

Desenvolvimento de metodologia para coleta de sêmen de pacas*

Cristiana Gama Pacheco Stradiotti¹, José Frederico Straggiotti Silva², Isabel Candia Nunes da Cunha², Deolindo Stradiotti Júnior³⁺, Antônio Carlos Cóser⁴, Charlene Cândida Rangel⁵, Tatiana Fiorotti Rodrigues⁵ e Flebson Montalvão de Almeida⁶

ABSTRACT. Stradiotti C.G.P., Silva J.F.S., Cunha I.C.N., Stradiotti Junior D., Cóser A.C., Rangel C.C., Rodrigues T.F. & Almeida F.M. [**Development of methodology for collecting semen from pacas.**] Desenvolvimento de metodologia para coleta de sêmen de pacas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(3):222-226, 2015. Programa de Pós-Graduação em Reprodução e Nutrição Animal, Universidade Federal do Espírito Santo, Rua Alto Universitário, s/n, Bairro Guararema, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: deolindo.stradiotti@ufes.br

The objective of this work was to conduct measures of the preview anatomy of the reproductive apparatus of male paca, mainly of structures related of ejaculatory processes for the development of a specific electro stimulator to the species, in order to test efficient techniques for semen collection and study. It was based on the fact that this species present a condition significantly unfavorable to captive breeding when compared to reproduction in their natural habitat. Four dead animals were dissected from the pelvic region, aiming at regional macroscopic view of the pelvic plexus and associated nerves to other structures. Thus, measures the distance from the pelvic plexus to the anal opening and diameter of the rectum, for making the probe of the electro stimulator. For testing the electro stimulator and the protocol of electro stimulation what fit better, were used nine breeding between 18 and 36 months of age. The procedures used to possible the semen macroscopic evaluation consisted of removal of the tails of the epididymis and its submission for the technique of sperm recovery from post mortem. Descriptive statistics based on means and standard deviations of measures for the development of an electro stimulator were used. The usual techniques of dissection, based on description of neuroanatomy for domestic mammals were efficient for the location of the pelvic plexus. The used measure to the anal opening was correct for making electro stimulation device probe. The protocol that best adjusted was developed based on observations of the natural mating system of animals. Younger animals showed ejaculatory responses with voltages lower than in older animals. The seminal characteristics were similar to those described by other authors for the species.

KEY WORDS. Anatomy of paca, ejaculatory processes, electro stimulator, stimulation protocols, collection of semen, assisted reproduction.

* Recebido em 25 de abril de 2013.

Aceito para publicação em 2 de maio de 2014.

¹ Bióloga, Faculdade de Castelo, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Rua Padre Anchieta, 33, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: cristianastradiotti@terra.com.br

² Médico-veterinário, Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602, Brasil. E-mail: straggio@uenf.br

³ Zootecnista, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFES, Rua Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000. +Autor para correspondência, E-mail: deolindo.stradiotti@ufes.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Professor Visitante Nacional Sênior, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, CCA/UFES, Rua Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000. Bolsista da CAPES. E-mail: acosser1@yahoo.com.br

⁵ Zootecnista, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFES, Rua Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000. E-mails: chacharangel@hotmail.com; tati_fiorotti@hotmail.com

⁶ Médico-veterinário, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFES, Rua Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000. E-mail: flefferraz@hotmail.com

RESUMO. O objetivo deste estudo foi realizar uma prévia aferição anatômica do trato reprodutivo masculino da paca, principalmente das estruturas relacionadas aos processos ejaculatórios para o desenvolvimento de um eletroestimulador específico para a espécie visando a testar técnicas eficientes para a coleta e estudo do sêmen. Este estudo baseou-se no fato de essa espécie apresentar um quadro expressivamente desfavorável à reprodução em cativeiro, quando comparado à reprodução em seu habitat natural. Quatro animais mortos foram dissecados a partir da região pélvica, objetivando a visualização macroscópica regional do plexo pélvico e nervos associados a outras estruturas. Assim, foram tomadas medidas da distância do plexo pélvico até a abertura anal e diâmetro do reto, para confecção da sonda do aparelho de eletroestimulação. Para os testes do aparelho e do protocolo de eletroestimulação que melhor se adequasse, foram utilizados nove reprodutores entre 18 e 36 meses de idade. Os procedimentos utilizados para permitir a avaliação macroscópica do sêmen constaram da retirada das caudas dos epidídimos e submissão dessas à técnica de recuperação de espermatozoide *post mortem*. Utilizou-se a estatística descritiva, calculando-se as médias e desvios-padrão das medidas para desenvolvimento de sonda de eletroestimulação. As técnicas usuais de dissecação, baseadas em descrição de neuroanatomia para mamíferos domésticos, foram eficientes para a localização do plexo pélvico. A medida empregada até a abertura anal foi correta para a confecção da sonda do aparelho de eletroestimulação. O protocolo que melhor se adequou foi desenvolvido com base na observação do processo de cópula natural dos animais. Animais jovens apresentaram respostas ejaculatórias com voltagens inferiores em relação aos animais mais velhos. As características seminais avaliadas se assemelharam àquelas descritas por outros autores para a espécie.

PALAVRAS-CHAVE. Anatomia de paca, processos ejaculatórios, eletroestimulador, protocolos de eletroestimulação, coleta de sêmen, reprodução assistida.

INTRODUÇÃO

Existe no Brasil, assim como em diversos outros países, um mercado ávido por carnes exóticas e com qualidade nutricional diferenciada, principalmente em se tratando de baixos teores calóricos, com baixos teores de gordura e praticamente isentas do denominado colesterol ruim (Lipoproteínas de Baixa Densidade - LDL- e de Baixíssima Densidade - VLDL). Esse mercado deveria ser suprido

pela criação comercial e exploração zootécnica de animais silvestres, mas devido às dificuldades relacionadas ao manejo reprodutivo dessas espécies em cativeiro, esse mercado tem sido atendido pela caça predatória que ameaça de extinção inúmeras espécies. Dentre essas espécies se encontra a paca (*Agouti paca*).

A carne de paca é procurada, hoje, pelos consumidores, por apresentar, além de alta palatabilidade, qualidades nutricionais compatíveis com a expectativa desses, a exemplo do baixo teor calórico (124 Kcal/100g), proteína com níveis próximos a 20%, sendo ainda rica em cálcio e fósforo. Desta forma, vislumbra-se na criação em cativeiro o caminho para abastecer esse mercado consumidor e proteger os indivíduos de vida livre. No entanto, embora em seu habitat natural essa espécie animal presente, via de regra, duas crias por ano (uma cria por parto), em cativeiro essa eficiência não se confirma, uma vez que esses animais apresentam somente uma cria por ano, ainda, podendo ocorrer 10% de possibilidade de reabsorção embrionária e 30 % de possibilidade de aborto (Oliveira, 2003).

Dado esse quadro desfavorável à reprodução da paca em cativeiro, estudos que venham possibilitar o uso de técnicas como a inseminação artificial, fecundação *in vitro*, transferência de embrião e demais biotécnicas, tornam-se de extrema significância. Assim, objetivou-se realizar uma prévia aferição anatômica do trato reprodutivo masculino da paca, principalmente das estruturas relacionadas aos processos ejaculatórios (plexo pélvico e nervo pudendo) para, com essas informações, desenvolver um aparelho eletroestimulador específico para a espécie e, assim, poder testar técnicas eficientes para a coleta de sêmen e realizar estudos do mesmo. Ressalta-se o fato de não haver relatos de estudos científicos com pacas quanto ao que se propõe no presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento das etapas pertinentes ao objetivado nesse estudo, seis pacas mortas e nove vivas, todas do sexo masculino, foram utilizadas, sendo procedentes da Polícia Ambiental do Espírito Santo e do Criatório Comercial de Espécies da Fauna Silvestre localizado na região de Castelo, ES (município de Povoação, Limoeiro), com o certificado de registro 3003 e número de registro 2/32/2000/000001-1.

Em termos de ambiência e manejo diário, os animais ficaram abrigados em baias individuais de alvenaria, cobertas por tela tipo alambrado, medindo 20 m², contendo em seu interior todas as estruturas necessárias para sua sobrevivência (caixa-ninho, piscina, água potável e

comedouro). Foram alimentados preferencialmente ao final do dia (às 17 horas), respeitando seu hábito noturno. A dieta consistia basicamente de ração de coelho, frutos da época e milho úmido, administrada na proporção de 10% do peso vivo do animal, equivalente a 800 g/dia/ animal.

Para a realização dos estudos anatômicos com vistas à localização de centros de controle de estímulos ejaculatórios, quatro dos seis animais mortos foram dissecados a partir da região pélvica, objetivando a visualização macroscópica regional do plexo pélvico e nervos associados a outras estruturas como vasos sanguíneos, utilizando-se como base os estudos realizados por Getty (1986), Dyce et al. (1997) e Hafez (2004), com espécies domésticas.

Foram tomadas medidas com auxílio de um paquímetro de aço carbono da marca WORKER®, com leitura direta de pol/mm, da distância do plexo pélvico até a abertura anal e diâmetro do reto, para confecção da sonda do aparelho de eletroestimulação específica para pacas.

Utilizou-se estatística descritiva, calculando-se as médias e os respectivos desvios-padrão. Os dados foram enviados para a empresa Santa Lydia Laboratórios, localizada em Presidente Prudente, Estado de São Paulo, para a confecção do equipamento. Para os testes do aparelho e do protocolo de eletroestimulação foram utilizados os nove reprodutores, com idade entre 18 e 24 meses de idade.

Inicialmente foram testados, em três desses animais, dois protocolos para a coleta do sêmen por eletroestimulação, objetivando-se definir o ideal para a espécie. O primeiro foi o protocolo descrito em Morato (1998) e Silva et al. (2003) para onça-pintada, que apresenta 80 estímulos em três séries (série I, com 10 estímulos em 2, 3 e 4V; série II, com 10 estímulos em 3, 4 e 5V; série III, com 10 estímulos com 5 e 6V). Após cada série foi respeitado intervalo de cinco minutos. O segundo, um protocolo especialmente desenvolvido para pacas, baseado no seu padrão de cópula natural que, segundo Sabatini & Paranhos da Costa (2001), ocorre desde a formação da lordose na fêmea, para que o macho se posicione sobre ela, até o final do ato reprodutivo, com duração de seis a 19 segundos. Desta forma, desenvolveu-se o protocolo buscando correlacionar os pulsos com o tempo de intervalo e o processo natural de cópula do animal, tornando o procedimento mais ágil, com intervalos curtos entre as três séries: série I, 10 estímulos com 1 e 2V; série II, 10 estímulos com 3 e 4V; série III, 10 estímulos com 5V e intervalo entre as séries de dois segundos.

A contenção mecânica dos animais foi feita com o auxílio de um puçá de polipropileno, que é a forma usual de captura de animais selvagens de pequeno porte em cativeiro. Em seguida, realizou-se o procedimento anestésico, sendo o peso do puçá descontado para o cálculo das doses anestésicas.

A contenção química foi administrada nos animais após jejum hídrico e alimentar de 12 horas. O protocolo utilizado adveio de uma série de testes para adequações na combinação das drogas utilizadas para animais exó-

ticos, assim como em suas dosagens, priorizando o bem-estar-animal. Dessa forma, a contenção química consistiu de uma associação de acepromazina 1 % (Acepran^R 1% - Univet S.A. Laboratório Veterinário) na dose de 0,1 mg/Kg, Atropion^R 0,50 mg (ARISTON Laboratório) na dose de 0,04 mg/Kg, quetamina (Vetaset^R - Fort Dodge Saúde Animal Ltda - Brasil) na dose de 20 mg/kg e xilazina (Rompum^R - Bayer S.A. - Saúde Animal - Brasil) na dose de 1,5 mg/Kg, por via intramuscular.

Após a contenção mecânica e química, os olhos dos animais foram cobertos com gaze embebida por soro fisiológico para oferecer maior conforto (evitar estresse visual). A base da glândula foi exposta e limpa com soro fisiológico e, então, apoiada em funil acoplado ao tubo de coleta aquecido e envolvido por capa protetora. Para cada introdução do eletrodo, tomou-se o cuidado de higienizá-lo e também lubrificá-lo com KY[®] - gel lubrificante da "Johnson & Johnson". Sua introdução no reto se deu por aproximadamente cinco centímetros, com as tiras longitudinais posicionadas ventralmente sob leve pressão.

Os procedimentos utilizados para possibilitar a avaliação macroscópica do sêmen constaram da retirada das caudas dos epidídimos e submissão dessas à técnica de recuperação de espermatozóide *pós mortem*. Ocorre que, devido ao tempo de congelamento das peças, o material foi útil apenas no auxílio da descrição da morfologia espermática, uma vez que o tempo de armazenamento poderia influenciar na análise da patologia dos espermatozoides e todos eles encontravam-se mortos.

Foi realizada a retirada dos testículos e epidídimos do freezer, preenchimento desses últimos com solução fisiológica, coleta do líquido em tubo graduado para centrifugação (15mL), descarte do sobrenadante após a centrifugação (2000 G/10 min), ressuspensão do pellet em 50 µL de solução fisiológica. Da solução final foi retirada uma gota e colocada em lâminas de microscopia, cujo esfregaço foi preparado e corado pela técnica de Cerevisky (protocolo), sendo visualizado em microscópio óptico em campo claro. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico sob campo claro, em aumento de 400 X e, posteriormente, 1000 X.

A avaliação macroscópica do sêmen considerou os seguintes parâmetros: Volume, por meio da seringa graduada usada na coleta; Odor, cor e aspecto, por meio de análise subjetiva e pH, avaliado por meio de uma gota de sêmen colocada sobre papel indicador de pH, observando-se, após 30 segundos, a cor correspondente à zona impregnada e comparando-a à tira de calibração para leitura do pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da descrição efetuada por Dyce et al. (1997) do plexo pélvico de outras espécies de mamíferos, inclusive domésticos e, após a dissecação da região abdominal dos animais para inspeção macroscópica regional, foi possível identificar o plexo pélvico, localizado dorsalmente à região do colo da bexiga.

Na porção latero-ventral do reto, onde o gânglio pélvico se estaciona e as fibras constituintes do plexo pélvico seguem em direção à região da genitália e glândulas acessórias foram dissecadas diversas fibras nervosas.

A inervação do pênis, descrita para vários mamíferos (Dyce et al. 1997), é feita pelo sistema parassimpático e simpático que acompanham os nervos somáticos por longo percurso nessa região. Através de dissecação e investigação morfológica macroscópica foi detectada a origem aparente do nervo isquiático (região sacral), que forma os nervos femural, obturatório e pudendo.

Após a localização do plexo pélvico e nervo pudendo nos animais estudados, que consistem no centro ejaculatório, foi possível mensurar o ponto a receber os pulsos de estímulos elétricos para a coleta de sêmen na espécie *Agouti paca*. As informações sobre a medida da distância, em centímetros, do plexo pélvico, localizado sobre o colo da bexiga até a abertura do ânus, assim como a coleta das medidas do diâmetro do reto dos quatro animais encontram-se dispostas na Tabela 1.

Com os dados médios da distância do plexo pélvico até a abertura anal e diâmetro do reto descritos na Tabela 1, foi desenvolvido um aparelho específico para coleta de sêmen de pacas. A sonda de eletroestimulação foi confeccionada em material cilíndrico compacto, com 13 cm de comprimento e 1,6 cm de diâmetro, afunilada na região distal servindo de suporte para duas tiras de eletrodos longitudinais que medem 6 cm de comprimento, inseridas latero-ventralmente na sonda.

Para a calibragem do aparelho com os protocolos propostos, foi acrescentado ao eletroejaculador SA - 200 (eletrogen AS 200, champion co.) um botão que permite escala de voltagem de 1 a 5 volts, além do botão usual de potência.

A série de eletrochoques (Testes de eletroestimulação) primeiramente seguiu o protocolo 1, mas, após testes em três animais, percebeu-se que o protocolo proposto não era eficiente, pois a cada intervalo, os animais perdiam a resposta ao estí-

mulu, que era observada pelo arrepiar das papilas córneas, abertura do divertículo e cruzamento de patas posteriores. Quando submetidos ao protocolo 2, desenvolvido de acordo com as características da cópula natural das pacas, os três animais apresentaram respostas melhores aos estímulos e a mantiveram após os intervalos.

No primeiro protocolo, o máximo de resposta obtido foi a visualização dos testículos na região perineal, desde o primeiro estímulo com 1V; o ericar das papilas e abertura do divertículo da glândula, que tornou-se ligeiramente rija, com estímulos de 2V, mas sem visualização das papilas córneas ou evaginação do saco do divertículo. Não houve liberação de líquido seminal e nem sêmen.

Estes mesmos animais, ao serem submetidos ao segundo protocolo, apresentaram uma melhor resposta e, principalmente, não ocorrendo perda dos estímulos durante os intervalos. Com 1V, além das respostas conseguidas anteriormente, percebeu-se um alargamento da região do divertículo (mais inchado), com mudança da coloração da pele, que se tornava mais escura e óstio uretral totalmente aberto. Com 2V, a base da glândula sofreu uma torção para a esquerda, iniciando a liberação da primeira fração de líquido seminal; o líquido apresentou-se pouco viscoso, sem a presença de espermatozoides. No animal 1 foi possível a visualização das espículas córneas no interior do divertículo; com 3V, continuou a liberação do líquido menos viscoso pelos animais 2 e 3, tendo o animal 1 liberado a segunda fração do ejaculado, muito viscoso, semelhante à clara de ovo (gel). Entre 4 e 5V, todos eliminaram a fração mais viscosa do ejaculado. O animal 3, com 2V, evaginou totalmente o divertículo, caracterizando uma resposta erétil completa, que foi considerada quando o divertículo apresentava-se inflado lateralmente e era possível percebê-lo recoberto por papilas córneas ao longo de todo seu corpo, e, no sentido cranial, visualizava-se um par de espículas córneas voltadas dorsalmente. Este animal manteve a ereção total até o final dos testes.

A lâmina feita com líquido liberado aos 3V apresentou grande concentração de espermatozoides. Nos demais animais que compuseram a unidade amostral deste experimento, foi utilizado somente o segundo protocolo, uma vez que o protocolo 1, apesar de eficiente na coleta de sêmen de onças-pintadas (Morato et al. 1998), não se mostrou satisfatório para coleta de sêmen de pacas em nenhuma das tentativas realizadas. As respostas às séries de eletrochoques seguiram os padrões descritos para os três animais anteriores, sendo que os

Tabela 1. Médias e desvios padrão das medidas para desenvolvimento de sonda de eletroestimulação.

Animal	Distância entre o plexo pélvico e a abertura anal (cm)	Diâmetro do reto de pacas macho (cm)
Paca 1	4,0	1,3
Paca 2	4,5	1,7
Paca 3	5,7	2,0
Paca 4	4,0	1,5
Média	4,55	1,625
Desvio padrão	0,802	0,298

primeiros jatos de ejaculados observados em animais jovens (em torno de dezoito meses) ocorriam entre 2 e 3V e em animais mais velhos (acima de dezoito meses) o protocolo era utilizado totalmente, havendo eliminação de líquido seminal entre 4 e 5V. No entanto, com o protocolo desenvolvido para pacas (protocolo 2), foi possível obter sucesso com o procedimento de eletroestimulação em todos os animais a ele submetidos, sendo, por isso, mais indicado.

A ocorrência de duas distintas frações de ejaculado em pacas, uma mais líquida, pobre em espermatozoides, e outra mais viscosa (gel), com maior frequência de observação de espermatozoides, foi notada no presente experimento. Ferreira et al. (2004) descreveram, em experimento de coleta de sêmen de pacas, com uso de vagina artificial, no qual obtiveram sucesso na coleta de sêmen de dois animais adultos, a ocorrência dessas duas frações de ejaculado, mas consideraram a primeira fração, a rica em espermatozoides. Já, no presente experimento, em nenhuma das amostras tomadas como a primeira fração foi observada a presença de espermatozoides.

O volume de líquido seminal apresentou-se extremamente pequeno e, quando liberado, escorria para a fenda do divertículo. Devido a isto, passou-se a coletá-lo a partir da coleta com micropipeta de 50 µL ou seringa de insulina de 0,5 µL, sendo esta última a mais indicada, pois o diâmetro da abertura da seringa é semelhante ao diâmetro do óstio uretral externo do animal, onde era posicionada, a fim de se coletar o máximo possível de ejaculado.

O volume seminal coletado está em acordo com os descritos por Hoyos et al. (2001), que ficou entre $0,2 \pm 0,17$ mL. Já, o valor descrito por Ferreira et al. (2004) que foi de $2,03 \pm 1,51$ mL, não foi observado em nenhum dos ejaculados coletados. O aspecto era vítreo ou transparente, não apresentando nenhum odor característico e pH com valor médio de $8,0 \pm 0,245$.

CONCLUSÕES

As técnicas usuais de dissecação, baseadas em descrição de neuroanatomia para mamíferos domésticos, foram eficientes para a localização do plexo pélvico. Também a medida empregada até a abertura anal foi correta para a confecção da sonda do aparelho de eletroestimulação.

A técnica de coleta de sêmen por eletroestimulação foi eficiente, sendo que o protocolo de pulsos ideal foi o desenvolvido de acordo com as características da cópula natural da espécie. As características seminais avaliadas se assemelharam àquelas descritas por outros autores para a espécie.

Comitê de ética e biossegurança. Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética e Biossegurança Animal da Universidade Federal do Espírito Santo sob protocolo nº 050/2010, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal.

REFERÊNCIAS

- Dyce K.M., Sack W.O. & Wensing C.J.E. Tratado de Anatomia Veterinária. Guanabara Koogan, Leipzig, 1997. 663p.
- Ferreira A.C.S., Guimarães D.A., Luz-Ramos R.S., Bastos L.V. & Ohashi O.M. Morphological and biometrics characteristics of semen of *Agouti paca* raised in captivity. In: XV International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, 2004, p.224.
- Getty R. Anatomia dos animais domésticos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1986. 2000p.
- Hafez E.S.E. Reprodução Animal. 7ª ed. Manole, São Paulo, 2004. 513p.
- Hoyos D., Smith A., Cano A., Lopes J., Ramirez A., Molina S., Valencia F., Sanchez J. & Angel M.O. Sperm characterization in *Agouti paca* e *Agouti taczanowskii*. *Int. J. Androl.*, 1:37-41, 2001.
- Morato R.G. & Barnabe R.C. Biotécnicas da reprodução aplicadas à preservação de felídeos selvagens. *Clín. Vet.*, 3:24-26, 1998.
- Nogueira T.M.R. Alguns Parâmetros Fisiológicos e Reprodutivos da paca (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766) em Cativeiro. Tese (Mestrado em reprodução animal), Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal, 1997. 131f.
- Oliveira F.S., Machado M.R.F. & Canola J.C. Real time B-mode ultrasound in pacas pregnancy (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, 40:73-78, 2003.
- Sabatini V. & Paranhos da Costa M.J.R.P. Etograma da Paca (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766) em cativeiro. *Rev. Bras. Etol.*, 3:3-14, 2001.
- Silva A.R., Mattos M.R.F., Cardoso R.C.S., Silva T.F.P., Uchoa D.C., Filgueira K.D., Cardoso J.F.S., Aguiar L., Monteiro C.L.B., Silva L.D.M., Aguiar G.V. & Morato R.G. Avaliação andrológica de uma onça pintada (*Panthera onca*) oriunda da Região Norte do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27:217-219. 2003.