

ÁDSON COSTA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DE JACUS
(*PENELOPE OBSCURA*) CONTIDOS FÍSICAMENTE E
ANESTESIADOS COM ISOFLURANO E BIOQUÍMICA
CLÍNICA EM AMOSTRAS COM DIFERENTES
ANTICOAGULANTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Mere Erika Saito.
Coorientador: Dr. Aury Nunes de Moraes.

**LAGES, SC
2016**

Costa, Ádson

Avaliação hematológica de jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e anestesiados com isoflurano e bioquímica clínica em amostras com diferentes anticoagulantes. / Ádson Costa. - Lages, 2016.

68 p. : il. ; 21 cm

Orientadora: Mere Erika Saito

Bibliografia: p. 52-62

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

1. *Penelope obscura*. 2. Hematologia. 3. Soro. 4. Plasma. 5. Aves. I. Costa, Ádson. II. Saito, Mere Erika. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

ÁDSON COSTA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DE JACUS
(*PENELOPE OBSCURA*) CONTIDOS FÍSICAMENTE E
ANESTESIADOS COM ISOFLURANO E BIOQUÍMICA
CLÍNICA EM AMOSTRAS COM DIFERENTES
ANTICOAGULANTES**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em
Ciência Animal, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

Banca examinadora

Orientadora: _____

Prof. Dra. Mere Erika Saito

Universidade do Estado de Santa Catarina - Lages, SC.

Membro: _____

Prof. Dra. Letícia Andreza Yonezawa

Universidade do Estado de Santa Catarina - Lages, SC.

Membro: _____

Prof. Dra. Luciana Pereira Machado

Universidade Federal da Fronteira Sul – Realeza, PR.

Lages/SC, 26/02/2016

"Seja a mudança que você deseja
ver no mundo".

Autor: Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo. A fé, indiferente da religião, é a principal força que nós temos. Agradeço pela família que tenho, pela saúde, pelas oportunidades oferecidas, pelas pessoas em meu caminho.

Agradeço à minha família que amo muito. Meus pais Gentil e Iara, que me ensinaram a ser quem sou hoje. Tenho muito orgulho da educação que tive e tenho. Meus irmãos Robson e Átila pela união, companheirismo e fraternidade entre nós. Agradeço por serem todas grandes pessoas as quais me espelho para me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço à minha namorada Chariel que eu amo por estar sempre ao meu lado e pelo amor. E também por iluminar meus dias com seus olhos.

Agradeço às minhas cunhadas Ana Paula e Daiane que já fazem parte da família por terem sido companheiras.

Agradeço à minha sobrinha afilhada Yasmin por dar tantas alegrias à família. Temos muito que aprender (ou lembrar) com o jeito com que as crianças veem o mundo.

Agradeço aos meus amigos, verdadeiros e poucos amigos, por serem companheiros tanto na alegria como na tristeza e por todos os momentos inesquecíveis passados juntos. Também agradeço aos colegas, que não são amigos por falta de mais contato, pelos momentos vividos.

Agradeço aos integrantes do laboratório de patologia clínica veterinária do Hospital Veterinário. À professora Mere Erika Saito e ao professor Cláudio Roberto Scabelo Matoso (Tucano) por terem me passado o conhecimento necessário para a realização

deste trabalho. À professora e doutoranda Julieta Volpato por todos os ensinamentos e pela amizade. Aos pós-graduandos Nádia Cristine Weinert, Julia Morais, Carla Dezan De Lorenzi Cancelier, Paulo Ricardo Benetti Todeschini (Paulinho) e Maysa Garlet pela troca de informações e ótimo convívio no laboratório. À todos os bolsistas e estagiários que passaram pelo laboratório sempre trabalhando bastante. Aos professores e pós-graduandos do programa Ciência Animal. À Wilian Veronizi por realizar a captura dos animais. Ao professor Aury Nunes de Moraes, Bruno Lunardeli, Átila Costa e à todos os envolvidos neste trabalho. Devo tudo o que aprendi nesses dois anos a todos vocês. Obrigado!

Agradeço à UDESC e à CAPES pela oportunidade e pela bolsa fornecida durante o período mestrado.

E finalmente agradeço aos animais, que são o motivo maior de todo o caminho percorrido. Agradeço porque neles, se paramos para refletir, podemos buscar ser melhores pessoas. Os animais fazem parte, como nós, da natureza onde têm seu papel para o equilíbrio desta.

RESUMO

COSTA, A. Avaliação hematológica de jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e anestesiados com isoflurano e bioquímica clínica em amostras com diferentes anticoagulantes. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de concentração: Sanidade e Patologia Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

A hematologia e bioquímica sérica são grandes ferramentas utilizadas para o diagnóstico precoce em aves. No entanto, o estresse de captura e a sedação podem causar alterações no hemograma. O plasma heparinizado costuma ser utilizado para realizar testes bioquímicos em aves, porém a maioria dos kits bioquímicos não permitem a utilização deste tipo de amostra. Este estudo teve como objetivo avaliar as diferenças encontradas no hemograma entre os jacus contidos fisicamente e os anestesiadas com isoflurano. Além disso, foram pesquisadas possíveis diferenças nos resultados dos exames bioquímicos utilizando soro e plasma heparinizado e EDTA como anticoagulantes. Foram utilizados 32 jacus de vida livre, que vivem no parque do IBAMA em Painel – SC e foram capturadas com alçapão. Foram obtidas amostras de sangue após contenção física das aves por meio de punção da veia ulnar e as amostra foram acondicionadas em tubos com heparina. As aves foram anestesiadas com isoflurano e após 30 minutos foi realizada uma nova coleta de amostra de sangue, ainda com as aves anestesiadas, por meio de punção da veia jugular e as amostras foram

divididas e acondicionadas em tubos contendo heparina ou EDTA 3% e em tubo sem anticoagulante. Foi realizado hemograma completo nos momentos de contenção física e química somente nas amostras heparinizadas. A análise bioquímica foi realizada somente no momento da contenção química nas diferentes amostras de soro e plasma heparinado e com EDTA 3%. Os dados dos resultados da hematologia foram submetidos ao teste t pareado e os resultados das análises bioquímicas ao teste de ANOVA, sendo as diferenças encontradas submetidas ao teste de Tukey. Houve diminuição para a contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e mensuração de VG e aumento no CHGM no momento contenção química. Os valores de PPT, fibrinogênio e trombócitos também diminuíram no momento contenção química. Quanto à análise das diferenças entre soro e plasma com diferentes anticoagulantes para as variáveis bioquímicas, houve aumento nos valores de albumina e diminuição nos valores de globulina no plasma com heparina comparando com o soro e EDTA 3%. O plasma com EDTA 3% apresentou valores menores na GGT e cálcio comparando com o soro e o plasma com heparina. Concluiu-se assim que a contenção química com isoflurano produz alterações nos parâmetros hematológicos e deve ser levado em consideração na interpretação de exames. Ainda, os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo a partir de amostras de soro e plasma heparinado ou com EDTA 3%, na sua maioria, não demonstraram diferenças, podendo ser utilizados na avaliação bioquímica clínica destes animais nestas condições.

Palavras chave: *Penelope obscura*, hematologia, soro, plasma, aves.

ABSTRACT

COSTA, A. Hematologic evaluation in guans (*Penelope obscura*) physically restrained and anesthetized with isoflurane and clinical biochemistry in samples with different anticoagulants. 2016. Dissertation (Msc Animal Science. Area: Animal Health and Pathology) - University of State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2016.

The hematology and serum biochemistry are great tools used for early diagnosis in birds. However, the capture stress and sedation can cause changes in blood count. Heparinized plasma is often used to perform biochemical tests, but most of the biochemical kits do not allow the use of this type of sample. This study aimed to evaluate the differences found in the blood count among guans physically restrained and anesthetized with isoflurane. There were also investigated possible differences in the results of biochemical tests using serum and heparinized plasma and EDTA as anticoagulants. It was used 32 free-living guans, which live in the IBAMA Park in the city of Painel - SC and was captured with trapdoor. Blood samples were obtained after physical restraint of the birds by puncturing the ulnar vein and the obtained sample was placed in heparinized tubes. The birds were anesthetized with isoflurane and after 30 minutes a new blood collection took place, with the birds still anesthetized, through puncture of the jugular vein and samples were divided and placed into tubes containing heparin or EDTA 3% and tube without anticoagulant. Blood cells count was performed in times of physical and

chemical restraint with heparinized samples. Biochemical analysis was performed only at the time of chemical restraint in the samples containing serum and heparinized plasma and EDTA 3%. Data from the hematology results were analyzed by paired t-test and the results of biochemical analyzes by ANOVA test, and the differences submitted to Tukey test. There was a decrease in the erythrocyte count, hemoglobin and PVC measurement and increased MCHC in chemical restraint moment. The TPP values, fibrinogen and thrombocytes also decreased in the chemical restraint moment. Regarding the analysis of differences between serum and plasma with different anticoagulants, there was an increase in albumin values and a decrease in globulin values in heparinized plasma compared with the serum and EDTA 3%. EDTA 3% plasma had lower GGT and calcium values compared to serum and plasma with heparin. It was concluded that isoflurane influences the hematological parameters and should be taken into account in interpreting the test. Also, the biochemical parameters evaluated in this study from serum and heparinized or EDTA 3% plasma, mostly showed no differences and could be used in clinical biochemical evaluation of these animals in such conditions.

Keywords: *Penelope obscura*, hematology, serum, plasma, birds.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios e de \pm desvio padrão do eritrograma em jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e quimicamente com isoflurano.....42
- Tabela 2 - Valores médios e de \pm desvio padrão de trombócitos, PPT (proteína total plasmática) e fibrinogênio em jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e quimicamente com isoflurano.....44
- Tabela 3 - Valores médios e de \pm desvio padrão do leucograma em jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e quimicamente com isoflurano.....46
- Tabela 4 - Valores médios e de \pm desvio padrão de analitos bioquímicos em amostras de soro, plasma com heparina e plasma com EDTA 3% em jacus (*Penelope obscura*) contidos quimicamente com isoflurano.....51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Jacu, indivíduo adulto.....26
- Figura 2 - Armadilha (tipo alçapão) confeccionada manualmente com de rede de pesca com malha de 12 mm preparada para captura das aves submetidas ao estudo, na Base de Pesquisa Avançada do IBAMA em Painei/SC.....34
- Figura 3 - Inclusões citoplasmáticas compatíveis com *Haemoproteus sp.* em jacus (*Penelope obscura*).....49
- Figura 4 - Amostra de plasma normal, soro discretamente hemolisada e plasma intensamente hemolisada, respectivamente da direita para esquerda.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAM	Concentração Anestésica Mínima
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FC	Frequência cardíaca
<i>f</i>	Frequência respiratória
HCV	Hospital de Clínica Veterinária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PPT	Proteína Plasmática Total
T°C	Temperatura em graus Celsius
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VG	Volume Globular
VGM	Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ANIMAIS.....	33
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
4.3 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	36
4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
4.4.1 Hemograma.....	37
4.4.2 Proteína Plasmática Total.....	37
4.4.3 Análise Bioquímica.....	38
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 HEMOGRAMA.....	41
5.1.1 Eritrograma.....	41
5.1.2 Trombócitos, PPT e Fibrinogênio.....	43
5.1.3 Leucograma.....	45
5.2 HEMOPARASITAS.....	47
5.3 BIOQUÍMICA CLÍNICA.....	50
6 CONCLUSÃO	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A medicina de aves silvestres e exóticas é um ramo da medicina veterinária que vem necessitando cada vez mais de profissionais especializados, seja de animais mantidos como *pets* ou na conservação de espécies nativas. Segundo Villa (2013) a dificuldade em fazer diagnóstico precoce é uma das complicações mais características na clínica das aves. Esta é uma condição inerente desses animais, que por serem silvestres, ocultam sinais de doenças, que só serão detectadas quando evoluir até estágios muito avançados. Esta estratégia é compreensível em situações de vida livre como mecanismo para evitar a atenção de predadores potenciais, mas na clínica representa uma complicação ou até mesmo a impossibilidade do tratamento.

O hemograma e a bioquímica sérica, juntamente com o exame coproparasitológico, são ferramentas de grande utilidade para o diagnóstico precoce em aves. Quando falamos de procedimentos em aves, sejam silvestres ou *pets* exóticos, o fator “estresse” sempre deve ser levado em consideração. Uma colheita de sangue prolongada e muito estressante para o animal pode ter consequências fatais para o paciente. Além disso, a reação fisiológica de defesa de uma presa quando capturada, pode ocasionar alterações no resultado de exames laboratoriais. Em virtude disso, há a alternativa de anestésias estes animais para realização de procedimentos, mesmo sendo ambulatoriais. Os anestésicos inalatórios vêm sendo utilizados com frequência em aves, dentre eles, o isoflurano é o mais comumente utilizado. Optando-se por anestésias o paciente, devem-se saber quais possíveis alterações tal agente anestésico irá ocasionar no resultado do exame solicitado.

Na rotina da clínica de aves, a necessidade de exames complementares e a praticidade do uso da anestesia inalatória fazem com que sejam necessários mais estudos dos efeitos deste no resultado dos exames laboratoriais.

No caso da bioquímica clínica, o principal problema encontrado é a quantidade de amostra obtida sobretudo em pequenas aves. Sendo assim deve-se otimizar a utilização da amostra colhida. A realização de exames hematológicos e bioquímicos com amostras acondicionadas de uma só forma evita desperdício e otimiza o processo, ou seja, após processada a amostra para o hemograma, separa-se o plasma desta para realização das dosagens bioquímicas. Contudo, há necessidade de informação em função das dúvidas sobre a segurança nas dosagens de bioquímica clínica sanguínea com o uso de amostras obtidas a partir da adição de anticoagulantes e falta de conhecimento das mesmas. Isso devido à crescente solicitação de tais dosagens pela impossibilidade de obter quantidade de sangue suficiente para obtenção de soro ou a realização de testes bioquímicos adicionais não previstos a partir de amostras de sangue total.

De acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) das espécies ameaçadas ou, em inglês, IUCN Red List (2009), a espécie *Penelope obscura* se encontra em um estado de conservação pouco preocupante. Por outro lado, há espécies de cracídeos como o Mutum-do-sudeste, o Mutum Pinima e a Jacutinga, que estão entre as espécies desta família mais ameaçadas de extinção nas Américas. Por exemplo, a Jacutinga (*Pipile jacutinga*) era amplamente distribuída na Mata Atlântica entre zero e mil metros de

altitude, sendo encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, além de ocorrer na Argentina e no Paraguai. Nos últimos vinte anos não existem relatos de sua ocorrência nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Atualmente no Brasil populações silvestres de jacutinga são encontradas principalmente em Unidades de Conservação, concentrando-se nos estados de São Paulo e Paraná (IUCN, 2009).

Os jacus são aves de fácil acesso e captura, isso possibilita um tamanho amostral mais significativo para uma situação experimental. Por serem da mesma família que as jacutingas e mutuns, torna-se mais significativa a extrapolação dos valores hematológicos e bioquímicos para estas espécies que estão ameaçadas de extinção. O fato de estudar e obter amostras de aves silvestres que sejam de vida livre valoriza o trabalho tratando-se de medicina da conservação.

Diante disso, esse trabalho teve o intuito de identificar as diferenças encontradas no hemograma em jacus contidos fisicamente e anestesiados com isoflurano e identificar as diferenças encontradas na bioquímica clínica realizada em amostras com diferentes anticoagulantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Populações de aves silvestres de vida livre constituem entidades de alto valor e importância ecológica, sendo que algumas espécies estão em constante ameaça de extinção. Esforços para a preservação e conservação destas espécies devem ser feitos, incluindo não somente atendimento clínico de indivíduos doentes, mas também estudos de monitoramento e reintrodução de populações (VILLA, 2013).

A família Cracidae pertence à ordem Galliformes a qual está distribuída entre 11 gêneros, 50 espécies e cerca de 60 subespécies (DEL HOYO, 1994). Na família Cracidae, para qual constam fósseis que remetem ao período terciário (Eoceno, 50 milhões de anos), são descritos quatro biotipos: Aracuãs, Jacus, Jacutingas e Mutuns. São os únicos galiformes considerados verdadeiramente arborícolas, possuem pescoço e cauda longos, penas altas e fortes e asas grandes com bom voo. Alcançam o peso adulto em menos de um ano de idade e possuem plumagem semelhante a estes, com exceções (SICK, 1997).

O jacu, jacuguaçu ou jacuaçu (*Penelope obscura*) é uma ave da família dos cracídeos, que habita a Mata Atlântica, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Sua área de distribuição se estende também à Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. Os jacus são animais de tamanho médio (50 a 70 cm de altura), peso médio de 1,5 kg em aves adultas, apresentando barbela desenvolvida e asas grandes, robustas e arredondadas, que permitem o voo de fuga e voo tradicional (DEL HOYO, 1994; MARQUES, 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Jacu, indivíduo adulto.



Fonte: Dario Sanches.

São aves que atraem a atenção da comunidade científica por serem representantes típicos das florestas neotropicais e atuarem na dispersão de sementes, além de poderem ser utilizados como indicadores biológicos de qualidade do ambiente e no auxílio de programas de manejo e conservação de áreas de proteção (STRAHL; GRAJAL, 1991).

A dificuldade em fazer diagnóstico precoce é uma das complicações mais características na clínica das aves. Esta é uma condição inerente desses animais, que por serem silvestres, ocultam sinais de doenças, que só serão detectadas quando evoluir até estágios muito avançados. Esta estratégia é compreensível em situações de vida livre como mecanismo para evitar a atenção de predadores potenciais, mas na clínica representa uma complicação ou até mesmo a impossibilidade do tratamento (VILLA, 2013).

O hemograma e a bioquímica sérica, juntamente com o exame coproparasitológico, são ferramentas de grande utilidade para o diagnóstico precoce em aves. No que diz respeito à hematologia e bioquímica de aves selvagens, alguns cuidados devem ser tomados no momento de interpretar os resultados. Segundo Cîrcule et al. (2012), o estresse decorrente da contenção física ocasiona alteração dos parâmetros hematológicos. Nos animais de vida livre a resposta estressante decorrente da contenção pode ter consequências graves ou fatais secundárias à miopatia por captura (PONJOAN et al., 2008). Alguns fatores no momento da obtenção de amostras como técnica de contenção correta, ambiente tranquilo, hora do dia com temperatura mais amena, ter todo material necessário previamente para diminuir tempo de contenção, podem minimizar tais efeitos e alterações nos resultados (VILLA, 2013).

Em jacus, contenção física deve ser rápida e precisa, tomando cuidado com seu temperamento agressivo e a reação de força excessiva quando contidos, tendo como base manter a cabeça coberta evitando o contato com a luz e pessoas e segurando firmemente as asas e membros (MARQUES, 2014).

Nas aves, muitos procedimentos podem ser menos estressantes quando realizados sob anestesia geral, e não somente com a contenção física (CURRO, 1998; MARQUES, 2014; VILANI, 2014). Segundo Villa (2013) no caso de coleta de amostras, anestesiá-la a ave pode ser um procedimento não preferencial, pois os efeitos da anestesia sobre os parâmetros hematológicos ainda não foram bem estudados.

A anestesia inalatória foi considerada por alguns autores o melhor método de contenção química de aves (LUDDERS, 2001; PAUL-MURPHY; FIALKOWSKI, 2001). Os anestésicos inalatórios são de escolha para a

anestesia de aves por possuírem alto índice de segurança, permitir indução e recuperação rápidas, serem pouco biotransformados por via hepática e eliminados por via renal e facilitarem alteração dos planos anestésicos, sobretudo porque o tempo de anestesia pode ser ilimitado (BENSON; TRANQUILLI; THURMON, 1996).

O isoflurano é o anestésico preferido em anestesia inalatória em aves, pois proporciona um alto índice terapêutico, rápida indução e recuperação, bom relaxamento muscular, alterações fisiológicas mínimas, sedação adequada para diferentes procedimentos, baixa toxicidade e é seguro em pacientes críticos (HARRISON; HARRISON, 1994; ALTMAN et al., 1997 e THURMON; TRANQUILLI; GRIMM, 2007). Segundo Marques (2014) a contenção química mais usual em jacus é realizada por meio de anestesia inalatória com isoflurano.

Ao comparar aves da espécie *Falco sparverius* antes e após anestesia com isoflurano foram notadas alterações em concentrações de potássio e do ácido úrico (DRESSEN, WIMSAT, BURKHARD, 1999). Entretanto, um estudo que comparou os efeitos da contenção química e física em *Pteropus hypomelanus* provou que a contenção química com isoflurano era a que causava menos alterações naqueles parâmetros (HEARD, HUFT, 1998).

Em muitas ocasiões a impossibilidade de realizar o perfil bioquímico completo faz com que seja necessário priorizar certos testes (CRAY & ZAIAS, 2004). Em algumas espécies, o peso corporal reduzido não permite a obtenção de amostra de plasma ou soro suficiente para a realização de exames bioquímicos, por exemplo, espécies como o beija-flor, em que o peso não supera 30 g (HARR, 2002).

Os testes bioquímicos podem ser feitos tanto no plasma (obtido a partir de uma amostra com anticoagulante) como no soro (obtido a partir de uma amostra de sangue coagulado). A principal vantagem do plasma é que permite obter volumes de amostra maiores e não existe risco de coagulação do sobrenadante (LUMEIJ, 2008). A utilização de plasma poupa tempo, pois as amostras podem ser centrifugadas diretamente após a coleta e, ao contrário do soro, não é necessário esperar até que a coagulação se complete, acelerando a análise em situações de emergência (CÉRON et al., 2004). Assim, nas aves é preferível utilizar anticoagulante, pois a formação do coágulo de fibrina pode provocar alterações nos resultados bioquímicos além de diminuição do volume de amostra (CRAY & ZAIAS, 2004). O plasma deve ser separado do restante dos componentes sanguíneos o mais rapidamente possível visando evitar alterações *in vitro* (HARRISON, HARRISON, RITCHIE, 1994).

Tanto a heparina quanto o EDTA e o citrato de sódio podem ser usados como anticoagulantes em amostras de sangue de aves (CAMPBELL, ELLIS, 2007), mas o EDTA é o anticoagulante de escolha para a hematologia da maioria das aves (THRALL et al., 2004; CAMPBELL, ELLIS, 2007). Porém, em algumas aves o uso de EDTA pode gerar hemólise ou anticoagulação incompleta (CAMPBELL, ELLIS, 2007) podendo-se utilizar heparina lítica (THRALL et al., 2004; CAPITELLI & CROSTA, 2013). A vantagem da heparina é a possibilidade de fornecer sangue total para hematologia e plasma para exames bioquímicos. No entanto, o sangue heparinizado pode resultar em coloração inadequada das células e, conseqüentemente, contagem errônea de leucócitos e alteração na morfologia celular

em esfregaços sanguíneos corados (THRALL et al, 2007).

Devem-se priorizar tubos a vácuo preenchidos com volumes adequados com o intuito de assegurar uma relação sangue/anticoagulante apropriada, evitando a coagulação ou gelificação do plasma (HARR, 2002). Uma questão que precisa ser melhor avaliada é a padronização de métodos para o manuseio e armazenamento destas amostras, pois o procedimento inadequado também pode interferir na concentração dos metabólitos gerando resultados inconsistentes ou conclusões equivocadas (SPINELLI et al.,2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar as diferenças encontradas no hemograma em jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e anestesiados com isoflurano e identificar as diferenças encontradas na bioquímica clínica realizada em amostras com diferentes anticoagulantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CETEA – CAV/UDESC, sob o protocolo de número 04/2013, e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio, por meio do Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade – SISBIO, protocolo de número 38776 –1.

4.1 ANIMAIS

As capturas dos animais foram realizadas na Base de Pesquisa Avançada do IBAMA em Painel/SC e o ensaio foi conduzido no Hospital de Clínicas Veterinárias CAV/UDESC (HCV – CAV/UDESC) no município de Lages/SC. A distância entre um local e outro é de aproximadamente 15 km.

Após um período de condicionamento das aves com uso de ceva de milho durante dois meses, foram capturadas 32 aves com auxílio de armadilha tipo alçapão, confeccionada manualmente com rede de pesca com malha de 12 mm e desarmamento manual (Figura 2).

No dia que antecedia o experimento as aves foram transportadas até o HCV – CAV/UDESC em gaiolas e acondicionadas em baias com água e comida. O tempo de ambientação ao local foi de 12 a 36 horas.

Figura 2 – Armadilha tipo alçapão confeccionada manualmente com de rede de pesca com malha de 12mm.



Fonte: Bruno Lunardeli.

Foi realizado o exame físico de cada ave, avaliando o peso, estado corporal, grau de hidratação, frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura, presença de ectoparasitas e presença de diarreia.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos a jejum de quatro horas em média (variou entre duas e seis horas). Foram considerados dois momentos, o momento contenção física e o momento contenção química, após imobilização com uso de anestésico isoflurano. Após a contenção física foram realizados a pesagem e exame físico (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura cloacal, grau de hidratação e estado corporal).

Após a primeira coleta de sangue as aves foram submetidas a anestesia que foi induzida por meio de máscara neonatal adaptada a uma luva de látex, para evitar vazamentos, com isoflurano inicialmente a 2% e aumentando 1% por minuto até chegar em 4%, solubilizado em 100% de oxigênio a um fluxo de 3 L/min. Após detectada a perda dos reflexos ocular e laringotraqueal, a ave foi intubada com sonda endotraqueal de Pean Murphy nº 3,0 com balonete, que então era levemente inflado.

Em um período de aproximadamente 45 minutos após indução anestésica, foi realizada a segunda coleta, ainda com a ave anestesiada.

Após a segunda coleta de sangue o vaporizador de isoflurano era desligado, mantendo o oxigênio. A recuperação da anestesia ocorreu no mesmo local onde estavam antes. Após recuperação completa da anestesia, as aves foram levadas novamente para o local de origem e soltas.

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra de sangue coletada no momento contensão física foi obtida por meio de punção da veia ulnar, utilizando seringa de 1 ml heparinizada e agulha 26 G. As amostras foram acondicionadas em microtubos e uma extensão sanguínea foi confeccionada no momento da coleta. A heparina utilizada tanto na primeira quanto na segunda coleta foi a heparina sódica.

A amostra de sangue coletada no momento contensão química foi obtida por meio de punção da veia jugular direita, com seringa de 3 ml e agulha 24 G. As amostras foram acondicionadas em microtubos em três diferentes alíquotas, contendo heparina, EDTA 3% e em microtubo sem anticoagulante. Foram confeccionadas novas extensões sanguíneas imediatamente após a coleta das amostras sem anticoagulante e também das amostras heparinizadas.

As amostras heparinizadas obtidas nos dois momentos foram destinadas à realização de hemograma completo. As amostras de soro, plasma de EDTA e plasma de heparina obtidas no momento contensão química foram utilizadas para a dosagem das variáveis bioquímicas.

4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram processadas imediatamente no Laboratório Clínico Veterinário, CAV-UDESC.

4.4.1 Hemograma

As extensões sanguíneas foram coradas com corante hematológico rápido (LB Laborclin®).

A contagem total de células (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) foi obtida por meio de método direto utilizando o diluente Natt & Herrick (1952) na diluição de 1:100 em câmara de Neubauer. Com a utilização deste corante foi possível diferenciar leucócitos e eritrócitos, pois cora com maior intensidade os leucócitos, permitindo fazer ao mesmo tempo a contagem total de eritrócitos e de leucócitos (WALBERG, 2001).

Em relação à contagem de leucócitos totais e trombócitos, após a contagem na câmara de Neubauer, foi examinado no esfregaço corado, o percentual de trombócitos, para obter valores absolutos individuais para cada grupo celular.

A determinação do volume globular foi realizada pela técnica do microhematócrito (JAIN, 1986). O volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram determinados por meio de cálculos matemáticos. A hemoglobina foi mensurada por método colorimétrico por meio de kit comercial (Labtest) em analisador bioquímico semi-automático (TP Analyzer Plus®, Thermoplate), respeitando a técnica para a espécie que compreende a centrifugação do reagente de trabalho e da amostra de sangue (600g) após sua reação, excluindo assim os núcleos dos eritrócitos e sua possível interferência nos resultados.

O diferencial de leucócitos, morfologia celular e contagem de trombócitos foram realizados nas extensões sanguíneas visualizados em microscópio óptico (1000x) e contados em 100 células por extensão, estabelecendo o percentual de cada componente celular.

4.4.2 Proteína plasmática total

A determinação da concentração da proteína plasmática total (PPT) foi realizada por refratometria (Digit, Biosystems®) e o fibrinogênio pela técnica de precipitação pelo calor (SCHALM, KANEKO e SMITH, 1970).

4.4.3 Análise bioquímica

Todas as amostras colhidas nos dois momentos (contenção física e química) e que foram acondicionadas em microtubos com EDTA 3%, hepanina e em microtubo seco foram centrifugadas para a obtenção de plasma com EDTA 3%, plasma com heparina e soro respectivamente. A centrifugação foi realizada na velocidade de 2000 g durante 10 minutos, as amostras de plasma e soro foram então acondicionadas em microtubos e armazenados a -20°C até o momento do processamento.

Antes da realização das dosagens bioquímicas, as amostras de soro e de plasma das aves foram avaliadas quanto ao grau (discreto, moderado ou intenso) de hemólise.

Foram dosados metabólitos, enzimas e eletrólitos. Dentre os metabólitos foram dosados Ácido úrico, Ureia, Albumina, Proteínas Totais (PT), Glicose, Colesterol e Triglicérides. As enzimas dosadas foram Gama glutamiltransferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA), Alanina aninotransferase (ALT), Aspartato aninotransferase (AST), Creatinina quinase (CK) e Lipase. O único eletrólito dosado foi o Cálcio. O valor de Globulina foi obtido através da subtração do valor de Albumina do valor de Proteínas totais.

Foi utilizado o analisador bioquímico automático (Labmax Plenno®, Labtest) com auxílio de kits comerciais (Labtest) conforme instruções preconizadas pelo fabricante para a realização das dosagens, excetuando o anticoagulante recomendado (Anexo A).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis analisadas no hemograma sob contenção física e sob contenção química foram pareadas e submetidas ao teste-t pareado para amostras com distribuição normal e teste de Wilcoxon para amostras que não apresentaram distribuição normal.

Os valores obtidos por meio da dosagem de analitos bioquímicos foram submetidos ao teste de variância ANOVA uma via para os analitos que apresentaram distribuição normal e teste de análise de variância de Kruskal-Wallis uma via para os analitos que não apresentaram distribuição normal. O método de Dunn foi utilizado para comparação de dois grupos quando houve diferença no teste de Kruskal-Wallis.

O teste de normalidade utilizado tanto na avaliação dos momentos de hemograma quanto dos analitos bioquímicos foi o Shapiro-Wilk.

Os dados foram tabulados e analisados por programa computacional Sigma Plot 12.0 (2012). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso médio das aves foi de $1,32 \pm 0,25$ kg. Do total de 32 aves que foram utilizadas, 30 foram sexadas e segundo os resultados dos exames de reação em cadeia da polimerase (PCR) realizado em laboratório particular (São Camilo, Maringá – PR) tratava-se de um grupo de 16 fêmeas e 14 machos. Quanto à avaliação física, não foram avaliadas alterações dignas de nota durante o ensaio, considerando animais acordados e anestesiados.

5.1 HEMOGRAMA

5.1.1 Eritrograma

Os valores de eritrograma resultaram em diferenças significativas em eritrócitos, hemoglobina, volume globular (VG) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). Não ocorreu diferença estatística no volume globular médio (VGM) (Tabela 1).

Foram obtidos valores menores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito no momento contenção química, o que pode estar relacionado à ação do anestésico inalatório isoflurano.

O mesmo foi observado em ferrets (MARINI et al., 1994), morcegos (HEARD, 1998), ratos (DECKARDT et al., 2007) e gatos (CARTANA, 2010) anestesiados com isoflurano e em humanos cuja manutenção anestésica foi com sevoflurano, ocorreu diminuição no hematócrito devido aos efeitos cardiovasculares e hipotensivos do procedimento anestésico (SANO et al., 2005).

Tabela 1 - Valores médios \pm desvio padrão de eritrograma de amostras obtidas de 31 jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e quimicamente com isoflurano.

Eritrograma	Contenção física	Contenção química
Eritrócitos	2,50 ^a	2,27 ^b
(x 10⁶/ μL)	\pm 0,36	\pm 0,31
Hemoglobina	10,77 ^a	9,98 ^b
(g/dL)	\pm 2,05	\pm 2,06
VG	39,75 ^a	35,41 ^b
(%)	\pm 5,13	\pm 5,01
VGM	161,27	156,41
(fL)	\pm 24,98	\pm 13,53
CHGM	27,02 ^a	28,03 ^b
(%)	\pm 2,90	\pm 3,11

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam médias entre momentos que diferem estatisticamente.

Fonte: Produção do próprio autor.

Dressen et al. (1999) conduziram um ensaio com falcões quiriquiri (*Falco sparverius*) obtendo resultados semelhantes, em que ocorreu decréscimo no valor de hematócrito. Essa diminuição está relacionada aos agentes inalatórios que causam diminuição da pressão hidrostática, primariamente causada pela diminuição da resistência vascular (STEFFEY et al., 1976). O resultado é aumento de fluido vascular e sequestro funcional dos elementos celulares (CHENG, 1992).

Outro fator que pode ter influenciado, porém não de forma significativa, é a perda sanguínea e consequente hemodiluição após 45 minutos entre a primeira e segunda coleta. Estudos em cães afirmam que essa hemodiluição leva horas para ocorrer (GLICK; WILSON; AIELLO, 2002, THRALL, 2007). Em aves, Schindler et al. (1987a) verificaram que a hemodiluição também ocorre após algumas horas em codornas japonesas (*Coturnix japonica*). Na perda aguda de

sangue, em razão do desequilíbrio das forças coloidosmóticas, desencadeiam na corrente circulatória um efeito diluidor, ocasionando entrada de líquidos do interstício (GUYTON, 1991 e THRALL, 2007). No trabalho de Dressen et al. (1999) foi utilizado um coeficiente de correção, em que se levava em consideração o peso antes e após a primeira coleta de sangue. Porém este trabalho foi realizado em quiriquiri (*Falco sparverius*) que pesa em média 100 gramas, no qual a amostra de 1 mL de sangue representa quase 10% do volume total. Neste trabalho os jacus (*Penelope obscura*) pesaram em média 1,32 kg, sendo o volume de 1 mL, o qual foi colhido no primeiro momento, pouco significativo.

Em mamíferos o efeito da estimulação simpática decorrente do estresse agudo causa contração esplênica que se manifesta pelo aumento de volume globular em até 50% (CASAS-DÍAZ et al, 2010). Nas aves, esse efeito não é observado, pois o baço não tem a função de reservatório de eritrócitos (CLARK et al, 2009), assim não seria correto atribuir que a contenção física foi mais estressante, e justificar os valores de hematócrito, eritrócitos e hemoglobina maiores devido a um eritrograma de estresse agudo.

A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) apresentou média estatisticamente mais elevada no momento contenção química.

Uma possível explicação é a hemólise que houve em algumas amostras. Valores elevados de CHGM podem ser devidos à hemólise iatrogênica e/ou processos hemolíticos (CAMPBELL, 2004).

5.1.2 Trombócitos, PPT e Fibrinogênio

Os dados de trombócitos, proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio apresentaram diferença estatística sendo todos menores no momento contenção química (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios \pm desvio padrão de trombócitos, PPT (proteína total plasmática) e fibrinogênio de amostras obtidas de 31 jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e quimicamente com isoflurano.

	Contenção física	Contenção química
Trombócitos	13995,9 ^a	8840,7 ^b
(/μL)	\pm 5284,6	\pm 3644,8
PPT	3,76 ^a	3,09 ^b
(g/dL)	\pm 0,39	\pm 0,33
Fibrinogênio	407,4 ^a	254,8 ^b
(mg/dL)	\pm 265,9	\pm 221,9

^a_b Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas.

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Uma hipótese para a diminuição da quantidade de trombócitos pode ser a maior agregação de trombócitos na segunda coleta de sangue. Na primeira coleta foi utilizado seringa heparinizada de 1 mL e punção de 1 mL na veia ulnar. Na segunda coleta foi utilizada seringa de 3 mL sem anticoagulante e punção da veia jugular e obtenção de 3 mL de sangue, o que pode ter implicado em um maior tempo de coleta e maior tempo para que a amostra entrasse em contato com o anticoagulante, causando maior agregação e conseqüentemente diminuindo a contagem trombocitária. Segundo Russel (2010) o número sucessivo de punções pode também ocasionar lesão vascular, agregação trombocitária e

consequente consumo e diminuição no número de trombócitos.

Para a realização da coleta de sangue se faz necessária a aplicação de leve pressão negativa no êmbolo da seringa enquanto a veia é perfurada, e tal pressão aumenta conforme a agulha é alinhada dentro da veia para facilitar a colheita de sangue. Sucção vigorosa deve ser evitada, pois pode causar hemólise e pode causar estenose à veia, o que conseqüentemente dificulta a retirada de sangue. A falha ao aplicar qualquer pressão negativa resulta tipicamente em vazamento de sangue ao redor da agulha (CLARK, BOARDMAN, RAID, 2009).

Sempre que o vaso sanguíneo é lesado, como no caso da venopunção, ocorre a adesão de trombócitos ao local. A lesão expõe ao sangue periférico a matriz subendotelial e os trombócitos se aderem ao colágeno (DA SILVA & HASHIMOTO, 2006).

Os valores de PPT e fibrinogênio foram significativamente menores no momento contensão química. Em cães, Wright & Hopkins (2008) relataram diminuição na pressão coloidomoscópica e na PPT anestesiados com agente inalatório. Neste caso, se aplicam os mesmos efeitos vasodilatadores e hipotensivos do procedimento anestésico (SANO, et al, 2005), que causam diminuição da pressão hidrostática, primariamente causada pela diminuição da resistência vascular (STEFFEY, et al, 1976), corroborando com outros estudos já realizados (STEFFEY, et al, 1976; SCHINDLER, et al., 1987b; MARINI, et al, 1994; HEARD, 1998; DRESSEN, et al, 1999; DECKARDT, et al, 2007; CARTANA, 2010).

Espera-se que ocorra diminuição dos valores de fibrinogênio juntamente com a PPT de forma proporcional. Neste estudo provavelmente o aumento de

fluido vascular e sequestro funcional dos elementos celulares (CHENG, 1992) ocasionado pelo efeito da anestesia, fez com que a PPT diminuísse na mesma proporção entre albumina e globulinas.

5.1.3 Leucograma

Não ocorreu diferença estatística em nenhum dos valores do leucograma comparando os momentos de contenção física com química. (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios \pm desvio padrão de leucograma de amostras obtidas de 31 jacus (*Penelope obscura*) contidos fisicamente e quimicamente com isoflurano.

Leucograma	Contenção física	Contenção química
Leucócitos totais	10130,0	10628,2
(/ μ L)	\pm 5089,5	\pm 3792,4
Heterófilos	5980,0	6904,7
(/ μ L)	\pm 3367,9	\pm 3089,7
Linfócitos	2400,1	2128,8
(/ μ L)	\pm 1619,0	\pm 941,7
Eosinófilos	236,9	285,3
(/ μ L)	\pm 252,7	\pm 374,4
Basófilos	175,0	204,8
(/ μ L)	\pm 160,8	\pm 193,1
Monócitos	1352,9	1100,9
(/ μ L)	\pm 894,0	\pm 530,5
H/L	3,90	3,95
	\pm 4,96	\pm 3,0

H/L: Relação heterófilo linfócito.

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

O fato de não ter havido diferença estatística no leucograma corrobora com o estudo realizado por Dressen et al. (1999), no qual os gaviões quiriquire foram anestesiados com isoflurano.

Em um estudo com ferrets anestesiados com isoflurano, foi percebido uma diminuição na contagem total de leucócitos (MARINI et al. 1994). Heard et al. (1998) observaram diminuição de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em morcegos anestesiados com isoflurano. No caso de mamíferos, como nesses dois estudos, sugere-se diminuição de leucócitos e eritrócitos devido ao sequestro esplênico causado pela vasodilatação do baço provocado pelo isoflurano.

Em trabalhos onde foram usados de forma repetida, o que não foi o caso deste trabalho, os anestésicos voláteis e opioides deprimiram a atividade celular. Vários parâmetros do sistema imune, em testes *in vivo* e *in vitro* foram afetados pelos anestésicos voláteis (HOMBURGER & MEILER, 2006). Elena et al. (2003) enfatizaram diminuição do número absoluto de leucócitos e linfócitos no sangue de ratos expostos a administrações repetidas de sevoflurano após três dias.

Outra alteração que poderia ser observada seria a diferença ocasionada pelo estresse da contenção física. Segundo Cürule et al. (2012) o estresse produz uma leucocitose fisiológica com heterofilia e linfopenia. Os glicocorticoides provocam influxo de heterófilos desde a medula óssea e atenuam a saída destes para outros compartimentos. Contrariamente, os linfócitos aderem ao endotélio e migram para os tecidos. Também é possível observar a diminuição de eosinófilos. Esta resposta varia em função da espécie e foi observado que a estimulação adrenocortical cursa com leucopenia por linfopenia em aves de rapina e com heteropenia e linfocitose em corvos. Por esta razão foi proposto que uma maneira de quantificar o grau de estresse seria a alteração da razão heterófilos/linfócitos (H/L), que na maioria de espécies vai aumentar (BLACK et al., 2011). A razão entre

heterófilos/linfócitos foi considerada o melhor indicador para o estresse, sendo detectável após 30 minutos e até três horas após o estímulo estressante. Perturbações de longa duração podem afetar a razão H/L, sendo que a magnitude das mudanças nas proporções de leucócitos depende da intensidade e da persistência do estresse. (CÍRULE et al., 2012).

Porém não foi observada nenhuma dessas alterações comparando o momento de contenção física, supostamente com maior estresse agudo, e o momento contenção química.

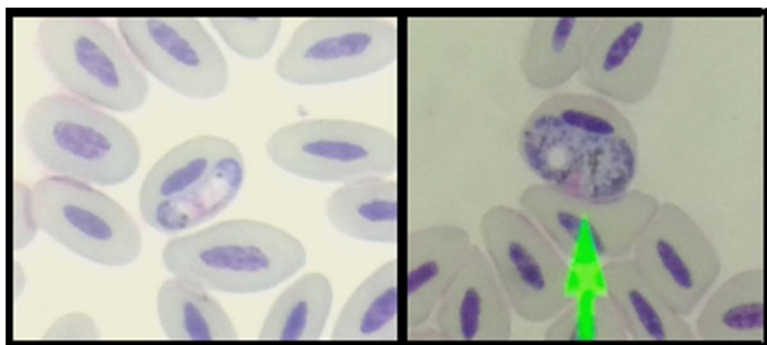
5.2 HEMOPARASITAS

Durante a avaliação das lâminas dos esfregaços sanguíneos foram visualizadas inclusões citoplasmáticas em eritrócitos, compatíveis com *Haemoproteus sp.* em oito animais de um total 32, ou seja 25% (Figura 3).

Protozoários hemoparasitas do gênero *Haemoproteus* são comuns em várias espécies de aves selvagens (SOULSBY, 1992). Tipicamente, a gametogonia ocorre dentro de eritrócitos, enquanto que a esquizogonia ocorre dentro das células endoteliais. Consequentemente, são observados apenas gametócitos dentro de eritrócitos (PIERCE; BENNETT; BISHOP, 1990).

Não foram observadas alterações no hemograma comparando os animais parasitados com os não parasitados. A patogenicidade do *Haemoproteus* costuma ser baixa e as aves parasitadas raramente manifestam sinais de doença.

Figura 3 – Inclusões citoplasmáticas compatíveis com *Haemoproteus* sp. (seta) em esfregaços sanguíneos confeccionados a partir de amostras de sangue coletadas de jacus (*Penelope obscura*).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

No entanto, é possível observar sinais clínicos da infecção em algumas espécies de aves, como pombos e codornizes, em filhotes de aves e em aves acometidas por outras doenças que, possivelmente, causem imunodeficiência. Os sinais clínicos incluem anemia hemolítica, anorexia e depressão (THRALL et al., 2007).

Foram encontrados ectoparasitas na maioria das aves. Segundo Thrall et al (2007) insetos hematófagos vetores, como moscas hipoboscidas e mosquitos-pólvora do gênero *Culicoides*, transmitem *Haemoproteus*.

5.3 BIOQUÍMICA CLÍNICA

As amostras intensamente hemolisadas foram excluídas. Em 12 das 32 amostras com EDTA 3% (37,5%) houve intenso grau de hemólise, sendo estas excluídas (Figura 4). Segundo Jain (1993) o EDTA sequestra os íons Ca^{++} responsáveis pela ativação da bomba de Na^+ e K^+ da membrana celular, permitindo a livre entrada de água para o interior da célula, promovendo seu intumescimento e conseqüente lise.

Figura 4 – Amostra de plasma normal, soro discretamente hemolisado e plasma intensamente hemolisado, respectivamente da direita para esquerda.



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

A coloração amarelada do plasma ou soro das aves está associada com pigmentos carotenoides provenientes da dieta e não deve ser confundido como bilirrubinemia (CAMPBELL, 2004; LUMEIJ, 2008).

Em alguns animais não houve amostra suficiente para realizar todas as dosagens, desta forma está apresentado o número de animais utilizados para cada dosagem na tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios \pm desvio padrão de analitos bioquímicos dosados em amostras de soro, plasma com heparina e plasma com EDTA 3% em jacus (*Penelope obscura*) contidos quimicamente com isoflurano.

Analitos	Amostras			n (S/H/E)
	Soro	Heparina	EDTA	
Ác. Úrico	5,90	5,97	5,50	31/32/20
(mg/dL)	$\pm 1,86$	$\pm 1,85$	$\pm 1,70$	
Ureia	4,81	4,44	4,15	31/32/20
(mg/dL)	$\pm 4,04$	$\pm 4,12$	$\pm 3,38$	
Prot. Total	3,067	3,187	3,442	26/29/19
(g/dL)	$\pm 0,541$	$\pm 0,679$	$\pm 1,069$	
Albumina	1,125 ^b	1,953 ^{a,c}	1,259 ^b	26/28/19
(g/dL)	$\pm 0,200$	$\pm 0,469$	$\pm 0,487$	
Globulinas	1,938 ^b	1,222 ^{a,c}	2,183 ^b	26/28/19
(g/dL)	$\pm 0,390$	$\pm 0,476$	$\pm 0,629$	
FA	131,065	131,969	70,944	31/32/18
(U/L)	$\pm 99,893$	$\pm 96,524$	$\pm 47,650$	
GGT	11,18 ^c	9,290 ^c	2,050 ^{ab}	27/31/20
(U/L)	$\pm 15,665$	$\pm 11,464$	$\pm 3,845$	
ALT	26,346	26,690	27,800	26/29/20
(U/L)	$\pm 22,412$	$\pm 28,586$	$\pm 18,214$	
AST	802,920	821,786	945,158	25/28/19
(U/L)	$\pm 906,257$	$\pm 852,183$	$\pm 971,374$	
CK	159,563	179,739	500,563	16/23/16
(U/L)	$\pm 241,796$	$\pm 254,055$	$\pm 844,888$	
Glicose	328,923	315,759	283,684	26/29/19
(mg/dL)	$\pm 58,315$	$\pm 53,847$	$\pm 78,228$	
Lipase	25,680	30,214	25,947	25/28/18
(U/L)	$\pm 26,471$	$\pm 38,380$	$\pm 54,622$	
Colesterol	179,615	177,586	178,421	26/29/19
(mg/dL)	$\pm 59,726$	$\pm 58,045$	$\pm 43,817$	
Triglicérides	78,192	73,966	83,842	26/29/19
(mg/dL)	$\pm 30,635$	$\pm 31,108$	$\pm 44,520$	
Cálcio	5,450 ^c	6,004 ^c	0,781 ^{ab}	26/28/8
(mg/dL)	$\pm 1,804$	$\pm 1,998$	$\pm 0,281$	

n (S/H/E): número amostras de soro, heparina e EDTA 3%.

^a Diferenças estatísticas significativas com soro.

^b Diferenças estatísticas significativas com plasma com heparina.

^c Diferenças estatísticas significativas com plasma com EDTA 3%.

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Os valores de albumina foram maiores nas amostras de plasma com heparina quando comparados com soro e EDTA 3%, corroborando com resultados similares encontrados por outros autores, que encontraram valores significativamente mais elevados no plasma heparinizado de aves do que no soro (MOHRI, NARENJI SANI, MASOODI, 2009). O mesmo foi evidenciado em um trabalho com galinhas (HRUBEC et al., 2002). Em um estudo com ovelhas realizado por Mohri e Rezapoor (2009) também encontraram o mesmo resultado.

Em estudo realizado em papagaio do mangue (*Amazona amazonica*) os valores de proteínas totais foram superiores no plasma heparinizado, sugerindo poder existir diferenças no metabolismo do eritrócito nucleado para diferentes espécies de aves, permitindo alterações de outras frações proteicas por absorção ou liberação de proteínas por células do sangue (HAWKINS et al., 2006).

Segundo a bula do kit utilizado, o fabricante não recomenda a utilização de plasma para realizar a dosagem.

Foram observadas que as concentrações de albumina medidas com verde de bromocresol (BCG) se mostraram maiores em amostras de plasma heparinizado em cães. Concluiu-se que a combinação da heparina com o fibrinogênio foi em grande parte responsável pela maior concentração de albumina no plasma heparinizado com esse método (STOKOL, TARRANT, SCARLETT, 2001).

O método utilizado para dosagem de albumina no presente estudo foi o BCG, justificando os valores maiores obtidos no plasma com heparina. Assim, houve interferência direta nos valores de globulinas, pois, os

valores de globulinas neste trabalho foram obtidos subtraindo o valor de albumina do valor de proteínas totais.

A principal diferença entre plasma e soro é a presença do fibrinogênio no plasma, que por ação do anticoagulante este composto não é utilizado na cascata de coagulação. Deste modo, a concentração de sólidos totais no plasma será maior que no soro (MELILLO, 2013).

Os valores de Gama glutamiltransferase (GGT) foram menores no plasma com EDTA 3% do que no plasma com heparina e soro. Em muitas aves saudáveis, a atividade desta enzima está abaixo dos níveis de sensibilidade de muitos testes (HOCHLEITHNER, 1994), corroborando com o ensaio realizado neste estudo.

Segundo Hochleithner (1994) a peculiaridade desta enzima é que precisa ser analisada no plasma colhido com EDTA, pois a heparina interfere no teste causando turbidez. Thoresen et al. (1992) observaram discrepância entre soro e plasma heparinizado ao mensurar GGT em cães. Mohri, Moosavian e Hadian (2008) observaram diminuição desta enzima no plasma com heparina em dromedários.

Por outro lado, este estudo corroborou com trabalhos em que não ocorreram diferenças nos valores de GGT entre soro e plasma heparinizado como em equinos (MOHRI, ALLAHYARI, SARDARI, 2007), ovinos (MOHRI e REZAPOOR, 2009), felinos (KALAMARI e MOHRI, 2015) e avestruzes (MOHRI, NARENJI SANI, MASOODI, 2009).

Como esperado, houve diferença estatística nos valores de cálcio, sendo diminuídos nas amostras de plasma com EDTA 3% em relação as amostras de plasma com heparina e soro. O EDTA incorpora o cálcio por meio das ligações bivalentes do oxigênio existentes

em sua estrutura, fechando-o numa cadeia heterocíclica, esta reação é do tipo quelação, sendo o quelato de cálcio o produto resultante (AMANN & PICKETT, 1987). Na maioria das amostras com EDTA 3% houve total quelação do cálcio, inviabilizando a mensuração.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com a metodologia adotada, pode-se concluir que para a espécie *Penelope obscura*:

O anestésico inalatório isoflurano influenciou nos resultados hematológicos e deve ser levado em consideração na interpretação dos resultados. Não foram evidenciadas alterações hematológicas relativas ao estresse comparando a contenção física com a contenção química.

Tanto soro como plasma heparinizado ou com EDTA 3% podem ser utilizados na avaliação da bioquímica clínica da maioria dos metabólitos e enzimas avaliados, a não ser pela Albumina no plasma com heparina; e GGT e Cálcio no plasma com EDTA 3%.

Mais estudos em aves com diferentes anticoagulantes são necessários para que haja convergência das informações para bioquímica clínica em soro ou plasma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, R. B.; CLUBB, S. L.; DORRESTEIN, G. M.; QUESENBERRY, K. **Avian Medicine and Surgery**. 1.ed. USA: W.B. Saunders Company, 1997.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

BENSON, G. J; THURMON, J. C; TRANQUILLI, W. J. **Veterinary Anesthesia - Lumb & Jones**. Urbana, Illinois: Williams & Wilkins, 1996.

BLACK, P. A.; MCRUER, D. L.; HORNE, L. Hematologic parameters in raptor species in a rehabilitation setting before release. **Journal of Avian Medicine and Surgery**. v. 25, n. 3, p.192-198, 2011.

CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, p. 215-247 e 479-492, 2004.

CAMPBELL, T. W.; ELLIS, C. K. **Avian and exotic animal hematology and cytology**. 3 ed. Iowa: Blackwell Publishing, p.287, 2007.

CÂNDIDO, M. V. **Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: cracidae**. 2008. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L.. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 16, n. 1, p. 71–120, 2013.

CARTANA, C. B. **Transfusão de sangue obtido de doadores anestesiados com cetamina e xilazina ou isoflurano em gatos hipovolêmicos**. Dissertação de mestrado. 71 f. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.

CASAS-DÍAZ, E; MARCO, I; LÓPEZ-OLVERA, JR; MENTABERRE, G; LAVÍN, S. Use of acepromazine for stress control in Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) captured by drive-net. **The Veterinary Journal**. 183:332-336, 2010.

CERON, J.J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; HENNEMANN, C.; TECLES, F. **The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry**. *Vet J* 167:294–301. 2004.

CHENG, D. C.; MOYERS, J. R.; KNUTSON, R. M.; GOMEZ, M. N.; TINKER, J. H. Dose-response relationship of isoflurane and halothane versus coronary perfusion pressures. Effects on flow redistribution in a collateralized chronic swine model. **Anesthesiology**. v. 76, p. 113-122, 1992.

CLARK, P; BOARDMAN, W; RAID, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Oxford: Blackwell Publishing; 2009.

CİRULE, D.; KRAMA, T.; VRUBLEVSKA, J.; RANTALA, M. J; KRAMS, I. A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress? **Journal of Ornithology**, Heidelberg, v. 153, p. 161-166, 2012.

CRAY, C.; ZAIAS, J. Laboratory procedures. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 7, n. 2, p. 487–518, 2004.

CURRO, T.G. Anesthesia of Pet Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. Madison, v. 7. Jan, p. 10-21, 1998.

DA SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária**. Revinter, 2006.

DECKARDT, K.; WEBERA, I.; KASPERSA, U.; HELLWIGA, J.; TENNEKESB, H.; VAN RAVENZWAAYA, B. The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1709-1718, 2007.

DEL HOYO, J. Family Cracidae. In: **Handbook of the Birds of the World: New World vultures to guineafowl**. (Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. Eds.), Lynx Edic., Barcelona, p. 310-363, 1994.

DRESSEN, P. J.; WIMSATT, J.; BURKHARD, M. The effects of isoflurane anesthesia on hematologic and plasma biochemical values of American Kestrels (*Falco sparverius*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 13, n. 3, p. 173-179, 1999.

ELENA, G.; AMERIO, N.; FERRERO, P.; BAY, M. L.; VALENTI, J.; COLUCCI, D.; PUIG, N. R. Effect of repetitive sevoflurane anesthesia on immune response, selected biochemical parameters and organ histology in mice. **Laboratory Animals**. v. 37: p. 193-203, 2003.

EVANS, G. O. **Animal Clinical Chemistry**. London: Taylor & Francis, p 222, 1996.

FORTIN, M. **Fundamentos e Etapas do Processo de Investigação**. Lusodidacta. Loures. 2009.

GLICK, Y. A; WILSON, L. D; AIELLO, J. Hematocrit and metabolic changes caused by varied resuscitation strategies in canine model of hemorrhagic shock. **American Journal of Emergency Medicine**. v. 20, n. 4, p 303-309, 2002.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 864. 1997.

HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 31, n. 3, p. 140–151, 2002.

HARRISON & HARRISON, **Avian Medicine: Principles and Application**. 1 ed. Flórida, Lake Worth: Wings Publishing Inc, 1994.

HAWKINS, M. G.; KASS, P. H.; ZINKL, J. G.; TELL, L. A. Comparison of biochemical values in serum and plasma, fresh and frozen plasma, and hemolyzed samples from orange-winged Amazon parrots (*Amazona amazonica*). **Veterinary Clinical Pathology**. v. 35, n. 2, p. 219-225, 2006.

HEARD, D. J.; HUFT, V. J. The effects of short-term physical restraint and isoflurane anesthesia on hematology and plasma biochemistry in the Island Flying Fox (*Pteropus hypomelanus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 1, p. 14-17, 1998.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, p. 230, 1994.

HOMBURGER, J. A.; MEILER, S. E. Anesthesia drugs, imunity, and long term outcome. **Curr Opin Anesthesiology**. v. 19, p. 423-8, 2006.

HRUBEC, T. C.; WHICHARD, J. M.; LARSEN, C. T.; PIERSON, F. W. Plasma versus serum: specific differences in biochemical analyte values. **Journal of avian medicine and surgery**, v. 16, n. 2, p. 101-105, 2002.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <http://www.redlist.org/search/>. Acessado em 23/11/2013.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 1221, 1986.

JAIN, N. C. Coagulation and its disorders. In: JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia, Lea & Fabiger. p. 82–104, 1993

KAMALI, H.; MOHRI, M. Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of cat: comparison with serum. **Revue Méd. Vét.** v.166, n. 9, p 275-279, 2015.

LUDDERS, J. W. Inhaled Anesthesia for Birds. In: GLEED, R. D.; LUDDERS, J. W. **Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia**: Companion Animals. 2001.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. Waltham: Academic Press, p. 839-872, 2008.

MARINI, R. P.; JACKSON, L. R.; ESTEVES, M. I.; ANDRUTIS, K. A.; GOSLANT, C. M.; FOX, J. G. Effect of isoflurane on hematologic variables in ferrets. **American Journal of Veterinary Research**. v. 55, p.1479-1483, 1994.

MARQUES, M. V. R. Galiformes (Aracua, Jacu, Jacutinga, Mutum e Uru). In: CUBAS, Z. S. et al. Tratado de Animais Selvagens. 2 ed. v. 1. São Paulo: Roca. Cap. 21. 2014.

MELILLO, A. Applications of serum protein electrophoresis in exotic pet medicine. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 16, n. 1, p. 211–225, 2013.

MOHRI, M.; ALLAHYARI, L.; SARDARI, K. Effects of Common Anticoagulants on Routine Plasma Biochemistry of Horse and Comparison with Serum. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 27 , n. 7 , p. 313 – 316, 2007.

MOHRI, M.; MOOSAVIAN, H. R.; HADIAN, M. J. Plasma biochemistry of one-humped camel (*Camelus dromedarius*): Effects of anticoagulants and comparison with serum, **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 554-558, dezembro, 2008.

MOHRI, M.; NARENJI SANI, R.; MASOODI, R. Plasma biochemistry of ostrich (*Struthio camelus*): effects of anticoagulants and comparison with serum. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 6, p. 845, 2009.

MOHRI, M.; REZAPOOR, H. Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: Comparison with serum, **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 111-114, fevereiro, 2009.

NATT, M.P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v.31, p.735-738, 1952.

PAUL-MURPHY, J.; FIALKOWSKI, J. Injectable anesthesia and analgesia of birds. **Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals. International Veterinary Information Service, Ithaca Document**. n. A1409, 2001.

PEIRCE, M. A.; BENNETT, G. F.; BISHOP, M. The haemoproteids of the avian order Falconiformes. **Journal of Natural History**. v. 24, p. 1091–1100, 1990.

PONJOAN, A.; BOTA, G.; MORENA, E. L. G.; MORALES, M. B.; WOLFF, A.; MARCO, I.; MAÑOSA, S. Adverse effects of capture and handling little bustard. **The Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 72, n. 1, p. 315-319, 2008.

RUSSELL, K., E. Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia. In: SCHALM, O. W, **Veterinary Hematology**. 6. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, p. 579, 2010.

SANO, Y.; SAKAMOTO, A.; OI, Y.; OGAWA, R. Anesthesia and circulating blood volume. **European journal of Anesthesiology**. v. 22, p. 258-262, 2005.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SCHALM, O. W.; SMITH, R; KANEKO, J. J. Plasma protein: fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses. Part 1. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. **California Vet**, v. 24, p. 9-11, 1970.

SCHINDLER, S; GILDERSLEEVE, R. P; THAXTON, J. P; McREE, D. I. Hematological response of Japanese quail after blood volume replacement with saline. **Comparative Biochemistry and Physiology: Physiology**. v. 87, p. 933-945, 1987.a

SCHINDLER, S; GILDERSLEEVE, R. P; THAXTON, J. P; McREE, D. I. Blood volume recovery in hemorrhaged japanese quail. **Comparative Biochemistry and Physiology: Physiology**. v. 88, p. 95-100, 1987.b

SOULSBY, E. J. L.; Helminths, arthropods, and protozoa of domesticated animals. 7 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982.

SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; GODOY, C. M. S. C.; MOTTA, M. C. Effect of temperature and time storage of metabolites in the plasma of rats weaned. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.4, p. 317-321, set./out./nov. 2012.

STEFFEY, E. P.; GILLESPIE, J. R.; BERRY, J. D.; EGER, E. I.; SCHALM, O. W. Effect of halothane and halothane-nitrous oxide on hematocrit and plasma protein concentration in dog and monkey. **American Journal of Veterinary Research**. v. 37, p. 959-962,1976.

STOKOL, T.; TARRANT, J. M.; SCARLETT, J. M. Overestimation of Canine Albumin Concentration with the Bromcresol Green Method in Heparinized Plasma Samples. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 30, n. 4, p. 170–176, Dezembro, 2001.

STRAHL, S. D., GRAJAL, A. **Conservation of Large Avian Fugivores and the Management of Neotropical Protected Areas**. Oryx, v. 25, p. 50-55,1991.

THORESEN, S. I.; HAVRE, G. N.; MORBERG, H.; MOWINCKEL, P. Effects of Storage Time on Chemistry Results from Canine Whole Blood, Heparinized Whole Blood, Serum and Heparinized Plasma. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 21, n. 3, p. 88–94, Setembro, 1992.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Lippincott: Williams & Wilkins, p. 618, 2004.

THRALL, M. A. Classificação e Diagnóstico de Anemia In **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, p. 558, 2007.

THRALL, M. A. Hematologia de Mamíferos Não Domésticos, Aves, Répteis, Peixes e Anfíbios Comuns In **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, p 234, 2007.

THRALL, M. A. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo In **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, p 376, 2007.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. (Ed.). **Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia**. Blackwell, p. 856, 2007.

VILANI, R. G. D. C. Anestesia Injetável e Inalatória. In: CUBAS, Z. S. et al. **Tratado de Animais Selvagens**. 2 ed. v. 1. São Paulo: Roca, cap. 97, 2014.

VILLA, L. G. **Hematologia em Aves: Revisão de Literatura**. 2013. Seminários Aplicados (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

WALBERG, J. White blood cell counting techniques in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 2, p. 72-76, 2001.

WRIGHT, B. D.; HOPKINS, A. Changes in colloid osmotic pressure as a function of anesthesia and surgery in the presence and absence of isotonic fluid administration in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**. v. 35, n. 4, p. 282–288, jul, 2008.

ANEXOS

Anexo A – Número de referência, método de mensuração e tipo de amostra; contidos nas instruções de uso dos kits Labtest.

Analito	Ref.	Método	Amostra
Ác. Úrico	140-1	Colorimétrico (Enzimático Trinder).	Soro ou plasma (EDTA ou heparina).
Ureia UV	104-2	Enzimático UV	Soro ou plasma (EDTA ou heparina).
Prot. Total	99	Colorimétrico (Biureto).	Soro.
Albumina VET	1007	Colorimétrico (Verde de Bromocresol).	Soro. Não usar plasma.
FA	40	Colorimétrico (Roy modificado).	Soro ou plasma (heparina).
GGT Liquiform	105-2	Szasz modificado.	Soro ou plasma (EDTA).
ALT Liquiform	108	Cinético UV-IFCC.	Soro ou plasma (EDTA ou heparina).
AST Liquiform	109-2	Cinético UV-IFCC.	Soro ou plasma (EDTA ou heparina).
CK NAC	117	UV-IFCC.	Soro ou plasma (EDTA ou heparina).
Glicose Liquiform VET	1012	GOD-Trinder.	Soro ou plasma.
Lipase Liquiform	107	Enzimática colorimétrica.	Soro ou plasma (heparina).
Colesterol Liquiform	76-2	Colorimétrico (Enzimático de Trinder).	Soro. Não utilizar plasma com EDTA.
Triglicérides Liquiform	87-2	Colorimétrico (Reação de Trinder).	Soro ou plasma (EDTA).
Cálcio Liquiform	90	Colorimétrico (CPC-cresoltaleína).	Soro ou plasma (heparina).

Fonte: Labtest Diagnóstica SA.