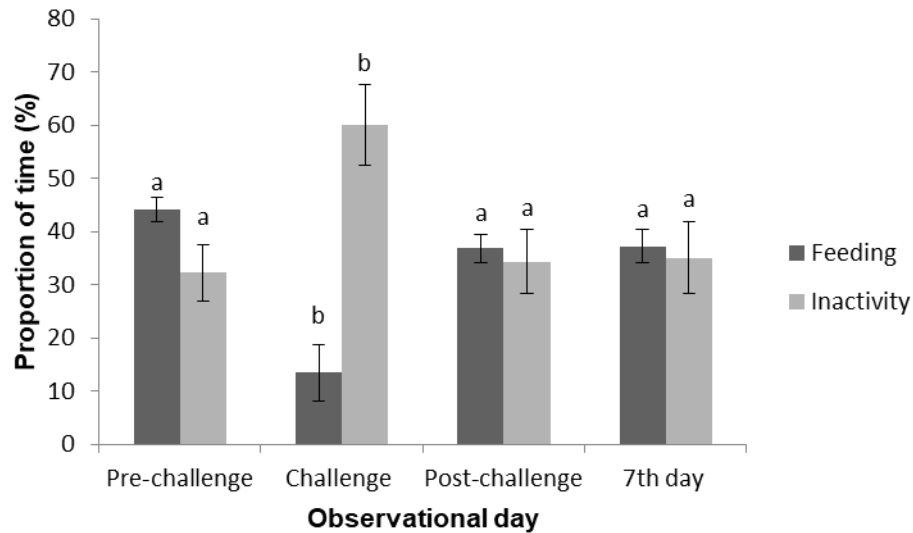
The mean concentration of FGCM was  $36.0 (\pm 11.7)$  ng/g of dry feces, ranging from 20.6 to 67.1 ng/g of dry feces collected in days before the injection of treatments (pre-challenge day). There was no variation in the concentration of FGCM along the day, from 6:00 h to 18:00 h ( $F = 0.48$ ,  $P = 0.75$ ) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Mean ( $\pm$  standard errors) of FGCM concentration along the day using EIA with antibody to cortisol in the pacas samples collected before challenge day

### 5.3.3 Behavioral responses to stress

The statistical model showed no interaction between treatments and the day of observation ( $F = 0.61$ ,  $P = 0.78$ ) for the inactivity behavioral pattern. On the other hand, regardless of the treatment ( $F = 0.07$ ,  $P = 0.97$ ), the day of observation ( $F = 16.68$ ,  $P < 0.001$ ) affected the proportion of time pacas were observed inactive. The *post-hoc* test showed that they spent more time inactive ( $60.1 \pm 27.5\%$ ) during the day of the injection of treatments (challenge day) than the other days ( $33.9 \pm 21.9\%$ ) (Fig. 6). There was also no interaction between treatments and the day of observation ( $F = 0.11$ ,  $P = 0.99$ ) for the feeding behavioral pattern. There was an effect of the day of observation ( $F = 14.74$ ,  $P < 0.001$ ), and regardless of the treatment ( $F = 0.25$ ,  $P = 0.86$ ), pacas were observed less time feeding during challenge days ( $13.5 \pm 19.0\%$ ) compared to the other days ( $39.4 \pm 10.6\%$ ).



**Fig. 6.** Mean ( $\pm$  S.E.) of the percentage of behavioral patterns inactivity and feeding observed in pacas from 8:00 h to 9:00 h ( $n = 16$ ). Different letters above columns of the same behavioral pattern show differences between observational days by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

Pacas were observed in average 14.9 ( $\pm 12.5$ ) % of the observational time in exploratory and 13.2 ( $\pm 26.0$ ) % pacing behavioral patterns. For both patterns, there were no interaction between treatments and the day of observation ( $F = 0.23$ ,  $P = 0.98$  and  $F = 1.28$ ,  $P = 0.28$ , respectively). No isolated effects of treatments ( $F = 1.65$ ,  $P = 0.23$  and  $F = 0.63$ ,  $P = 0.98$ , respectively) and day of observation ( $F = 0.49$ ,  $P = 0.69$  and  $F = 0.16$ ,  $P = 0.92$ , respectively). The pacas only spent 1.7 ( $\pm 2.5$ ) % of the observational time in comfort patterns. There was an interaction between treatments and the day of observation ( $F = 3.01$ ,  $P = 0.009$ ), however, the post-hoc test showed no differences among means.

#### 5.4 Discussion

There was immunogenic similarity between the standard corticosterone and cortisol antigen and the fecal extract antigens of the paca, validating the analysis biologically.

Moreover, the determined intra-assay and inter-assay coefficient of variation (CV) were inferior to 15%, as recommended for the employed technique (Findlay et al., 2000; Shah et al., 2000), which allow to considered validated the determined concentrations of FGCM.

There were no changes in the concentration of FGCM in the corticosterone EIA, despite the corticosterone is the usual glucocorticoid found in rodents (Mormède et al., 2007; Touma and Palme, 2005). In contrast, we determined changes in the concentration of FGCM in the cortisol EIA for samples collected after the ACTH-challenge. Busso and Ruiz (2011) highlighted that hystricomorph rodents, as the paca, show more similarities with mammals of other orders than with rats and mice, which may explain the non-reactivity with corticosterone antibody. Therefore, the commercially available cortisol enzyme immunoassay kit is appropriate to evaluate concentrations of glucocorticoid metabolites in freeze-lyophilized feces samples of the paca.

The results of the ACTH challenge in the cortisol EIA showed a significant excretion rise of FGCM in the feces samples collected in the followed day after the injection of ACTH high dosage and then dropped to pre-treatment concentrations. For the unhandled, saline and ACTH low dosage treatments remained nearly constant. Then, the sharp rise in the concentration of FGCM mirrors an acute adrenal activation. The ACTH-induced time to peak was in accordance with the 24 to 48 hours excretion lag times in mammals with functional cecum (Palme et al., 1996). However, there was a great inter-individual variability in this increase, which range from 199 to 426%. Moreover, there was also a high inter-individual variability in the basal levels, which ranged from 20.6 to 67.1 ng/g of dry feces. The individuals' differences in adrenocortical responsiveness must be considered to understand the effect of stress on the studied animals, as previously highlighted by (Nogueira-Filho et al., 2012). Then, the use of each individual as its own control strengthen the comparisons (Palme et al., 1999). Despite such considerations, we verified that the cortisol EIA assay allows to

detect biological relevant concentration FGCM levels, as pacas after receiving the injection of the ACTH high dosage showed hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation. This result shows the suitability of the cortisol EIA to monitor non-invasively of increased adrenocortical activity, and thus, stress assessment in the paca.

As highlighted by Dawkins et al. (2004) and Dawkins (2008), hormonal measures are not enough to evaluate welfare. In this study we verified that under acute stress the pacas were more inactive and spent less time feeding. These behavioral characteristics can be used as indicative of stress in paca. We did not find significant increase in the proportion of time spent in pacing.

Aversive stimuli provoke divergent reactions and as highlighted by Mason, (2010), some species display little stereotypic behavior, because they instead react with extreme inactivity. For instance, after released in an unfamiliar arena with nine different objects, as a metal bell and a rubber, chinchillas (*Chinchilla laniger*) showed extensive defecation while biting the objects, whilst guinea pigs (*Cavia porcellus*) remained inactive (Glickman and Hartz, 1964). Some individuals increase or decrease their food intake during stressful conditions while others do not change feeding behaviours (Dallman, 2010). Rats acutely stressed by restraining showed ingestion similar to that of the group control (Ely et al., 1997).

The lack of difference of pacing among treatments can be explained by individual variability. During challenge-day, after the injection of the ACTH high dosage the time spent in pacing ranged from 0.3 to 99.2%. Therefore, besides abnormal behavior rates are usually considered a symptom of chronic stress (Carlstead and Brown, 2005) and indicative of poor welfare (Mason, 2006), they cannot be used to stress monitoring in paca. Both decreases in activity and feeding time can be used as indicative of stress for the paca.

## 5.5 Conclusion

The measure of fecal glucocorticoid metabolites was valid only with cortisol. This suggested that the main glucocorticoid produced by pacas is cortisol and not corticosterone. Regarding stress indicator behaviors, pacas spent more time in inactivity and less time with feeding when subjected to acute stress. Thus, we can suggest that to assess the welfare of captive-bred pacas, fecal glucocorticoid metabolites should be quantified using the EIA tool with cortisol antibody and, simultaneously, monitor the time spent on inactivity and feeding.

## References

- Altmann, J., 1974. Observational study of behavior. *Behaviour* 49, 227-266.
- Bashaw, M.J., Sicks, F., Palme, R., Schwarzenberger, F., Tordiffe, A.S.W., Ganswindt, A.  
Non-invasive assessment of adrenocortical activity as a measure of stress in giraffe  
(*Giraffa camelopardalis*). *BMC Veterinary Research*, 12:235.  
<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0864-8>
- Bercovici, J.P., Fiet, J., Gibault, L., Volant, A., Abalain, J.H., Floch, H.H., Sonnet, E., Fournier,  
G., 2005. Testicular adrenal rest tumours in salt wasting congenital adrenal hyperplasia  
(in vivo and in vitro studies). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.  
*Mol. Biol.* 93, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.023>
- Brownie, A.C., 1992. The metabolism of adrenal cortical steroids, in: James, W.H.T. (Ed.),  
The metabolism of adrenal cortical steroids. Raven Press, New York, pp. 209–224.
- Busso, J.M., Ruiz, R.D., 2011. Excretion of Steroid Hormones in Rodents : An Overview on  
Species Differences for New Biomedical Animal Research Models, in: Kandarakis, D.  
(Ed.), *Contemporary Aspects of Endocrinology*. INTECH Open Access Publisher,  
Contemporary, pp. 375–396.
- Carlstead, K., Brown, J.L., 2005. Relationships between patterns of fecal corticoid excretion  
and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*)  
and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biol.* 24, 215–232.  
<https://doi.org/10.1002/zoo.20050>
- Challender, D.W.S., MacMillan, D.C., 2014. Poaching is more than an enforcement problem.  
*Conserv. Lett.* 7, 484–494. <https://doi.org/10.1111/conl.12082>
- Chardonnet, P., des Clers, B., fisher, J.R., Gerhold, R., Jori, F., Lamarque, F., Fischer, J.R.,  
2002. The value of wildlife. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 21, 15–51.  
<https://doi.org/10.20506/rst.21.1.1323>

- Clubb, R., Mason, G., 2003. Captivity effects on wide ranging carnivores. *Nature* 425, 472–474.
- Coradello, M.A., Morais, R.N., Roper, J., Spercoski, K.M., Massuda, T., Nogueira, S.S.C., Nogueira-Filho, S.L.G., 2012. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). *J. Zoo Wildl. Med.* 43, 275–282.  
<https://doi.org/10.1638/2011-0046.1>
- Dallman, M.F., 2010. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.10.004>
- Daniszová, K., Mikula, O., Macholán, M., Pospíšilová, I., Vošlajerová Bímová, B., Hiadlovská, Z., 2017. Subspecies-specific response to ACTH challenge test in the house mouse (*Mus musculus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 252, 186–192.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.06.023>
- Dawkins, M.S., 2003. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. *Zoology (Jena)*. 106, 383–387. <https://doi.org/10.1078/0944-2006-00122>
- Dawkins, M.S., 2008. The Science of Animal Suffering. *Ethology* 114, 937–945.
- Dawkins, M.S., Edmond, A., Lord, A., Solomon, S., Bain, M., 2004. Time course of changes in egg-shell quality, faecal corticosteroids and behaviour as welfare measure in laying hens. *Anim. Welf.* 13, 321–327.
- Ely, D.R., Dapper, V., Marasca, J., Correa, J.B., Gamaro, G.D., Xavier, M.H., Michalowski, M.B., Catelli, D., Rosat, R., Ferreira, M.B., Dalmaz, C., 1997. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.* 61, 395–398.
- Emmons, L., 2016. *Cuniculus paca*, Spotted Paca. IUCN Red List Threat. Species 2016 8235.
- Emmons, L.H., Feer, F., 1997. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide*, 2nd ed. The University of Chicago Press, Chicago.
- Fàbregas, M.C., Fosgate, G.T., Koehler, G.M., 2015. Hunting performance of captive-born



- South China tigers (*Panthera tigris amoyensis*) on free-ranging prey and implications for their reintroduction. *Biol. Conserv.* 192, 57–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.09.007>
- Findlay, J.W.A., Smith, W.C., Lee, J.W., Nordblom, G.D., Das, I., Desilva, B.S., Khan, M.N., Bowsher, R.R., 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, 1249–1273.  
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00244-7)
- Glickman, S.E., Hartz, K.E., 1964. Exploratory behavior in several species of rodents. *J. Compar. Physiol. Psychol.* 58, 101–104.
- Graham, L.H., Schwarzenberger, F., Möstl, E., Galama, W., Savage, A., 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biol.* 20, 227–236. <https://doi.org/10.1002/zoo.1022>
- Greene, D.U., Gore, J.A., Stoddard, M.A., 2016. Reintroduction of the endangered Perdido Key beach mouse (*Peromyscus polionotus trissyllepsis*): fate and movements of captive-born animals. *Florida Sci.* 79, 1–13.
- Harper, M.E., Peeling, W.B., Cowley, T., Brownsey, B.G., Phillips, M.E.A., Groom, G., Fahmy, D.R., Griffiths, K., 1976. Plasma steroid and protein hormone concentrations in patients with prostatic carcinoma, before and during oestrogen therapy. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 81, 409–426.
- International Academy of Animal Welfare Sciences, 1992. Welfare guidelines for the reintroduction of captive-bred mammals to the wild. The Universities Federation for Animal Welfare, London.
- Isaac, V.J., Almeida, M.C., Giarrizzo, T., Deus, C.P., Vale, R., Klein, G., Begossi, A., 2015. Food consumption as an indicator of the conservation of natural resources in riverine communities of the Brazilian Amazon. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 2229–2242.

<https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140250>

- Laska, M., Luna Baltazar, J. M., Rodriguez Luna, E. Food preferences and nutrient composition in captive pacas, *Agouti paca* (Rodentia, Dasyproctidae). *Mammalian Biology*. 68, 31-4. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-00059>
- Less, E.H., Kuhar, C.W., Dennis, P.M., Lukas, K.E., 2012. Assessing inactivity in zoo gorillas using keeper ratings and behavioral data. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 137, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.01.001>
- Mason, G., 2006. Stereotypic behaviour in captive animals: fundamentals, and implications for welfare and beyond. *Stereotypic Anim. Behav. Fundam. Appl. to Welf.* 325–356. <https://doi.org/10.1079/9780851990040.0325>
- Mason, G.J., 2010. Species differences in responses to captivity: Stress, welfare and the comparative method. *Trends Ecol. Evol.* 25, 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.08.011>
- Minteer, B.A., Collins, J.P., 2013. Ecological ethics in captivity: Balancing values and responsibilities in zoo and aquarium research under rapid global change. *ILAR J.* 54, 41–51. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt009>
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S., Veissier, I., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92, 317–339. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>
- Nogueira-Filho, S., Carvalho, H., Silva, H., 2012. Stress assessment in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). *Suiform.*
- Nogueira-Filho, S.L.G., Bastos, I. da H., Mendes, A., Nogueira, S.S. da C., 2016. Protein requirements of finishing paca (*Cuniculus paca*). *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 1005–1011. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1053-2>

- Nogueira, S.S.C., Nogueira-Filho, S.L.G., 2011. Wildlife farming: An alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? *Biodivers. Conserv.* 20, 1385–1397. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0047-7>
- Nogueira, S.S.C., Calazans, S.G., Costa, T.S.O., Peregrino, H., Nogueira-filho, S.L.G., 2011. Effects of varying feed provision on behavioral patterns of farmed collared peccary (Mammalia , Tayassuidae). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 132, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.002>
- Palme, R., 2005. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1046, 75–80. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.007>
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Ismail, M.N., 1996. Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim. Reprod. Sci.* 43, 43–63.
- Palme, R., Robia, C., Meßmann, S., Hofer, J., Möstl, E., 1999. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierärztl Mschr* 86, 237–241.
- Patton, J., 2015. Family Cuniculidae, in: Patton, J., Pardiñas, U., G, D. (Eds.), *Mammals of South America*, 1918. University of Chicago Press, 2015, Chicago and London, pp. 726–733.
- Pereira, R.J.G., Duarte, J.M.B., Negrão, J.A., 2006. Effects of environmental conditions, human activity, reproduction, antler cycle and grouping on fecal glucocorticoids of free-ranging Pampas deer stags (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Horm. Behav.* 49, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.012>
- Poirier, C., Bateson, M., 2017. Pacing stereotypies in laboratory rhesus macaques: implications for animal welfare and the validity of neuroscientific finding. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.engfracmech.2009.01.003>
- Rehn, T., Handlin, L., Uvnäs-Moberg, K., Keeling, L.J., 2014. Dogs' endocrine and

- behavioural responses at reunion are affected by how the human initiates contact. *Physiol. Behav.* 124, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.009>
- Ribeiro, V.M.F., Satrapa, R., Diniz, J.V.A., Fêo, H.B., Flórez, L.M.M., Satrapa, R.A., Oba, E., 2017. Synchronization of estrus in paca (*Cuniculus paca* L.): possible impacts on reproductive and productive parameters. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 54, 27–35. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.107807>
- Sabatini, V., Costa, M.J.R.P. da, 2001. Etograma pacas em cativeiro. *Rev. Etol.* 3, 3–14.
- Sapolsky, R.M., 2002. Endocrinology of the stress-response, in: Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D., McCarthy, M.M. (Eds.), *Endocrinology of the Stress-Response*. MIT Press., Cambridge, pp. 409–450.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R., Bamberg, E., 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 515–526. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01561-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01561-8)
- Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W.A., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A., 2000. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm. Res.* 17, 1551–1557. <https://doi.org/10.1023/A>
- Smythe, N., 1987. The paca (*Cuniculus paca*) as a domestic source of protein for the neotropical, humid lowlands. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 17, 155–170. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0168-1591(87)90017-7)
- Smythe, N., Brown de Guanti, O., 1995. La domesticación y cría de la paca (*Agouti paca*). FAO, Roma.
- Sousa, M.B.C., Ziegler, T.E., 1998. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. *Am. J. Primatol.* 46, 105–117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1998\)46:2<105::AID-AJP1>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1998)46:2<105::AID-AJP1>3.0.CO;2-#)

- Taylor, W., 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitam. Horm* 29, 201–285.
- Touma, C., Palme, R., 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1046, 54–74.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1343.006>
- Touma, C., Palme, R., Sachser, N., 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: A noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* 45, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.07.002>
- Van Vliet, N., Cornelis, D., Beck, H., Lindsey, P., Nasi, R., Lebeck, S., Moreno, J., Fragoso, J., Jori, F., 2016. Meat from the wild: extractive uses of wildlife and alternatives for sustainability, in: MATEO, R., ARROYO, B., GARCÍA, J.T. (Eds.), *Current Trends in Wildlife Research*. Springer, Suíça, p. 293.
- Young, K.M., Walker, S.L., Lanthier, C., Waddell, W.T., Monfort, S.L., Brown, J.L., 2004. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 148–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.02.016>

## **6. ARTIGO CIENTÍFICO III**

### **EFEITO DO ESTRESSE SOBRE CONSUMO ALIMENTAR E DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM PACA (Mammalia, Rodentia)**

Manuscrito a ser submetido ao periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (regras no Anexo III)

## **EFEITO DO ESTRESSE SOBRE CONSUMO ALIMENTAR E DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM PACA (Mammalia, Rodentia)**

Vanessa Souza Altino<sup>1</sup>, Selene Siqueira da Cunha Nogueira<sup>1</sup>, Letícia Guerra Aldrigui<sup>1</sup>, Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Etologia Aplicada, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brazil.

[\\*slgnogue@uesc.br](mailto:*slgnogue@uesc.br)

Avaliou-se o efeito de diferentes doses de ACTH sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes em pacas criadas em cativeiro. Foram utilizados quatro pacas distribuídas em quatro gaiolas de metabolismo (delineamento quadrao latino 4 x 4). Foram aplicados os seguintes tratamentos: sem manejo, solução salina, ACTH baixo (0.18 mL de ACTH para cada paca) e ACTH alto (0.37 mL de ACTH). Tínhamos a hipótese, que o estresse agudo diminuiria o consumo alimentar e digestibilidade dos nutrientes. Contudo, não verificamos variação no consumo de MS digestibilidade de nutrientes ( $P > 0.05$ ) entre os tratamentos. Mas observamos que todas as pacas consumiram quantidade inferior de N digestível ao da recomendação para a espécie. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao processo de empatia: animais que passaram por ambos os tratamentos controle (sem manejo e solução salina), apresentaram médias similares de consumo alimentar e digestibilidade dos nutrientes em comparação aos animais submetidos a estresse agudo causado pela injeção das duas doses de ACTH.

**Palavras-chave:** animal neotropical, bem-estar, criação em cativeiro, eixo HPA, nutrição

**Abstract**

The effect of different doses of ACTH on the intake and digestibility of nutrients in captive-bred pacas was evaluated. Four pacas distributed in four metabolism cages were used (experimental latin square 4 x 4). The treatments applied were: unhandled, saline solution, low ACTH (0.18 mL of ACTH for each paca) and ACTH high (0.37 mL of ACTH). We had the hypothesis that acute stress would decrease food intake and digestibility of nutrients. However, we do not verify variation in nutrient digestibility MS intake ( $P > 0.05$ ) between the treatments. But we observed that all pacas consumed less digestible N than the species recommendation. This probably occurred due to the process of empathy: animals that went through both control treatments (unhandled and saline solution), showed similar averages of food consumption and digestibility of nutrients compared to animals subjected to acute stress caused by the injection of the two doses of ACTH.

**Keywords:** captive breeding, HPA axis, welfare, , nutrition, wild animal, nutrition.



## 6.1 INTRODUÇÃO

Um evento estressor ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) dos vertebrados, o que desencadeia a liberação de vários hormônios. Inicialmente ocorre a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo que estimula a pituitária anterior a liberar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea (Lane, 2006). Ao atingir as glândulas adrenais o ACTH estimula a síntese e secreção de glicocorticoides (Whitten *et al.*, 1998; Wasser *et al.*, 2000; Heistermann *et al.*, 2006). Glicocorticoides são hormônios esteroides que incluem cortisol e corticosterona. A maioria dos mamíferos produz cortisol enquanto que, geralmente, roedores e lagomorfos produzem corticosterona (Sapolsky, 2002; Squires, 2003). Esses esteroides regulam a função de quase todos os tecidos do corpo, mas um dos efeitos mais conhecidos é sobre a regulação do metabolismo energético (Gower, 1975; Brownie, 1992). Os glicocorticoides induzem a gliconeogênese e a lipólise (Thun e Schwartz-Porsche, 1994). Durante uma situação de estresse agudo, portanto, a ação dos glicocorticoides inibe o acúmulo de glicose e disponibiliza energia ao indivíduo para as reações de ‘luta ou fuga’ em resposta ao evento estressor (Sapolsky, 2002; Reeder e Kramer, 2005;). Como o requerimento energético aumenta para a manutenção das atividades fisiológicas básicas, ocorre a diminuição da eficiência de utilização e da digestibilidade dos nutrientes (Squires, 2003). Dessa forma, é preciso determinar os efeitos do estresse na produção animal em especial em espécies em processo de domesticação como a paca (*Cuniculus paca*).

Um dos meios de sensibilizar produtores rurais sobre a importância do bem-estar animal é a obtenção de dados que mostrem os efeitos deletérios do estresse sobre a produtividade, como sobre o consumo e a digestibilidade de nutrientes que podem afetar o ganho de peso e o tempo necessário para o abate dos animais. Poucos estudos nessa área foram feitos em animais domésticos e não foram encontrados estudos desse tipo para animais silvestres mantidos em cativeiro. Puvadolpirod e Thaxton (2000) examinaram a digestibilidade de nutrientes em frangos de corte sob estresse agudo provocado pela injeção de ACTH exógeno. Frangos que receberam o tratamento de ACTH apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente, da proteína bruta e de carboidratos solúveis, menores do que os de animais que não sofreram estresse induzido pela aplicação de ACTH (Puvadolpirod e Thaxton, 2000). Temos a hipótese que o consumo e a digestibilidade dos nutrientes nas pacas diminuem sob o efeito de estresse agudo. Nesse contexto, objetivo desse estudo foi avaliar o consumo alimentar e determinar os coeficientes de digestibilidade de nutrientes após aplicação de ACTH exógeno em paca.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

**Nota ética.** Os procedimentos usados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (Proc. nº 004/15).

### 6.2.1 Local de estudo, animais e procedimentos

Os dados sobre consumo e digestibilidade de nutrientes foram coletados durante estudo para validar metodologia de monitoramento de estresse por meio da análise da concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes executado no Laboratório de Etologia Aplicada da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil. Os procedimentos adotados no referido estudo são apresentados resumidamente a seguir. Foram usados quatro pacas, machos e adultos, com três anos de idade e peso médio de  $7,0 \pm 0,5$  kg (média  $\pm$  desvio padrão). Todos os animais nasceram e foram criados em cativeiro e estavam habituados ao manejo dos tratadores. As pacas foram alojadas individualmente em gaiolas de metabolismo (1,2 m de comprimento, 0,8 m de largura e 0,8 m de altura) em local protegido do sol e chuva. As gaiolas tinham piso de treliça de metal que permitia a separação e coleta de urina e fezes. Em cada gaiola havia uma toca de madeira, um bebedouro e um comedouro. Após um período de aclimação ao manejo experimental com 30 dias de duração, os animais passaram pelos procedimentos experimentais que foram aplicados por meio de delineamento quadrado latino ( $4 \times 4$ ). Todas as pacas passaram por todos os tratamentos em fases experimentais distintas. Cada fase teve cinco dias de duração consecutivos, nos quais foram coletadas amostras de fezes após a aplicação dos tratamentos. Entre uma fase e outra foi dado um intervalo extra de sete dias para que o efeito do tratamento anterior não afetasse o tratamento seguinte.

Os tratamentos aplicados foram: sem manejo (SM) – a paca não sofreu captura, contenção ou qualquer tipo de injeção; solução salina (SS) – a paca foi capturada, contida e recebeu injeção intramuscular de 2,0 mL de solução salina (0,9%); ACTH dose baixa (ACTHb) – a paca foi capturada, contida e recebeu injeção intramuscular de 0.18mL de ACTH diluída em solução salina até alcançar o volume de 2,0 mL; ACTH dose alta (ACTHa) – a paca foi capturada, contida e recebeu injeção intramuscular de 0.37 mL de ACTH diluída em solução salina até alcançar o volume de 2,0 mL. O tratamento sem manejo (SM) foi o grupo controle e o tratamento solução salina (SS) foi o sendo controle aplicado para avaliar o

efeito da captura, contenção e aplicação da injeção sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes. O ACTH (Synacthen® Depot; ampola 1mg/1mL; Novartis Pharma S/A, Nürnberg, Germany) e a solução salina foram aplicados por via intramuscular na parte superior da coxa (bíceps femoris) utilizando seringa de 3 mL e agulha 25X7, sempre às 7h30 da manhã. Todo o processo de captura e aplicação das injeções durou em torno de 15 minutos em cada período experimental.

Durante o período de aclimação e todo o período experimental as pacas foram alimentadas diariamente às 8:30 h com 80 g de ração peletizada para coelhos, 100 g de banana-prata (*Musa sapientum*), 120 g de batata-doce (*Ipomoea batatas*) e 200 g de manga (*Mangifera indica*). A manga é considerada boa fonte de ácido ascórbico e por isso ela foi fornecida às pacas pois, aparentemente, esses animais não sintetizam a vitamina C (Laska, *et al.*, 2003). Os níveis de proteína bruta e energia bruta da dieta (Tab. 1) atenderam as exigências mínimas para manutenção de pacas adultos descritas por Nogueira-Filho *et al.* (2016). A água foi fornecida *ad libitum*.

Tabela 1. Composição bromatológica (% na matéria seca, a não ser quando especificado) dos ingredientes e da dieta

| Itens*       | Ração | Batata | Banana | Manga | Dieta |
|--------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| MS           | 99,31 | 28,89  | 24,59  | 14,69 | 45,79 |
| MO           | 99,52 | 95,85  | 95,60  | 97,62 | 97,33 |
| PB           | 14,80 | 5,40   | 4,22   | 3,63  | 7,57  |
| EE           | 2,46  | 0,00   | 5,67   | 2,73  | 2,47  |
| FDN          | 15,96 | 10,68  | 9,49   | 9,21  | 11,69 |
| FDA          | 4,47  | 2,73   | 4,33   | 9,21  | 4,24  |
| HEM          | 11,49 | 7,96   | 5,16   | 3,62  | 7,45  |
| CNF          | 59,30 | 79,77  | 76,22  | 82,04 | 73,50 |
| EB (MJ/kgMS) | 18,6  | 16,2   | 17,0   | 16,6  | 17,5  |

\*MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: Proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; HEM: hemicelulose; CNF: carboidrato não fibroso; EB: energia bruta.

#### 6.2.2 Ensaio de digestibilidade e análises bromatológicas.

Para determinar os coeficientes de digestibilidade foi usada a metodologia de coleta total das fezes realizada a cada 3 horas das 6:00 h às 18:00 h. A cada coleta as fezes foram pesadas, colocadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas a 20°C negativos para análises futuras. No momento da oferta da dieta, amostras dos alimentos foram coletadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas a 20°C negativos para análises futuras.

Diariamente, sobras da alimentação eram retiradas às 14:30 h, identificadas e armazenadas a 20°C negativos para análises futuras. O consumo alimentar foi calculado diariamente por meio da diferença entre a quantidade fornecida e as sobras de cada item alimentar. Foi calculada a perda de umidade para o cálculo do consumo ao colocar a dieta em comedouro fora das gaiolas. Ao final do experimento, todo material coletado foi liofilizado, moído em moinho de bola e armazenado a 20° negativos para posterior análise.

As análises bromatológicas de frutas, batata-doce, ração e fezes foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LabNut) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) conforme metodologia descrita por Detmann *et al.* (2012). Foram determinados os seguintes nutrientes: matéria seca (MS), matéria orgânica (MO); proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), carboidrato não fibroso (CNF) e hemicelulose (HC). O cálculo do carboidrato não fibroso foi realizado utilizando a fórmula descrita por Detmann e Valadares Filho (2010). Também foi analisada a energia bruta (EB) dos alimentos e das fezes utilizando bomba calorimétrica (C-200 -Ika®).

Com os dados da análise bromatológica dos alimentos e das fezes, do consumo dos alimentos e das fezes produzidas foram determinados os coeficientes de digestibilidade (CD) dos nutrientes e da energia bruta, nos diferentes tratamentos descritos anteriormente, utilizando a fórmula direta (Andriguetto *et al.*, 2002):

$$CD\% : \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado nas fezes (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

### 6.2.3 Análise estatística

Os valores do coeficiente de digestibilidade e consumo dos nutrientes foram comparados através da análise por variância (ANOVA), considerando-se os animais e as fases experimentais como efeito randômico e os tratamentos como efeito fixo, seguidos por teste post-hoc de Tukey, quando apropriado. Para essa análise foi usado o programa R, versão 3.4.1, (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria; <http://www.r-project.org>), considerando o nível de significância  $P < 0,05$ .

## 6.3 RESULTADOS

Ao longo de todas as fases experimentais as sobras de alimentos variaram de acordo com os ingredientes ( $X^2=79,82$ ,  $P < 0,0001$ ) com médias ( $\pm$  desvio padrão) de 45,44 ( $\pm 19,24$ ) g/dia de ração peletizada; 10,13 ( $\pm 9,42$ ) g/dia de batata doce; 7,76 ( $\pm 13,20$ ) g/dia de manga e

10,70 ( $\pm 12,00$ ) g/dia de banana. Mesmo no dia da aplicação dos tratamentos, as proporções de sobras foram similares com médias de 46,71 ( $\pm 19,03$ ) g/dia para ração, 8,64 ( $\pm 13,88$ ) g/dia de batata doce, 5,44 ( $\pm 10,74$ ) g/dia de manga e 11,30 ( $\pm 12,58$ ) g/dia de banana. O modelo estatístico não mostrou efeito dos tratamentos sobre o consumo alimentar da matéria seca (MS) e dos demais nutrientes da dieta (Tab. 2). Também não houve efeito das pacas sobre o consumo de nenhum nutriente estudado ( $P > 0,05$ ). As pacas apresentaram um consumo médio de 116,61 ( $\pm 3,24$ ) g/dia de MS o que equivale a 1,67 ( $\pm 0,05$ ) % de sua massa corporal. Adicionalmente, esse consumo de matéria seca resultou no consumo médio diário de 182,74 ( $\pm 18,25$ ) mg de nitrogênio digestível (N digestível) por kg de peso metabólico ( $\text{kg PM} = \text{kg}^{0,75}$ ) e de 391,44 ( $\pm 13,69$ ) kJ/kg PM.

Tabela 2. Consumo diário (média.  $\pm$  DP) dos nutrientes, base de matéria seca em pacas.

| Itens   | Tratamentos         |                    |                   |                   |      |      |
|---------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------|------|
|         | SM1                 | SS1                | ACTHb1            | ACTHa1            | F    | P2   |
| MS (g)  | 119,714 $\pm$ 13,31 | 111,38 $\pm$ 12,13 | 118,85 $\pm$ 6,42 | 116,49 $\pm$ 5,54 | 1,36 | 0,43 |
| MO (g)  | 113,93 $\pm$ 12,56  | 106,17 $\pm$ 11,32 | 113,25 $\pm$ 6,45 | 111,09 $\pm$ 5,35 | 0,56 | 0,66 |
| PB (g)  | 9,29 $\pm$ 2,35     | 8,13 $\pm$ 1,29    | 9,02 $\pm$ 1,40   | 8,55 $\pm$ 1,47   | 0,54 | 0,67 |
| EE (g)  | 2,90 $\pm$ 0,41     | 2,64 $\pm$ 0,22    | 2,92 $\pm$ 0,23   | 2,86 $\pm$ 0,12   | 1,34 | 0,35 |
| EB (MJ) | 2,02 $\pm$ 0,23     | 1,88 $\pm$ 0,21    | 2,02 $\pm$ 0,10   | 1,98 $\pm$ 0,11   | 0,59 | 0,64 |
| FDN (g) | 13,98 $\pm$ 2,35    | 12,76 $\pm$ 1,95   | 13,81 $\pm$ 0,85  | 13,38 $\pm$ 1,05  | 0,51 | 0,69 |
| FDA (g) | 5,60 $\pm$ 0,60     | 5,23 $\pm$ 0,53    | 5,56 $\pm$ 0,31   | 5,46 $\pm$ 0,25   | 0,55 | 0,67 |
| CNF (g) | 88,78 $\pm$ 7,47    | 83,65 $\pm$ 8,33   | 88,54 $\pm$ 5,03  | 87,37 $\pm$ 3,91  | 0,56 | 0,66 |

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; EB: energia bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CNF: carboidrato não fibroso; SM: sem manejo; SS: solução salina; ACTHb: ACTH baixo; ACTHa: ACTH alto.

<sup>1</sup>Média e desvio padrão das médias, onde n = 4 por tratamento.

<sup>2</sup>Nível de significância ( $P < 0,05$ ).

Tabela 3. Coeficiente de digestibilidade dos nutrientes e energia bruta em pacas.

| Variável (%) | Tratamentos       |                  |                    |                    |      |                |
|--------------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|------|----------------|
|              | SM <sup>1</sup>   | SS <sup>1</sup>  | ACTHb <sup>1</sup> | ACTHa <sup>1</sup> | F    | P <sup>2</sup> |
| CDMS         | 87,81 $\pm$ 3,76  | 87,88 $\pm$ 1,27 | 88,39 $\pm$ 1,78   | 87,44 $\pm$ 2,98   | 0,18 | 0,908          |
| CDMO         | 88,59 $\pm$ 3,41  | 88,75 $\pm$ 1,26 | 89,28 $\pm$ 1,68   | 88,42 $\pm$ 2,61   | 0,18 | 0,902          |
| CDPB         | 59,2 $\pm$ 12,16  | 54,84 $\pm$ 4,02 | 58,83 $\pm$ 8,62   | 51,46 $\pm$ 18,08  | 1,60 | 0,285          |
| CDEE         | 67,03 $\pm$ 4,75  | 67,98 $\pm$ 5,9  | 65,75 $\pm$ 10,1   | 68,48 $\pm$ 10,8   | 0,83 | 0,524          |
| CDEB         | 85,5 $\pm$ 3,95   | 84,62 $\pm$ 2,81 | 86,09 $\pm$ 2,28   | 85,43 $\pm$ 3,35   | 0,31 | 0,819          |
| CDFDN        | 66,07 $\pm$ 9,08  | 64,38 $\pm$ 3,92 | 66,15 $\pm$ 1,96   | 64,54 $\pm$ 7,04   | 0,33 | 0,806          |
| CDFDA        | 53,67 $\pm$ 14,51 | 55,99 $\pm$ 6,87 | 57,91 $\pm$ 3,23   | 54,74 $\pm$ 10,57  | 0,51 | 0,687          |
| CDCNF        | 96,02 $\pm$ 1,39  | 96,55 $\pm$ 0,46 | 96,86 $\pm$ 0,85   | 96,38 $\pm$ 0,77   | 0,54 | 0,671          |

CDMS = Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca; CDMO = Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria orgânica; CDPB = Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta; CDEE = Coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo; CDEB = Coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta; CDFDN = Coeficiente de digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro; CDFDA = Coeficiente de digestibilidade aparente da fibra em detergente ácido; CDCNF = Coeficiente de digestibilidade aparente do carboidrato não fibroso; SM: sem manejo; SS: solução salina; ACTHb: ACTH baixo; ACTHa: ACTH alto.

<sup>1</sup>Média e desvio padrão das médias, onde n = 4 por tratamento.

<sup>2</sup>Nível de significância ( $P < 0,05$ ).

O modelo estatístico não mostrou o efeito dos tratamentos sobre os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes (Tab. 3). Verificou-se o efeito dos indivíduos sobre os coeficientes de digestibilidade da proteína bruta (CDPB) ( $F=7,87$ ,  $P=0,02$ ), extrato etéreo (CDEE) ( $F=30,73$ ,  $P<0,001$ ), FDN (CDFDN) ( $F=5,52$ ,  $P=0,04$ ) e FDA (CDFDN) ( $F=7,59$ ,  $P=0,02$ ). O teste *post hoc* de Tukey mostrou que, independente do tratamento, a paca 4 apresentou os maiores médias de coeficientes de digestibilidade para PB, FDN e FDA (Fig. 1).

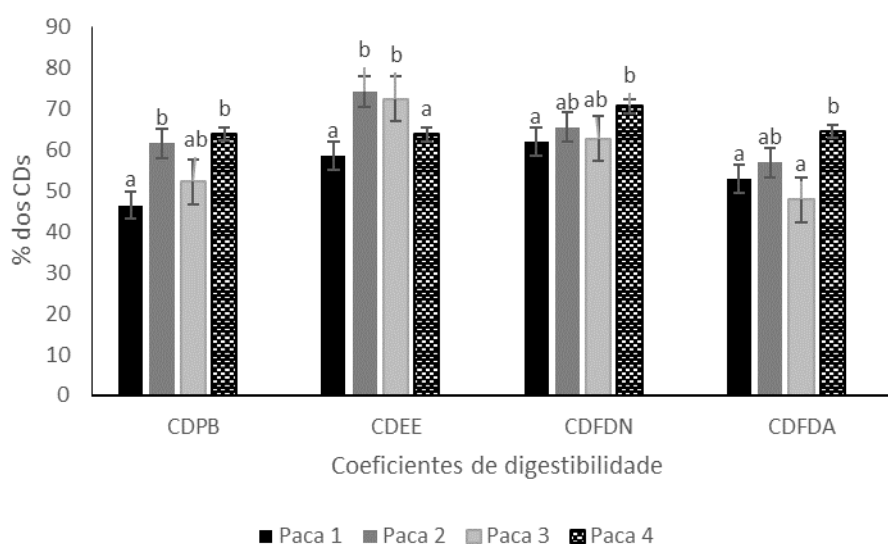


Figura 1. Efeito das pacas sobre a média ( $\pm$ erro padrão) do coeficiente de digestibilidade de quatro nutrientes. CDs: coeficientes de digestibilidade; CDPB: coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEE: coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDFDN: coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CDFDA: coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido. Diferenças significativas entre os coeficientes de digestibilidade são identificadas com letras diferentes (a-b).

## 6.4 DISCUSSÃO

Independente dos tratamentos, não houve variação no consumo alimentar ao longo dos dias do estudo e tampouco houve registro de variação nas quantidades de sobras alimentares. Registrou-se para as pacas, contudo, um consumo de matéria seca equivalente a apenas 1,7 % de sua massa corporal. Animais adultos, em geral, apresentam consumo de matéria seca em torno de 3,5% de seu peso (Andriguetto *et al.*, 2002). As pacas apresentaram, portanto, um

consumo relativo equivalente à metade do que era esperado. Esse baixo consumo de matéria seca resultou em consumo diário de 182,74 ( $\pm 18,25$ ) mg de N digestível por kg de peso metabólico (PM) abaixo, portanto, do exigido para a manutenção da espécie (280,5 mg N/kgPM, Nogueira-Filho *et al.*, 2016). O consumo diário de 391,44 ( $\pm 13,69$ ) kJ/kg PM de energia digestível atendeu o mínimo exigido pela espécie (295 kJ/kg PM, Nogueira-Filho *et al.*, 2016). Altino *et al.* (2018), aplicaram ACTH ou solução salina tendo como controle pacas sem manejo e registraram que as pacas passaram menos tempo se alimentando no dia de aplicação dos tratamentos (*challenge day*), mas nos dias subsequentes o tempo de consumo voltou aos níveis de pré-tratamento.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a sugestão de que o menor tempo em atividades da alimentação é um indicativo de estresse para a paca (Altino *et al.*, 2018). O consumo alimentar não foi alterado mesmo quando os animais passaram pelo tratamento sem manejo, que foi usado para verificar os efeitos captura/contenção/aplicação de injeções. Dessa forma, caso os animais sejam mantidos sob estresse crônico devido a condições de bem-estar empobrecido, eles podem apresentar consumo alimentar abaixo do necessário para atender suas exigências nutricionais (Dallman, 2010; Ely *et al.*, 1997). Esses resultados também mostram que práticas de manejo que envolvam captura/contenção de pacas devem ser reduzidas ao máximo, uma vez que mesmo animais não manejados sofreram os efeitos dessas atividades.

O processo de empatia pode explicar o comportamento das pacas quando receberam o tratamento controle no qual não foram capturadas/contidas. A empatia reflete a capacidade de um animal experimentar os sentimentos de outro (Panksepp e Panksepp, 2013). O medo é uma resposta biológica ao perigo que pode ser adquirida pela observação de co-específicos em situação de perigo, o que foi registrado em primatas humanos e não humanos (Adolphs, 2003; Olsson *et al.*, 2007; Olsson e Phelps, 2007) e também em roedores (Chen *et al.*, 2009; Bartal *et al.*, 2011). Dessa forma, pode-se sugerir que o medo provocado pela captura/contenção dos animais vizinhos provocou resposta comportamental similar de redução no consumo alimentar da paca que não foi manejada naquela fase experimental.

As médias dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca ( $87,88 \pm 0,34\%$ ), proteína bruta ( $56,08 (\pm 3,17\%)$ ), da fibra alimentar (FDN= $65,29 \pm 0,83\%$  e FDA= $55,58 \pm 1,58\%$ ) e da energia bruta ( $85,41 \pm 0,52$ ) registradas no presente estudo foram maiores do que determinadas anteriormente para a espécie por Monteiro (2014) e Mattos (2015). Era esperado,

contudo, que o estresse provocasse diminuição na digestibilidade dos nutrientes (Squires, 2003). Por outro lado, o estresse afetou de forma uniforme o consumo alimentar de todos os animais, inclusive dos que não foram manejados, pelo processo de empatia, como comentado anteriormente. Sabe-se que com a redução no consumo alimentar provoca a redução na taxa de passagem do alimento no trato digestório e melhora no aproveitamento dos nutrientes (Andriguetto *et al.*, 2002). Dessa forma, a redução uniforme do consumo, independente do tratamento, pode explicar os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes e da energia comparativamente mais elevados no presente estudo. Adicionalmente, observou-se o efeito do indivíduo nos coeficientes de digestibilidade. Para evitar que um maior número de animais passasse por estresse, foi empregado o delineamento quadrado latino. A possibilidade de não se encontrar diferenças entre os tratamentos aumenta em amostras pequenas (Erro Tipo II).

Ao longo do estudo, as pacas consumiram em média menos da metade da ração fornecida (48,20%), enquanto os demais ingredientes mais ricos em carboidratos não fibrosos (Tab. 1), portanto mais ricos em açúcares, foram quase que totalmente consumidos (91,60% da batata doce, 96,12% da manga e 89,30% da banana). Altino *et al.* (2018), observando o comportamento dos animais usados no presente estudo, registraram que independente dos tratamentos as pacas passaram menos tempo se alimentando no dia de aplicação dos tratamentos (*challenge day*), mas nos dias subsequentes o tempo de consumo voltou aos níveis pré-tratamentos. Dallman (2010) em uma vasta revisão de literatura sobre o efeito do estresse observou que os indivíduos podem tanto manter quanto aumentar ou diminuir o seu consumo alimentar, mas quando há possibilidade de escolha, os animais tendem a escolher alimentos mais palatáveis ou prazerosos. Esse fato explica o menor consumo de ração peletizada em relação aos demais ingredientes da dieta registrados no presente estudo. Portanto, os resultados obtidos corroboram com a sugestão de que o menor tempo em atividades da alimentação é um indicativo de estresse para a paca (Altino *et al.*, 2018). Adicionalmente, verificou-se que o estresse provoca seletividade alimentar por alimentos mais ricos em açúcares, mas mais pobres em proteína. Usualmente, nas criações de pacas os produtores fornecem ração peletizada de coelho e diversos ingredientes, como mandioca, batata doce e frutas da estação (Nogueira-Filho e Nogueira, 1999). Dessa forma, caso as pacas nessas criações sejam mantidas em condições de estresse crônico, podem apresentar consumo seletivo de alimentos que pode levar ao desbalanço energético/proteico, como verificado no presente estudo. A longo prazo, o consumo de alimentos calóricos e pobres em proteína causarão prejuízos à saúde dos animais, como obesidade (Dallman, 2010), afetando a produtividade da criação.



## 6.5 CONCLUSÃO

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas no consumo de MS e na digestibilidade dos nutrientes nos diferentes tratamentos, observamos que o consumo médio diário de N digestível de todas as pacas, independente do tratamento aplicado, foi abaixo do exigido para a manutenção. Contudo, o consumo médio da energia bruta atendeu as exigências recomendadas. É possível que esse desbalanço energético/proteico tenha sido provado pelo manejo de aplicação da injeção, nas pacas que receberam ACTH e solução salina, e pelo medo provocado nas pacas ao ver as outras sendo capturadas, caracterizando a existência do processo de empatia pela espécie estudada. Desse modo, podemos dizer que o estresse das pacas em cativeiro pode, a longo prazo, diminuir o ganho de peso dos animais e por isso, deve-se evitar ao máximo manejos desnecessários nos criadouros de pacas.

## REFERÊNCIAS

- ADOLPHS, R. Cognitive neuroscience of human social behavior. *Nat. Rev. Neurosci*, v.4, p.165–178, 2003.
- ANDRIGUETTO, J.M. *et al. Nutrição Animal: As bases e os fundamentos da nutrição animal. Os alimentos. Vol 1.* São Paulo: Nobel, 2002.
- BARTAL, I. B.A.; DECETY, J.; MASON, P. Empathy and pro-social behavior in rats. *Science*, v.334, n.6061, p.1427–1430, 2011.
- BROWNIE, A.C. The metabolism of adrenal cortical steroids. In: JAMES, W. H. T. (Ed.). . *The metabolism of adrenal cortical steroids*. New York: Raven Press, 1992. p.209–224.
- CHEN, Q.; PANKSEPP, J.B.; LAHVIS, G.P. Empathy is moderated by genetic background in mice. *PLoS One*, v.4, n.2, p.e4387, 2009.
- DALLMAN, M.F. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends in endocrinology and metabolism*, v.21, n.3, p.159–165, 2010.
- DETMANN, E. *et al. Métodos para análise de alimentos.* Visconde do Rio Branco- MG: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal: Suprema, 2012.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v.62, n.4, p.980–984, 2010.
- ELY, D.R. *et al.* Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology & Behavior*, v.61, n.3, p.395–398, 1997.
- GOWER, D.B. Biochemistry of Steroid Hormones. In: MAKIN, H. L. J. (Ed.). Biosynthesis of the corticoids. 1st. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975. p.47–75.
- HEISTERMANN, M.; PALME, R.; GANSWINDT, A. Response to novel food and the role of social influences in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) and Goeldi's Monkeys (*Callimico goeldii*). *American Journal of Primatology*, v.68, n.11, p.257–273, 2006.
- LANE, J. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals. *Animal Welfare*, v.15, p.331–342, 2006.

LASKA, M.; LUNA BALTAZAR, J.M.; RODRIGUEZ LUNA, E. Food preferences and nutrient composition in captive pacas, *Agouti paca* (Rodentia, Dasyproctidae). *Mammalian Biology*, v.68, n.1, p.31–41, 2003.

MATTOS, A. J.S.S. *Uso de alimentos alternativos na criação da paca (Cuniculus paca)*. [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz, 2015.

MONTEIRO, M.S. *Coeficientes de digestibilidade de nutrientes de alimentos usados na criação de paca (Cuniculus paca)*. [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014.

NOGUEIRA-FILHO, S L.G. *et al.* Protein requirements of finishing paca (Cuniculus paca). *Tropical Animal Health and Production*, v.48, n.5, p.1005–1011, 2016.

NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; NOGUEIRA, S. S. *Criação De Pacas (Agouti Paca)*. 1. Ed ed. Piracicaba, São Paulo: FEALQ, 1999.

OLSSON, A.; NEARING, K.I.; PHELPS, E.A. Learning fears by observing others: The neural systems of social fear transmission. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, v.2, n.1, p.3–11, 2007.

OLSSON, A.; PHELPS, E.A. Social learning of fear. *Nature Neuroscience*, v.10, n.9, p.1095–1102, 2007.

PANKSEPP, J.; PANKSEPP, J.B. Toward a cross-species understanding of empathy. *Trends in neurosciences*, v.36, n.8, p.489–96, 2013.

PUVADOLPIROD, S.; THAXTON, J.P. Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and Metabolism. *Poultry Science*, v.79, n. September, p.391–395, 2000.

REEDER, D.M.; KRAMER, K.M. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy*, v.86, n.2, p.225–235, 2005.

SAPOLSKY, R.M. Endocrinology of the stress-response. In: BECKER, J.B. *et al.* (Eds.). . *Endocrinology of the stress-response*. 2nd. ed. Cambridge: MIT Press., 2002. p.409–450.

SQUIRES, E.J. *Applied animal endocrinology*. 1st. ed. Wallingford, UK: Squires, Eli James, 2003.

THUN, R.; SCHWARTZ-PORSCHKE, D. Nebennierenrinde. In: DÖCKE, F. (Ed.). .

*Nebennierenrinde*. 1st. ed. Jena Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag, 1994. p.309–356.

WASSER, S.K. *et al.* A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*, v.120, n.3, p.260–275, 2000.

WHITTEN, P.L.; BROCKMAN, D.K.; STAVISKY, R.C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. *American journal of physical anthropology*, v.Suppl 27, p.1–23, 1998.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Verificou-se que é possível medir a concentração de metabólitos de glicocorticoides nas fezes de pacas por meio de imunoensaio enzimático utilizando anticorpo para cortisol. Sendo assim, esta técnica foi validada e pode ser usada como ferramenta para monitorar o estresse de pacas criadas em cativeiro. Além disso, foi observado que o estresse agudo, provocado pela aplicação de ACTH alto, alterou o tempo gasto com inatividade e alimentação. Animais que foram submetidos ao tratamento com ACTH alto gastaram mais tempo com a categoria comportamental inativo e menos tempo com alimentação em comparação com animais que receberam outros tratamentos. A inatividade e a diminuição do tempo gasto com alimentação pode ser um indicador de que pacas criadas em cativeiro estão sofrendo distresse.

Adicionalmente, apesar de não ter havido diferenças de consumo e digestibilidade entre os tratamentos, observou-se que a média de ingestão de N digestível e energia bruta nos animais do experimento foi menor que a recomendação relatada na literatura, indicando que todas as pacas estavam sob estresse, mesmo aquelas que não receberam ACTH, provavelmente devido ao processo de empatia de uma paca ao ver a outra sendo manejada.

## REFERÊNCIAS

AQUINO, R.; GIL, D.; PEZO, E. Ecological aspects and hunting sustainability of paca (*Cuniculus paca*) in the Itaya river basin, Peruvian Amazonia. **Revista Peruana de Biología**, v. 16, n. 1, p. 67–72, 2009.

AUGUSTO, C; GONZÁLEZ, A; RIOS, V. Guía para el manejo, cría y conservación de La “paca” o “Conejo pintado” (*Agouti paca*). Bogotá : Convenio Andrés Bello, 2a. ed., 2002.

BECK-KING, H.; HELVERSEN, O. VON; BECK-KING, R. Home Range, Population Density, and Food Resources of Agouti paca (Rodentia: Agoutidae) in Costa Rica: A Study Using Alternative Methods. **BIOTROPICA**, v. 31, n. 4, p. 675–685, 1999.

BOTELLO, F. et al. Nuevos registros del “tepezcuinle” (*Agouti paca*) para el norte del estado de Oaxaca, México. **Revista Mexicana de la Biodiversidad**, v. 76, p. 103–105, 2005.

BROOM, D. M. A History of Animal Welfare Science. **Acta Biotheoretica**, v. 59, n. 2, p. 121–137, 2011.

BROWN-UDDENBERG, R. C. L.; G. GARCIA; Q. BAPTISTE; T. COUNAND; A. ADOGWA; T. SAMPSON. The Agouti [*Dasyprocta leporine*, *D. aguti*] Booklet and Production Manual. St Augustine, Trinidad: GWG Publications, 2004.

COLLET, S. . Population characteristics of the Agouti paca (Rodentia) in Colombia. **Biological Series**, p. 485–602, 1981.

CORADELLO, M. A. et al. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay for collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 2, p. 275–282, 2012.

CORBET, G. B.; HILL, J. E. **A world list of mammalian species**. 3nd. ed. London: Oxford University Press, Oxford, 1991.

DAWKINS, M. S. et al. Time course of changes in egg-shell quality, faecal corticosteroids and behaviour as welfare measure in laying hens. **Animal Welfare**, v. 13, p. 321–327, 2004.

DAWKINS, M. S. The Science of Animal Suffering. **Ethology**, v. 114, p. 937–945, 2008.

DUBOST, G.; HENRY, O. Comparison of Diets of the Acouchy , Agouti and Paca , the Three Largest Terrestrial Rodents of French Guianan Forests Author (s): Gérard Dubost and Olivier Henry Published by : Cambridge University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4092125>. v. 22, n. 6, p. 641–651, 2016.

BOTELLO EISENBERG, J. F. REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics the central neotropics**. Chicago: University of Chicago Press, 1999

EMMONS, L. *Cuniculus paca*, Spotted Paca. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**, v. 8235, 2016.

EMMONS, L. H. feeding ecology of felids Comparative in a neotropical rainforest. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 20, n. 4, p. 271–283, 1987.

EMMONS, L. H. Cavylike Rodents (Suborder Caviomorpha). In: **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. London: Chicago, The University of, p. 196–205, 1990.

FIGUEROA-DE LEÓN, A. et al. Revista Mexicana de Biodiversidad. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 78, p. 459–482, 2016.

GOMES, C.; KARAM, L. B.; MACEDO, R. E. F. Atributos de qualidade da carne de paca (*Agouti paca*): Perfil sensorial e força de cisalhamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 559–565, 2013.

GONZÁLEZ, V.; AUGUSTO, C. **Guía para el manejo, cría y conservación de La “paca” o “Conejo pintado” (*Agouti paca*)**. Convenio Andrés Bello, 2002

GOYMANN, W. et al. Noninvasive Fecal Monitoring of Glucocorticoids in Spotted Hyenas , *Crocuta crocuta* Noninvasive Fecal Monitoring of Glucocorticoids in Spotted Hyenas , *Crocuta crocuta*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 348, n. October 2015, p. 340–348, 1999.

GUIMARÃES, D. A. DE A. et al. Características reprodutivas da paca fêmea (*Agouti paca*) criada em cativeiro. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 531–538, 2008.

HARGADEN, M.; SINGER, L. Anatomy, Physiology, and Behavior. In: SUCKOW, M. A.; STEVENS, K. A.; WILSON, R. . (Eds.). . **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**. Suckow, M. ed. San Diego, USA: Elsevier Inc, p. 575–602, 2012.

HIRAKAWA, H. I. R. Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. **Mammal Society**, v. 31, n. 1, p. 61–80, 2001.

JAKUBOWSKA, I.; RETTENBACHER, S.; VAN DEN HOVEN, R. Faecal cortisol metabolite excretion and stress in Standardbred Trotters under field conditions and during treadmill training. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 97, n. 1–2, p. 31–36, 2010.

KJAER, J. B. et al. Reducing stress during welfare inspection: Validation of a non-intrusive version of the laywel plumage scoring system for laying hens. **British Poultry Science**, v. 52, n. 2, p. 37–41, 2011.

LEXEN, E. et al. Monitoring the adrenocortical response to disturbances in sheep by measuring glucocorticoid metabolites in the faeces. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 95, n. 3–4, p. 64–71, 2008.

LIMA, S. G. C. et al. Vocal complexity and sociality in spotted paca (*Cuniculus paca*). **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018.

LOBÃO, É. DE S. P.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. **Human-wildlife Conflicts in the Brazilian Atlantic Forest**. Newsletter of the WPSG. **Anais**. 2011. Disponível em: <<http://iucn.org/themes/ssc/sgs/pphsg/home.htm>>

LYNCH, J. W.; ZIEGLER, T. E.; STRIER, K. B. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigratus*. **Hormones and Behavior**, v. 41, n. 3, p. 275–287, 2002.

MALMKVIST, J.; JEPPESEN, L. L.; PALME, R. Stress and stereotypic behaviour in mink

(*Mustela vison*): A focus on adrenocortical activity. **Stress**, v. 14, n. 3, p. 312–323, 2011.

MATAMOROS, Y. Notas sobre la biología del Tepezcuinte, *Cuniculus paca*, Brisson (Rodentia, Dasyproctidae) en cautiverio. **Brenesia**, n. San Jose, p. 19–82, 1982.

MATTOS, A. J. S. S. **Uso de alimentos alternativos na criação da paca (*Cuniculus paca*)**. [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz, 2015.

MAYOR, P.; GUIMARÃES, D. A.; LÓPEZ, C. Functional morphology of the genital organs in the wild paca (*Cuniculus paca*) female. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 3–4, p. 206–215, 2013.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: Considerations for application and interpretation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 189–199, 2004.

MONDOLFI, E. La laca o paca. **Defensa de la naturaleza**, v. 5, p. 4–16, 1972.

MONTES, R. El tepezcuintle, un recurso biológico importante. **Biodiversitas**, v. 63, p. 6–11, 2005.

MÖSTL, E. et al. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 46, n. 10, p. 621–631, 1999.

MÜLLEDER, C. et al. Individual differences in behaviour and in adrenocortical activity in beef-suckler cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 84, n. 3, p. 167–183, 2003.

NIMON, A. J.; BROOM, D. M. The Welfare of Farmed Foxes *Vulpes Vulpes* and *Alopex la Gopus* in Relation to Housing and Management: A Review. **Animal Welfare**, v. 10, p. 223–248, 2001.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G. et al. Protein requirements of finishing paca (*Cuniculus paca*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 5, p. 1005–1011, 2016.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. . **Criação De Pacas (*Agouti Paca*)**. 1. Ed ed. Piracicaba, São Paulo: FEALQ, 1999.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. DA C. Criação comercial de animais silvestres: produção e comercialização da carne e de subprodutos na região sudeste do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 31, n. 2, p. 188–195, 2000.

NOGUEIRA, S. S. C. et al. Effects of varying feed provision on behavioral patterns of farmed collared peccary (Mammalia , Tayassuidae ). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 132, n. 3–4, p. 193–199, 2011.

NOGUEIRA, T. M. R.; TONIOLLO, G. H.; GIANNONI, M. L. Estrous Cycle Colpocytology in Captive Pacas. v. 21, p. 209–214, 2005.

PALME, R. et al. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. **Wien Tierärztl Mschr**, v. 86, p. 237–241, 1999.

PEREZ-TORRES, J. **Guia para el manejo y cria de la “paca” (*Agouti paca*)**. Santafe de



Bogotá, Colombia, Colombia: Editora Guadalupe Ltda, 1996.

PÉREZ, E. **American Society of Mammalogists 84th Annual Meeting Mammalian Species**, 1992. Disponível em: <<http://www.science.smith.edu/msi/>>

REDFORD, K. H.; ROBINSON, J. G. Subsistence and commercial uses of wildlife in Latino America. In: **Neotropical wildlife use and conservation**. University ed. Chicago: University of Chicago Press, p. 538, 1991.

RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. **Partition and absorption of volatile fatty acids in the alimentary canal of the rat**. Annales de Recherches Vétérinaires. **Anais.INRA**, 1976

RETTENBACHER, S. et al. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. **British Poultry Science**, v. 45, n. 5, p. 704–711, 2004.

RIBEIRO, V. M. F. et al. Synchronization of estrus in paca (*Cuniculus paca* L.): possible impacts on reproductive and productive parameters. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 27–35, 2017.

SABATINI, V.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Etograma pacas em cativeiro. **Revista de Etologia**, v. 3, n. 1, p. 3–14, 2001.

SAPOLSKY, R. M. Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: Role of negative feedback sensitivity. **Endocrinology**, v. 113, n. 6, p. 2263–2267, 1983.

SAPOLSKY, R. M. Endocrinology of the stress-response. In: BECKER, J. B. et al. (Eds.). . **Endocrinology of the stress-response**. 2nd. ed. Cambridge: MIT Press., p. 409–450, 2002.

SILVA, F. **Ordem Rodentia: mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul** Porto Alegre Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, , 1984.

SMYTHE, N. The paca (*Cuniculus paca*) as a domestic source of protein for the neotropical, humid lowlands. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 17, n. 1–2, p. 155–170, 1987.

SMYTHE, N.; BROWN DE GUANTI, O. **La domesticación y cría de la paca (Agouti paca**. Roma: FAO, 1995.

SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology**. 1st. ed. Wallingford, UK: Squires, Eli James, 2003.

TOUMA, C.; PALME, R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 0, p. 54–74, 2005.

WASSER, S. K.; BEVIS, K.; HANSON, E. Noninvasive Physiological Measures of Disturbance in the Northern Spotted Owl. **Conservation biology : the journal of the socie**, v. 11, n. 4, p. 1019, 1997.

WHITTEN, P. L.; BROCKMAN, D. K.; STAVISKY, R. C. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American journal of physical anthropology**, v. Suppl 27, p. 1–23, 1998.

WILSON, D. E.; REEDER, D. A. . **Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005

ZUCARATTO, R.; CARRARA, R.; SIQUEIRA, B. K. Dieta da paca (*Cuniculus paca*) usando métodos indiretos numa área de cultura agrícola na Floresta Atlântica brasileira. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 235–239, 2010.

## ANEXO I

Comprovante de Aceite do artigo de revisão intitulado “Monitoramento não invasivo do estresse em animais silvestres mantidos em cativeiro” submetido à Revista Brasileira de Zoociências.



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE JUIZ DE FORA



COORDENAÇÃO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MARTELOS - JUIZ DE FORA - MG CEP:  
36.036-330 – FONE/FAX: (32) 2102 - 3223  
e-mail: [mestrado.comportamento@ufjf.edu.br](mailto:mestrado.comportamento@ufjf.edu.br)  
site : <http://www.ufjf.br/c.comportamento>

Juiz de Fora, 06 de março de 2018.

### ***REVISTA BRASILEIRA DE ZOOCIÊNCIAS***

Prezado Pesquisador: SERGIO LUIZ GAMA NOGUEIRA-FILHO, VANESSA SOUZA ALTINO & SELENE SIQUEIRA DA CUNHA NOGUEIRA

Informamos que o trabalho de sua autoria intitulado “Monitoramento não invasivo do estresse em animais silvestres mantidos em cativeiro” foi aceito para publicação na Revista Brasileira de ZOOCIÊNCIAS, no *Volume 19*, N. 2, Edição Especial de Bem-estar Animal, de maio de 2018.

Atenciosamente,

**Profa. Dra. Sônia Sin Singer Brugiolo**  
**Editora Chefe**  
**Revista Brasileira de Zoociências**

## ANEXO II

Regras da revista a qual o Artigo Científico I será submetido.



## APPLIED ANIMAL BEHAVIOUR SCIENCE

An international journal reporting on the application of ethology to animals managed by humans.

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

|   |                                 |            |
|---|---------------------------------|------------|
| • | <b>Description</b>              | <b>p.1</b> |
| • | <b>Audience</b>                 | <b>p.1</b> |
| • | <b>Impact Factor</b>            | <b>p.1</b> |
| • | <b>Abstracting and Indexing</b> | <b>p.2</b> |
| • | <b>Editorial Board</b>          | <b>p.2</b> |
| • | <b>Guide for Authors</b>        | <b>p.4</b> |



ISSN: 0168-1591

#### DESCRIPTION

This journal publishes relevant information on the **behaviour** of **domesticated** and **utilized animals**.

Topics covered include: Behaviour of farm, **zoo** and laboratory animals in relation to **animal management** and **welfare** Behaviour of **companion animals** in relation to **behavioural problems**, for example, in relation to the training of dogs for different purposes, in relation to behavioural problems Studies of the behaviour of **wild animals** when these studies are relevant from an applied perspective, for example in relation to **wildlife management**, pest management or nature **conservation** Methodological studies within relevant fields

The principal subjects are **farm**, companion and **laboratory animals**, including, of course, poultry. The journal also deals with the following animal subjects: Those involved in any farming system, e.g. deer, rabbits and fur-bearing animals Those in ANY form of confinement, e.g. zoos, safari parks and other forms of display Feral animals, and any animal species which impinge on farming operations, e.g. as causes of loss or damage Species used for hunting, recreation etc. may also be considered as acceptable subjects in some instances Laboratory animals, if the material relates to their behavioural requirements

#### AUDIENCE

Animal Ethologists, Animal Scientists, Zoologists.

#### IMPACT FACTOR.

2016: 1.771 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

---

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

PsycINFO  
 Biological Abstracts  
 Current Awareness in Biological Sciences  
 AGRICOLA  
 Animal Behaviour Abstracts  
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
 Index Veterinarius  
 Veterinary Bulletin  
 Agricultural Engineering Abstracts  
 Ecology Abstracts  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editors-in-Chief*

**Sylvie Cloutier**, Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario, Canada  
**Per Jensen**, Department of Biology, IFM, Linköping University, Linköping, Sweden

### *Reviews Editors*

**Mark Farnworth**, Plymouth University, Plymouth, UK  
**Bas Rodenburg**, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

### *Book Review Editor*

**Mike Mendl**, University of Bristol, UK

### *Editorial Advisory Board*

**Marta Alonso**, León, Spain  
**Mike Appleby**, London, UK  
**Harry Blokhuis**, Uppsala, Sweden  
**Oliver Burman**, Lincoln, UK  
**Greg Cronin**, Camden, NSW, Australia  
**John Eddison**, Plymouth, UK  
**Sandra Edwards**, Newcastle-upon-Tyne, UK  
**Hans Erhard**, Paris, France  
**Inma Estevez**, Vitoria-Gasteiz, Spain  
**Anders Fernö**, Bergen, Norway  
**Andrew Fisher**, Melbourne, VIC, Australia  
**Raf Freire**, Wagga Wagga, NSW, Australia  
**Peter Goddard**, Aberdeen, Scotland, UK  
**Gisela Kaplan**, Armidale, NSW, Australia  
**Larry Katz**, New Brunswick, NJ, USA  
**Joergen Kjaer**, Celle, Germany  
**Seiji Kondo**, Sapporo, Japan  
**Erin Leone**, Gainesville, FL, USA  
**Georgia Mason**, Guelph, Ontario, Canada  
**Sebastian McBride**, Aberystwyth, UK  
**Ádám Miklósi**, Budapest, Hungary  
**Heath Nevill**, San Antonio, TX, USA  
**Cheryl O'Connor**, Hamilton, New Zealand  
**Brian Paterson**, Brisbane, QLD, Australia  
**Neville Pillay**, Johannesburg, South Africa  
**Péter Pongrácz**, Budapest, Hungary  
**Lesley Rogers**, Armidale, NSW, Australia  
**Mark Rutter**, Newport, UK  
**Matthijs Schilder**, Utrecht, The Netherlands  
**Lynne Sneddon**, Liverpool, England, UK  
**Dave Swain**, North Rockhampton, QLD, Australia  
**Cassandra Tucker**, Davis, CA, USA  
**Dan Weary**, Vancouver, BC, Canada  
**Alexander Weiss**, Edinburgh, Scotland, UK  
**Deborah Wells**, Belfast, Northern Ireland, UK  
**Hanno Würbel**, Bern, Switzerland

**Robert Young**, Manchester, UK

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### **Types of paper**

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Letters to the Editor
4. Book Reviews

*Original Research Papers* should report the results of original research on topics that are within the scope of the journal (<http://www.elsevier.com/locate/applanim>). The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be spontaneously submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

Dr. Mark Farnworth  
e-mail: [mark.farnworth@plymouth.ac.uk](mailto:mark.farnworth@plymouth.ac.uk)

Dr. Bas Rodenburg  
e-mail: [bas.rodenburg@wur.nl](mailto:bas.rodenburg@wur.nl)

*Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

M. Mendl  
Department of Clinical Veterinary Science  
University of Bristol  
Langford House  
Langford BS40 5DU  
UK  
e-mail: [mike.mendl@bris.ac.uk](mailto:mike.mendl@bris.ac.uk)

#### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

##### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

##### *Supplemental files* (where applicable)

#### Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### ***Ethics in publishing***

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

#### ***Policy and ethics***

##### **Animal Experimentation**

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL:  
[http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guiding\\_Principles\\_2012.pdf](http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guiding_Principles_2012.pdf)

Authors may also wish to refer to the ethical guidelines published on the website of the International Society for Applied Ethology <http://www.applied-ethology.org/ethicalguidelines.htm>, or read the following article: Sherwin, C.M., Christiansen, S.B., Duncan, I.J., Erhard, H., Lay, D., Mench, J., O'Connor, C., and Petherick, C. (2003), 'Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research', *Applied Animal Behaviour Science*, 81: 291-305. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable.

#### ***Declaration of interest***

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

#### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

#### ***Changes to authorship***

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason



for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

#### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

#### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3100**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

*Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

*Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

In addition, the International Society for Applied Ethology can help members with the preparation of manuscripts for publication in *Applied Animal Behaviour Science* (and other English-language journals). Non-members of this Society will first need to join to gain access to this service: contact the Membership Secretary, Dr. Priya Motupali, e-mail: [isaemembership@hotmail.co.uk](mailto:isaemembership@hotmail.co.uk). Members should send requests for assistance to Dr. Janice Siegford, E-mail: [siegford@msu.edu](mailto:siegford@msu.edu). Include the paper title, authors, contact address (including fax and e-mail if possible), key words and the journal to which the paper will be submitted. Do not send the manuscript. You will be sent the details of someone who will help you with the English of your paper. The helper should be acknowledged in your paper, but will not expect to be included as an author.

**Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

*Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/applan/>

**PREPARATION**

**Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

The use of English, punctuation and grammar should be of a sufficient high standard to allow the article to be easily read and understood. Do not quote decimals with naked points (e.g. use 0.08, not .08). Times of day should be in the format 10:00 h. Numbers less than 10 should be text, unless they are followed by a unit of measurement or are used as designators e.g. seven pigs from Group 3 were each trained for 7 days, with three sessions each lasting 3 min. Numbers greater than nine should be written as numerals.

### **Article Structure**

Manuscripts in general should be organized in the following order:

- Title (should be clear, descriptive and not too long)
- Name(s) of author(s) - we would like to publish full first names rather than initials, and would appreciate it if you would provide this information
- Complete postal address(es) of affiliations
- Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author
- Present address(es) of author(s) if applicable
- Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
- Abstract
- Keywords (indexing terms), maximum 6 items
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques and ethical approval
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, etc.
- References
- Tables
- Figure captions
- Tables (separate file(s))
- Figures (separate file(s)).

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text. Articles should not normally exceed 25 pages of text (11-point font, aligned left and double spaced) and contain a maximum of six or seven Tables and Figures in total.

### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 750 words (approximately three pages).

### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

When locations are given, it should be remembered that this is an international journal and provide the state/county and country, or longitude and latitude for lesser-known locations. Full details of commercial products and technical equipment should be provided, as necessary, including name of the model, manufacturer and location of manufacture, and any Trademarks. As appropriate, a statement should be made that the work has received ethical approval or that the authors have read the policy relating to animal ethics and confirm that their study complies. Data collection and collation: units

of all measures need to be specified; the experimental design should be explained together with an explanation of the experimental unit; the ways in which data are derived must be specified (e.g. individual scores were summed for the four, 12-h periods and the mean used for the analysis); the methods used for determining the normality of distribution of the residuals and homogeneity of variances need to be specified; any transformations of data need to be described; statistical analyses need to be reported in full.

### **Results**

This section should include only results that are relevant to the hypotheses outlined in the Introduction and considered in the Discussion. Present results in tabular or graphical form (see following sections) wherever possible. Text should explain why the experiment was carried out, and elaborate on the tabular or graphical data. Sufficient data should be presented so that the reader can interpret the results independently. If data require transformation to be suitable for parametric analyses, then due consideration needs to be given as to which and how data are presented in the manuscript. For example, putting error bars on graphs of the raw or back-transformed data is meaningless if analysis was performed on transformed data. To assist with interpretation of biological meaning, however, back-transformed means (but not errors) could be presented instead of/in addition to transformed data. In particular, statistical analyses should be complete and appropriate, and full details should be given either in the text, or in the Figures or Tables legends. Include the type of test, the precise data to which it was applied, the value of the relevant statistic, the sample size and/or degrees of freedom, and the probability level. Any assumptions that have been made should be stated. If in doubt, a statistical expert should be consulted.

### **Discussion**

The discussion should interpret the results, and set them in the context of what is already known in the appropriate field. This section should normally start with a brief summary of the main findings. The discussion should be focused and limited to the actual results presented, and should normally not exceed about 1500 words. All results presented in the Results section should be discussed (if they do not warrant discussion, they do not warrant inclusion) and there should be no presentation and discussion of results that have not been presented in the Results section (i.e. no new data presented in the Discussion). Any necessary extensive discussion of the literature should be placed in the Discussion, and not in the Introduction.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

It should provide a brief "take home" message and briefly outline the application/implications of the study's findings.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

As this is the most-read part of a paper, it is useful to provide some data and significance levels in the description of the main results. The Abstract should not be longer than 400 words.

## **Graphical abstract**

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name.

Highlights are three to five bullet points that provide readers with a quick overview of the article. These provide the context, core results and highlight what is distinctive about the work.

- Include 3 to 5 highlights.
- There should be a maximum of 85 characters, including spaces, per highlight.
- The core results only should be covered.

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

## **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## **Nomenclature and Units**

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. 2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. 3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. 4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the

official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed. Units and abbreviations should conform to the Systeme International d'Unites.

#### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ . Isotope numbers should precede the symbols e.g.  $^{18}\text{O}$ . The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.** *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.
- Figures and Tables to be uploaded as separate files while submitting manuscript.
- Tables to be sent as editable source files (.doc or .xls) with heading on it.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Figure captions should be understandable without reference to the main text. Figures should not duplicate results described elsewhere in the article.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Table captions should provide sufficient detail that the Table can be understood without reference to the main text.

### **Limitations**

Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

- Figures and Tables to be uploaded as separate files while submitting manuscript.
- Tables to be sent as editable source files (.doc or .xls) with heading on it.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/applied-animal-behaviour-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.



Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003). Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### *References to books*

If a book or monograph is cited as a source of specific information, then please give the relevant page(s).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

#### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

#### **RESEARCH DATA**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

#### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### **Virtual Microscope**

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact [virtualmicroscope@elsevier.com](mailto:virtualmicroscope@elsevier.com) for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

***Offprints***

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

**AUTHOR INQUIRIES**

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier |  
<https://www.elsevier.com>

## ANEXO III

Regras da revista a qual o Artigo Científico III será submetido.

### INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

#### **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

##### **Política Editorial**

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

##### **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz)

##### **Orientações Gerais**



Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação on-linedoScielo–ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.



Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.



Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).

8. É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

10

O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

### **Comitê de Ética**

- indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmtee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

### **Tipos de artigos aceitos para publicação:**

10

#### **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

10

#### **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

10

#### **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve

conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

## Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

### Formatação do texto

- ⑩ O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- ⑩ Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

### Seções de um artigo

-  **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.
-  **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.
-  **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.
-  **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco e no mínimo duas\*.  
na submissão usar somente o *Keyword* (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto *keyword* (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.
-  **Introdução.** Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.
-  **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).
-  **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

**Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

**Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

**Nota:**

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.



**Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).



**Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.



**Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.



**Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

**Como referenciar:**

- **Citações no texto**

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoría única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou

Anuário... (1987/88);

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);

mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);

mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

*Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

*Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

**501 Periódicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

• **Publicação avulsa** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6<sup>a</sup> ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de*



*carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- **Documentos eletrônicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):  
 QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

### **Taxas de submissão e de publicação:**

#### **SOMENTE PARA ARTIGOS NACIONAIS**



**Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar

<http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro).

Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

**OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br) comunicando tal necessidade.**

#### **SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS**

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

### **Recursos e diligências:**

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

## PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE

### Step 1

Em “Type” marcar a opção se o artigo é (conforme orientações das “Instruções para Submissão de Artigos”):

- 1) *Original*
- 2) *Short Communication*
- 3) *Case Report*.

Em “Title” digitar o título com até 50 palavras. Se o artigo for submetido em português ou em inglês o título sempre deve ser em inglês no momento de cadastrá-lo no ScholarOne;

Em “Abstract” usar até 200 palavras (em inglês).

### Step 2

Em “Keyword” incluir no mínimo duas palavras-chaves e no máximo cinco. Se o artigo for submetido em português ou em inglês a *keyword* deve ser em inglês.

### Step 3

Em “Agent Question” marcar a opção que se adequar à sua submissão (*author or submitting agent*);

Em “Selected Authors” incluir os autores participantes e ordená-los.

### Step 4

Destinada para indicar os revisores preferenciais e não preferências.

### Step 5

Verificar todas as opções que exigem preenchimento.

### Step 6

Este é o momento em que os arquivos serão anexados. **É indispensável a leitura das Instruções para Submissão, pois nelas estão todas as orientações quanto à formatação do texto.**

- 1) “Main Document”: é o arquivo principal, que deve ser submetido em Word, sem dados dos autores e das suas instituições. Seguir a formatação indicada nas “Instruções para Submissão de Artigos”;
- 2) “Figure or Image”: para envio de figuras ou imagens se solicitadas pela equipe de editoração;

- 3) “Title Page”: deve ser anexada à primeira página do artigo, em arquivo Word, contendo título, autores e respectivas instituições;
- 4) “Ethics Committee”(CEUA): deve ser anexado em arquivo PDF o Certificado de Aprovação do Comitê de Ética (quando aplicável);
- 5) “Justification”: para envio de justificativas, comprovantes etc., quando solicitados.
- 6) “Payment Receipt” – para anexar o comprovante de pagamento da taxa de submissão.

Fazer o *upload* de cada um deles.

### **Step 7**

Conferir os passos, abrir o “view proof” e clicar em “submit”.