

JÚLIA BRAGA MORAIS

**BIOQUÍMICA CLÍNICA DE PINGUINS-DE-
MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) EM
SORO E PLASMA 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: Dr^a Mere Erika Saito
Coorientadora: Dr^a Letícia Andreza
Yonezawa

**LAGES, SC
2016**

Moraes, Julia B.

Bioquímica clínica de pinguins-de-Magalhães
(*Sphehiscus magellanicus*) em soro e plasma com
diferentes anticoagulantes / Julia B. Moraes. Lages
- 2016.

122 p.

Orientadora: Mere Erika Saito

Co-orientadora: Leticia Andreza Yonezawa

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

1. conservação de aves marinhas. 2. análises
laboratoriais. 3. preparação da amostra. 4. avaliação
para reintrodução. 5. redução da hemólise. I. Erika
Saito, Mere. II. Andreza Yonezawa, Leticia. ,
.III. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

JÚLIA BRAGA MORAIS

BIOQUÍMICA CLÍNICA DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) EM SORO E PLASMA COM DIFERENTES ANTICOAGULANTES

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

Membros da Banca Examinadora

Mere Saito
Profª Drª Mere Erika Saito
Universidade do Estado de Santa Catarina - Lages, SC

Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas
Drª Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas
Associação R3 Animal, Centro de Triagem de Animais
Silvestres – Florianópolis, SC.

Aury Nunes de Moraes
Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Universidade do Estado de Santa Catarina - Lages, SC.

Lages, 04/07/2016

"Tudo vale a pena se a alma não é pequena"
- Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus. Viver é uma dádiva lindíssima e é importante nos lembremos disso sempre, principalmente durante as intempéries ou desafios, que são, na realidade, lições indispensáveis para evoluirmos e fazerem sobressair o nosso propósito.

Agradeço à minha mãe, por tudo (menos pelas edições aos agradecimentos...). Toda a minha vida será em vão se ela não souber o quanto a amo e aprecio. Não obstante, agradeço ao meu pai pelo dom da alegria de viver, meu bem mais inestimável. Agradeço aos dois pelo exemplo de pessoas que são, pelo amor e dedicação incondicional que sempre tiveram como família para comigo e meu irmão. 'E a ti, bro, agradeço-te pela paciência e carinho: que nada nunca nos separe'.

Agradeço aos meus amigos, dos dois lados do Atlântico, por partilharem o caminho comigo, como só eles sabem. Agradeço à minha orientadora, professora Mere Erika Saito, por ter acreditado em mim e me ter apoiado apesar de todas as minhas confusões. Agradeço à equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário, à professora e doutoranda Julieta Volpato, pelo exemplo de amizade no ambiente de trabalho, aos pós-graduandos Adson Costa, Rozy Antunes, Carla Cancelier, Paulo Todeschini (Paulinho) e Maysa Garlet, por toda a ajuda profissional e por me fazerem sentir em casa, todos os dias passados no laboratório. Aos professores e pós-graduandos do programa Ciência Animal. Ao Matheus e à Marzia, pela ótima parceria no trabalho com os pinguins e não só. À Drª Cristiane Kolesnikovas por

permitir que o estudo fosse possível e por me ensinar a estar sempre preparada. Ao professor Aury Nunes de Moraes, à Dr^a Claudia Niemeyer e a todos os envolvidos neste trabalho. Obrigada a todos!

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

E, claro, agradeço aos pinguins pela sua colaboração! Sinto uma enorme admiração e respeito por eles: seres pacíficos, fiéis e destemidos, que merecem as melhores condições de vida que lhe pudermos proporcionar.

RESUMO

MORAIS, J.B. Bioquímica clínica de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em soro e plasma 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.

O pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), animal considerado como Quase Ameaçado pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), visita anualmente as águas costeiras do Sul do Brasil durante a sua migração natural de inverno. Devido às crescentes ameaças antropogênicas, tem aumentado o número de indivíduos juvenis debilitados que são resgatados na costa de Santa Catarina e levados para centros de reabilitação para serem clinicamente tratados e avaliados para soltura. Este pensa-se ser um importante passo na conservação desta espécie, permitindo aos grupos resgatados um retorno seguro às suas colónias de reprodução, no sul da Argentina. A bioquímica clínica é uma importante ferramenta no diagnóstico laboratorial para auxiliar na avaliação da saúde de aves selvagens, uma vez que os sinais clínicos nestes animais são muitas vezes pouco expressivos. Em 2010, as autoridades ambientais e marinhas brasileiras compilaram um manual de campo propondo a padronização dos métodos de diagnóstico a aplicar em centros de reabilitação de pinguins, com vista a melhorar o sucesso na sua reintrodução. Estas diretrizes recomendam o plasma com heparina ou ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) para a hematologia e o soro para a análise bioquímica.

No presente trabalho pesquisou-se a viabilidade da utilização de plasma na análise bioquímica, no sentido de tentar minimizar o volume de sangue amostrado e material dispendido, favorecendo uma recuperação mais rápida e maximizando recursos. Recolheram-se amostras de soro e plasma com dois anticoagulantes, EDTA 3% e heparina de sódio, de 34 pinguins resgatados e em estágio de avaliação para reintrodução no Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS) de Florianópolis. Os valores de 15 analitos bioquímicos foram determinados no laboratório de Patologia Clínica do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (LPC-CAV-UDESC), nomeadamente: Ácido Úrico (ACU), Albumina (ALB), Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Colesterol (CHOL), Creatinaquinase (CK), Fosfatase Alcalina (FA), Gamma Glutamiltransferase (GGT), Glicose (GLU), Globulinas, Lactato Desidrogenase (LDH), Proteínas totais (PT), Triglicérides (TG), Ureia (UR), e hemoglobina livre (HB). A hemólise foi avaliada por dois métodos diferentes e excluíram-se os valores das amostras localizados fora dos limites de HB de referência propostos quer pelo fabricante do reagente ou por estudos anteriores sobre a influência da hemólise na bioquímica de aves. Os resultados mostraram que o EDTA foi menos eficiente do que a heparina na minimização da hemólise *in vitro*. Encontrou-se um menor número de diferenças significativas entre amostras de soro e plasma heparinizado. Todos os valores médios de indivíduos saudáveis medidos no plasma heparinizado situaram-se nos intervalos de referência da Associação de Zoológicos e Aquários (AZA), em contraste com o soro e

o plasma com EDTA. Como conclusão, verificou-se que, para a metodologia adotada, apesar de algumas limitações na medição de albumina e triglicérides, o plasma heparinizado, ao contrário do plasma com EDTA, é uma amostra confiável na determinação da maioria dos analitos avaliados em pinguins-de-Magalhães de reabilitação.

Palavras chave: conservação de aves marinhas, análises laboratoriais, preparação da amostra, avaliação para reintrodução, redução da hemólise.

ABSTRACT

MORAIS, J.B. **Clinical biochemistry of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in serum and plasma with different anticoagulants.** 2016.

Dissertation (Msc Animal Science. Area: Animal Health and Pathology) - University of Santa Catarina State. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2016.

The Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*), considered as Near Threatened by the International Union of Conservation of Nature (IUCN), is an annual visitor of Southern Brazil's coastal waters during their natural austral winter migration. Due to growing anthropogenic threats, an increasing number of debilitated juvenile individuals is rescued in the coast of Santa Catarina and taken to rehabilitation centers to be clinically treated and evaluated for re-introduction. This constitutes an essential step for this species conservation, allowing rescued groups a safe return to their breeding colonies, in South Argentina. Biochemical analysis is an important tool to assist in the health evaluation and disease diagnostics of wild birds because the clinical signs in these animals are often inexpressive. A field manual compiled by Brazilian environmental and marine authorities in 2010 proposed standardizing the diagnostic methods applied in penguin rehabilitation facilities. These guidelines recommend plasma with heparin or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) for hematology and serum for biochemistry analysis.

In this work we tested the viability of plasma for biochemistry analysis in an attempt to minimize blood sampling volume and material, favoring a faster recovery and maximizing resources. The samples of serum and

plasma with two anticoagulants, EDTA 3% and sodium heparin, were obtained from 34 rescued penguins considered for re-introduction evaluation at the Wild Animal Screening Center (CETAS) of Florianópolis. Fifteen biochemical analytes were determined at the laboratory of Clinical Pathology in the Agro-Veterinary Sciences Center of the University of the State of Santa Catarina (LPC-CAV-UDESC), namely: uric acid (ACU), albumin (ALB), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), cholesterol (CHOL), creatine kinase (CK), alkaline phosphatase (FA), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), glucose (GLU), globulins, lactate dehydrogenase (LDH), total proteins (PT), triglycerides (TG), urea (UR) and free hemoglobin (HB). Hemolysis was assessed by two different methods; and sample values outside of referenced HB limits, proposed by either the reagent manufacturer or previous avian biochemistry studies, were excluded. Results showed that EDTA was less efficient than heparin in minimizing *in-vitro* hemolysis. Statistical differences between serum and plasma samples were fewer in heparinized samples. All mean values of heparinized plasma samples from healthy individuals fell within AZA (Association of Zoos and Aquariums) reference intervals, in contrast to serum and plasma with EDTA. As a conclusion, we verified that for the adopted methodology, despite some limitations in albumin and triglycerides measurement, heparinized plasma, unlike plasma/EDTA, is a reliable sample in determining most analytes evaluated in Magellanic penguins during rehabilitation.

Keywords: marine bird conservation, laboratory analysis, sample preparation, reintroduction evaluation, hemolysis reduction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de amostra utilizados na literatura bioquímica de pinguins do gênero <i>Spheniscus</i> spp.....	40
Tabela 2 - Instruções de uso dos kits Labtest e valores máximos de hemoglobina (HB máx) aceites pelo fabricante e na literatura de aves sem causar interferência na determinação dos analitos.	67-68
Tabela 3 - Valores médios/medianos da concentração ou atividade enzimática dos analitos bioquímicos de <i>Spheniscus magellanicus</i> em amostras de soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA)	74-75
Tabela 4 - Valores médios/medianos dos analitos dosados em soro, plasma/EDTA 3% e plasma/heparina no presente estudo e os valores da literatura ou intervalo de referência da Associação de Zoológicos e Aquários (AZA) para <i>Spheniscus magellanicus</i>	77
Tabela 5 - Concentração plasmática média das proteínas totais mensuradas por refratometria e por espectrofotometria.....	78
Tabela 6 – Estimativa do grau de hemólise <i>in vitro</i> nos diferentes tipos de amostra baseada nos valores medianos da classificação visual (final e inicial) e da concentração de hemoglobina livre.....	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Colheita de sangue de pinguim-de-Magalhães por contenção física e venopunção jugular..... 63
- Figura 2 - Exemplos da classificação visual do grau de hemólise nas amostras de soro/plasma: (A) amostra sem hemólise a discretamente hemolisada (0-0,5-1); (B) hemólise discreta a moderada (1-1,5-2) ou (C) de moderada a intensa (2-2,5-3) 64
- Figura 3 - Coágulo de fibrina no soro (seta) 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACU	Ácido úrico
ALB	Albumina
ALT	Alanina Aminotransferase
AMY	Amilase
AST	Aspartato Aminotransferase
AZA	Associação de Zoológicos e Aquários
BCG	Verde de Bromocresol
BCP	Púrpura de Bromocresol
C24	Ácidos biliares
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAV	Ciências Agroveterinárias
CETAS	Centro de Triagem de Animais Selvagens
CEMAVE	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Selvagens
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHOL	Colesterol
CK	Creatinaquinase
CREA	Creatinina
DBIL	Bilirrubina direta
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELECT	Electrólitos
FA	Fosfatase alcalina
FES	Fibrinogénio
GGT	Gamma Glutamiltransferase
GLU	Glicose
HB	Hemoglobina
HB máx	Limite máximo de hemoglobina
HCV	Hospital de Clínica Veterinária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IFAW	Fundo Internacional para o Bem-Estar Animal
LDH	Lactato desidrogenase
LPC	Laboratório de Patologia Clínica
PT	Proteínas totais
SBPC	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica
SISBIO	Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade
TAG	Grupo de Consultoria sobre Táxon
TBIL	Bilirrubina total
TG	Triglicérides
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UR	Ureia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	25
1.1.1 Objetivo geral.....	25
1.1.2 Objetivos específicos.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 PINGUIM-DE-MAGALHAES NO BRASIL.....	26
2.2 BIOQUÍMICA CLÍNICA EM AVES	31
2.2.1 Fatores Pré-analíticos	33
2.2.1.1 Tipo de amostra	34
2.2.1.2 Hemólise.....	37
2.2.2 Fatores Analíticos e Pós-analíticos	41
2.2.2.1 Ácido Úrico (ACU)	41
2.2.2.2 Albumina (ALB)	44
2.2.2.3 Alanina Aminotransferase (ALT)	45
2.2.2.4 Aspartato Aminotransferase (AST)	46
2.2.2.5 Colesterol (CHOL).....	48
2.2.2.6 Creatinaquinase (CK)	48
2.2.2.7 Fosfatase Alcalina (FA)	49
2.2.2.8 Gamma Glutamiltransferase (GGT).....	50
2.2.2.9 Glicose (GLU).....	51
2.2.2.10 Lactato Desidrogenase (LDH)	53
2.2.2.11 Proteínas totais (PT).....	54
2.2.2.12 Triglicérides (TG)	56
2.2.2.13 Ureia (UR)	59
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1 ANIMAIS.....	61
3.2 AMOSTRAS DE SANGUE	62
3.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA	65
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4 RESULTADOS.....	71
5 DISCUSSÃO	80
5.1 ALBUMINA (ALB)	82
5.2 ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)	85

5.3 COLESTEROL (CHO).....	85
5.4 CREATINAQUINASE (CK)	86
5.5 FOSFATASE ALCALINA (FA) 75	89
5.6 GAMMA GLUTAMILTRANSFERASE (GGT)	90
5.7 PROTEÍNAS TOTAIS (PT)	91
5.8 TRIGLICÉRIDES (TG)	94
5.9 GLOBULINAS	96
5.10 GRAU DE HEMÓLISE	98
6 CONCLUSÃO	103
7 REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

Zelar pela conservação da Natureza é um dever de todos os cidadãos, porém, os médicos veterinários de animais selvagens têm a responsabilidade acrescida de contribuir diretamente para a manutenção da saúde da fauna. Esta tarefa tem ganhado importância nos últimos anos, pois os impactos do homem têm-se refletido cada vez mais na vida selvagem.

Os pinguins, devido às suas longas rotas migratórias, são considerados “espécies guarda-chuva” pois o sucesso na sua conservação leva, consequentemente, à proteção de muitas outras espécies que partilham o mesmo habitat (BOERSMA, 2008). Atualmente, crescentes ameaças antropogênicas comprometem a migração invernal destes animais visitantes do litoral do Brasil. Como tal, estas aves são frequentemente resgatadas nas praias brasileiras e levadas para centros de reabilitação, onde são clinicamente tratadas e avaliadas para soltura, constituindo um importante passo na sua conservação.

Uma vez que estas aves selvagens frequentemente ocultam sinais de doenças até estágios muito avançados, é importante apostar na avaliação laboratorial das mesmas (VILLA, 2013).

Como o tipo e qualidade de amostra biológica colhida afeta a interpretação dos resultados laboratoriais, é essencial comparar os diferentes métodos de amostragem de modo a entender a sua influência e obter resultados mais fidedignos na avaliação clínica de pinguins-de-Magalhães em reabilitação.

Em conjunto com a hematologia e exame físico efetuados para avaliação clínica dos pinguins-de-Magalhães em reabilitação, a análise bioquímica fornece dados para um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais adequado, além de contribuir para a obtenção de um quadro clínico mais completo e mais compatível com a verdadeira capacidade do animal para uma futura reintrodução na natureza. No entanto, o baixo volume sanguíneo disponível para colheita em aves selvagens em recuperação leva frequentemente à exclusão destes testes nos protocolos de avaliação clínica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi comparar os resultados das análises bioquímicas de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) realizados em soro e em plasma com diferentes anticoagulantes (EDTA e heparina - os mais comumente utilizados na hematologia destas aves).

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a viabilidade dessas amostras nas análises de bioquímica sanguínea de pinguins-de-Magalhães em reabilitação;
- b) Auxiliar na padronização do método de colheita de sangue desses animais, permitindo um aumento de dados na sua avaliação clínica com um mínimo de volume de sangue colhido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PINGUIM-DE-MAGALHAES NO BRASIL

O pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), também conhecido como pinguim da Patagônia, é nativo e exclusivo da América do Sul. É um pinguim de tamanho médio, com comprimento médio de 48 cm. A massa corporal varia consoante a época do ano oscilando de 1,8 kg, na época do jejum, a 6 kg, no início da muda de plumagem. Os machos são geralmente maiores, com bicos mais largos e cloacas menores, mas fora isso não existe dimorfismo sexual, sendo a sexagem dependente de técnicas moleculares. A distinção dos animais adultos e juvenis se faz pelas diferenças da plumagem, sendo que o juvenil é mais cinzento e não possui as características faixas brancas na cabeça, pescoço e peito (BORBOROGLU e BOERSMA, 2013).

Quanto à sua distribuição, há que fazer distinção entre as regiões de reprodução e as regiões de migração invernal. O pinguim-de-Magalhães apenas se reproduz em colônias na Argentina e no Chile. Tipicamente a partir

de fins de Abril, adultos e juvenis deixam as colônias de reprodução e migram para o norte, tanto no oceano Atlântico (até ao sul do Brasil) como no Pacífico (até a região central do Chile). No período da migração invernal o pinguim-de-Magalhães passa a maior parte do tempo, senão todo, em alto mar. Foi já relatada a presença de animais desgarrados ou perdidos, ou seja, indivíduos ou pequenos grupos em regiões atípicas como o nordeste do Brasil ou até mesmo a África e a Península Antártica. Os pinguins de reabilitação do presente trabalho, são considerados visitantes anuais normais, não constituindo animais desgarrados (MÄDER et al 2010; SICK, 1997).

Estima-se que a população atual do pinguim-de-Magalhães esteja entre 1,2 e 1,6 milhões de pares reprodutores, havendo uma tendência de declínio populacional nas suas maiores colônias ao sul (Punta Tombo e Isla Leones). Acredita-se que esta tendência esteja relacionada com uma expansão da área de reprodução para o norte (POZZI et al, 2015).

Os pinguins são particularmente sensíveis às alterações em seu ecossistema; o pinguim-de-Magalhães em particular está atualmente descrito como

“espécie quase ameaçada” pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2015).

Os principais eventos que compõem o ciclo anual dos pinguins são reprodução (acasalamento, incubação, guarda, cresce e emancipação), muda de plumagem e migração invernal. No período que antecede a muda de plumagem, os animais forrageiam intensamente para armazenarem energia sob a forma de reservas adiposas, uma vez que a muda é feita em terra, em jejum até 4 semanas (SICK, 1997; SILVA e RUOPPOLO, 2006).

Assim, os exemplares que surgem na costa brasileira encontram-se na fase de migração invernal, pós-muda. Trata-se, na sua maioria, de juvenis e provavelmente este seja o estágio de vida em que se encontram mais susceptíveis às ameaças externas (BORBOROGLU et al, 2010; MÄDER et al, 2010). Em condições normais, os juvenis deveriam retornar à colônia em meados de novembro, após eclodirem os ovos dos adultos, uma vez que não participam dos rituais reprodutivos até atingirem a maturidade sexual, aos 4 anos de idade. Desta forma, a soltura dos animais de

reabilitação no final do inverno lhes permitiria um regresso dentro do seu prazo normal de retorno.

Durante o ano de 2008 intensificou-se a ocorrência da espécie no litoral brasileiro, com registro de mais de 4.500 aves vivas atingindo todo o litoral do Brasil. É possível que este seja um fenômeno natural, existindo uma ciclicidade interanual que leva a episódios de encalhe de animais, tais como os registrados em 2008 e em outros anos (BORBOROGLU et al, 2010, MÄDER et al, 2010a). No entanto, o aparecimento de pinguins na costa brasileira tem alcançado proporções significativas, de modo que, foi publicada pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil a cartilha do Projeto Nacional de Monitoramento do pinguim-de-Magalhães (BRASIL, 2010), cujo objetivo é contribuir para a sua conservação. As principais ações deste projeto são relativas à pesquisa sobre reabilitação e soltura do pinguim-de-Magalhães, estimulando-se o seu melhoramento. Os animais de reabilitação surgem nas praias com diversas enfermidades, desde sinais inespecíficos generalizados como subnutrição e desidratação até sinais de intoxicação e contaminação externa com óleo, ferimentos, parasitoses intestinais

graves, regurgitação secundária à ingestão de corpos estranhos (como anzóis e plásticos) e doenças infecciosas (ELLIS e BRANCH, 1994; CRANFIELD, 2003). Uma vez em cativeiro para serem reabilitados, os pinguins ficam susceptíveis a doenças, devido ao seu estado debilitado e ao estresse do confinamento, dificultando o processo de recuperação. De entre as doenças mais comuns em pinguins mantidos em cativeiro estão a aspergillose, malária, encefalites virais, clamidiose, varíola aviária, insuficiência renal e hepática (aguda ou crônica), deficiências nutricionais e, mais raramente infecções da glândula uropigeal, neoplasias e patologias do sistema reprodutor, como distocia, salpingite e prolapsos cloacal (ASSOCIATION OF ZOOS AND AQUARIUMS e PENGUIN TAXON ADVISORY GROUP, 2014).

O diagnóstico preciso e a instituição precoce de tratamento adequado durante a reabilitação podem contribuir favoravelmente para o sucesso na recuperação e conservação dessas aves.

Os parâmetros para soltura são baseados no exame clínico dos animais e são utilizados os critérios do

Fundo Internacional para o Bem-Estar Animal, IFAW, que considera o estado geral dos animais, o estado de impermeabilização das penas, o hematócrito mínimo de 38%, o valor de leucócitos no tubo capilar máximo de 2% e a proteína plasmática total igual ou superior a 6 g/dL (CORAIOLA et al, 2014). No entanto, estes parâmetros podem não refletir totalmente o estado de saúde dos animais.

Não existem na literatura valores estabelecidos para os parâmetros de bioquímica clínica requeridos para a reintrodução de pinguins na natureza (RUOPPOLO et al, 2004; CORAIOLA, 2012). Contudo, existem valores médios reportados para a espécie que podem ser utilizados como guia, bem como o intervalo de referência da Associação de Zoológicos e Aquários, AZA (CORAIOLA, 2012; TEARE et al, 2015).

2.2 BIOQUÍMICA CLÍNICA EM AVES

O exame laboratorial compreende três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Todas estas contêm etapas fundamentais, cujo não cumprimento adequado pode apresentar graves riscos à qualidade do exame.

A fase pré-analítica corresponde a todas as atividades que antecedem a análise. Envolvem basicamente os procedimentos de preparo e colheita das amostras e pressupõem uma boa padronização destes métodos, conferindo confiabilidade à amostra. Já a fase analítica inclui as ações de mensuração laboratorial manual ou automatizada, em que é necessário haver um elevado controle interno de qualidade referente aos aparelhos, reagentes e pessoal. A fase pós-analítica está relacionada com a emissão dos laudos e interpretação dos resultados com base em intervalos de referência e, portanto, implica que as fases anteriores tenham sido concluídas de maneira satisfatória e padronizada. Segundo o manual de recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, SBPC, 70% dos erros laboratoriais são pré-analíticos, 10% analíticos e 20% pós-analíticos (ANDRIOLI e BARBOSA, 2009). É provável que a percentagem de erros pré-analíticos seja ainda maior quando se trata de animais selvagens, uma vez que as amostras são provenientes de animais não-rotineiros, que frequentemente são colhidas a campo em condições não ideais, acondicionadas e encaminhadas

para análise em um laboratório à distância (LIMA-OLIVEIRA et al, 2009).

2.2.1 Fatores Pré-analíticos

Os erros pré-analíticos mais comuns nos exames de bioquímica clínica são:

- identificação e preparação incorreta do paciente (jejum insuficiente, enganos/trocadas no rótulo/requisição);
- erro na seleção, preparação do local e técnica de venopunção (falta de assepsia, garrote prolongado, veia de pequeno calibre, seringa, agulha e tubos de colheita impróprios, escolha errônea do anticoagulante para os testes, falha na proporção sangue/anticoagulante, ausência de homogeneização ou homogeneização traumática);
- manejo, processamento e transporte da amostra inadequados (tempo/velocidade/demora na centrifugação e separação, acondicionamento deficiente, luz e temperatura de transporte e armazenamento indevidos).

2.2.1.1 Tipo de amostra

Os testes bioquímicos podem ser realizados tanto com plasma como com soro, sendo este último, em geral, o material preferido por muitos laboratórios para realização de testes bioquímicos, por não possuir adição de anticoagulantes que podem interferir com alguns métodos analíticos ou alterar a concentração dos parâmetros a serem medidos (CERÓN et al, 2004). No entanto, alguns autores defendem que o uso de soro para testes enzimáticos não é ideal, pois durante o processo de coagulação há a liberação de enzimas eritrocíticas que podem alterar os resultados (CRAY e ZAIAS, 2004). Para estes autores, nas aves é preferível utilizar anticoagulante, pois além de evitar a formação do coágulo e suas alterações, permite a extração de um maior volume de amostra.

Segundo Harr (2002) em pelo menos 25% das amostras de soro de aves verifica-se a formação de um gel proteico após a centrifugação, chamado coágulo de fibrina, devido à presença de fibrinogênio residual, não utilizado na formação do coágulo de sangue, diminuindo significativamente o volume de amostra, provocando

alterações nos resultados bioquímicos e, ocasionalmente prevenindo completamente a análise bioquímica. Além disso, o tempo de formação do coágulo em diferentes espécies de aves é variável devido, em parte, à maior dependência da cascata de coagulação extrínseca, de modo que a utilização de plasma diminui a variabilidade no tempo de separação das amostras e melhora a possibilidade de se obter um volume de amostra adequado (HARR, 2006).

Portanto, a utilização de plasma pode ser vantajosa não só devido ao maior rendimento de amostra em comparação com o soro, mas também por poupar tempo, já que amostras de plasma podem ser centrifugadas diretamente após a colheita da amostra, pois ao contrário do soro, não é necessário esperar até que a coagulação se complete, permitindo a análise bioquímica em situações de emergência (CERÓN et al, 2004; LUMEIJ, 2008).

Assim, como já foi referido, a escolha do anticoagulante é de extrema importância para minimizar a ocorrência de erros laboratoriais.

A heparina é um glicosaminoglicano, que age por meio da ligação à antitrombina III, inibindo a ação da trombina e outras proteases necessárias para a coagulação (CAMPBELL, 2004; BURTIS e ASHWOOD, 2001; HARR, 2006). O EDTA aparece na forma de de sal – dissódico, dipotássico ou tripotássico, sendo o primeiro o menos solúvel - e atua como agente quelante, com elevada afinidade para formar complexos com os íons Ca^{2+} e o Mg^{2+} , essenciais para o processo de coagulação, mas possui a desvantagem de estar associado à hemólise em algumas espécies de aves (BURTIS e ASHWOOD, 2001).

Para cada analito há indicações para o uso de um anticoagulante específico ou até exclusão do seu uso, dependendo do método bioquímico de dosagem para cada kit reagente. Por exemplo, o plasma/EDTA é preferível para dosagens de triglicerídeos, por ter efeito estabilizador sobre as lipoproteínas presentes nos kits reagentes, mas por outro lado a sua presença pode interferir com oxalatos e citrato nos níveis de colesterol, tornando-os discretamente menores (ALVES, 2013).

Com efeito, estudos espécie-específicos são necessários para a validação de um ou outro agente anticoagulante, uma vez que as recomendações dos fabricantes, são em geral, para humanos. Além disso, como não existe um consenso geral sobre o tipo de amostra preferencial para análises bioquímicas em aves, torna-se importante testar a viabilidade das mesmas para cada espécie.

2.2.1.2 Hemólise

Na bioquímica clínica veterinária, a hemólise *in vitro* é um dos principais fatores responsáveis pela alteração dos resultados.

A hemólise, ou lise eritrocitária frequentemente compromete a acurácia dos exames bioquímicos, por extravasamento do conteúdo eritrocitário, efeito diluidor dos constituintes séricos, interferência na coloração da reação pela hemoglobina e por aumento da turbidez e interação química com os reagentes nas análises. (LASSEN et al, 2007).

Independente do uso do plasma ou do soro, a separação deve ocorrer logo que possível, de forma a minimizar os efeitos do metabolismo celular e prevenir as consequências da ocorrência da hemólise, relacionada com inúmeras interferências nas dosagens bioquímicas. Ao contrário do soro, a separação do plasma pode ser realizada imediatamente após a colheita, pois não há necessidade de esperar o tempo de retração do coágulo antes da centrifugação. Assim, assume-se que hajam benefícios na utilização do plasma sobre o soro na bioquímica de aves, associados ao menor tempo de espera para a separação das frações sanguíneas (CAMPBELL, 2004; HARR, 2006; LUMEIJ, 2008). Porém, quando se tratam de animais selvagens, nem sempre a separação pode ser feita imediatamente e, portanto, nestes casos restam dúvidas sobre as vantagens do plasma em relação ao soro (PARSONS et al, 2015; LOW et al, 2006).

As possíveis interferências causadas pela hemoglobina nas análises também dependem da metodologia de dosagem empregada em cada kit reagente. Por outro lado, ao se tratarem de aves, as quais possuem eritrócitos nucleados, a hemólise está

associada à liberação de diferentes conteúdos em relação aos eritrócitos de mamíferos e, pode variar com espécie de ave, daí a necessidade de estudos de patologia clínica espécie-específicos (HARR, 2006).

Pela revisão da literatura disponível e compilada na tabela 1, foi possível constatar que o plasma heparinizado tem sido o tipo de amostra mais utilizado para a análise bioquímica de pinguins do género *Spheniscus* spp. É de notar, todavia, que os atuais intervalos de referência fornecidos pela AZA foram compilados a partir de um grande número de animais saudáveis da mesma espécie de pinguim, mas independentemente do tipo de amostra, plasma ou soro (TEARE et al, 2013). Este fato vem novamente reforçar a necessidade de se estudar o efeito dos anticoagulantes nos exames laboratoriais destes animais, de forma a se obter maior segurança na interpretação dos resultados.

Tabela 1. Tipos de amostra utilizados na literatura bioquímica de pinguins do gênero *Spheniscus spp.*

Referência	Tipo de amostra	Espécie	Animais (A, adulto; J, juvenil)	Analitos
Ghebremeskel et al (1989)	Plasma /Heparina	<i>S. magellanicus</i>	4 A (pré-muda), 5 A (pós-muda)	UR, CREA, PT, ALB, Globulinas, FA, TBIL, DBIL, ALT, GGT, AST, ELECT
Graczyk et al (1995)	Soro	<i>S. demersus</i>	9 A (cativeiro)	ACU, CREA, FA, ALT, GGT, TG, VLDL, PHOS
Wallace (1995)	Plasma /Heparina	<i>S. humboldti</i>	51 A	UR, CREA, ACU, PT, ALB, Globulinas, FA, ALT, AST, CK, GLU, CHOL, ELECT
Villouta et al (1997)	Plasma /Heparina	<i>S. humboldti</i>	15 A	UR, ACU, PT, ALB, Globulinas, FES, AST, GLU
Travis et al (2006)	Soro	<i>S. mendiculus</i>	83 A	ACU, PT, ALB, AST, CK, GLU, ELECT
Smith et al (2008)	Plasma /Heparina	<i>S. humboldti</i>	83 A	ACU, CREA, PT, ALB, Globulinas, AST, CK, CHOL, GLU, + ELECT
Bechert et al (2010)	Plasma /Heparina	<i>S. demersus</i>	18 A	ACU, PT, ALB, Globulinas, AST, CK, CHOL, GLU, ELECT
Cray et al (2010)	Plasma /Heparina	<i>S. demersus</i>	20 A	ACU, PT, AST, TG, C24, GLU, Tiroxina
Coraiola (2012)	Soro	<i>S. magellanicus</i>	10 J (pré- e pós reabilitação) 19 A (pós reabilitação)	ACU, PT, ALB, Globulinas, FA, AST, GGT, LDH, CK, CHOL
Mazzaro et al (2013)	Plasma /Heparina	<i>S. demersus</i>	21 A	UR, ALB, A/G, FA, ALT, AST, AMY
Campos et al (2014)	Soro	<i>S. magellanicus</i>	75 (todas as idades e estados de saúde)	ACU, PT, ALB, Globulinas, AST
Moreno-Salas et al (2014)	Plasma /Heparina	<i>S. humboldti</i>	11 A, 10 J (cativeiro) 21 A (vida livre)	ACU, FA, ALT, GGT, LDH, CK
Teare et al (2014)	Indiscriminado	Todas as espécies	Até 800 (todas as idades, saudáveis)	UR, CREA, ACU, PT, ALB, Globulinas, FA, TBIL, AST, ALT, LDH, CK, AMY, CHOL, GLU, ELECT
Parsons et al (2015)	Soro	<i>S. demersus</i>	108 A (fase reprodutiva)	ACU, CREA, AST, CK, CHOL, C24, GLU, ELECT

2.2.2 Fatores Analíticos e Pós-analíticos

Uma vez minimizados os erros pré-analíticos, ainda assim, para haver um real aproveitamento dos exames bioquímicos é necessário um extenso conhecimento a fisiologia dos analitos no organismo, exclusão de fatores biológicos de variação, como idade, sexo, fase reprodutiva, ciclo circadiano, etc. e sua importância no diagnóstico clínico, se tratando de aves e, em particular pinguins.

Segue-se um resumo da literatura de aves sobre o valor diagnóstico dos analitos bioquímicos mais estudados em pinguins.

2.2.2.1 Ácido Úrico (ACU)

Devido à secreção tubular renal ativa deste composto nas aves, os níveis de ácido úrico no sangue não são significativamente afetados pela desidratação, mas em casos severos de desidratação pode acontecer hiperuricemia. Os rapinantes e os pinguins têm valores de referência para ácido úrico relativamente altos, e demonstram um marcado aumento da concentração de

ácido úrico no plasma em estados pós-prandiais (KOLMSTETTER e RAMSAY, 2000; CRAY et al, 2010). Portanto, a amostragem de sangue em aves carnívoras/piscívoras deve ser realizado após um jejum de 24 horas, além disso o jejum também vai diminuir a probabilidade de lipemia, contribuindo para uma análise bioquímica mais precisa. A contaminação das amostras de sangue com quantidades vestigiais de uratos provenientes da pele das aves pode levar a grandes aumentos nas medições de ácido úrico. Assim, amostras questionáveis devem ser removidas e a amostragem repetida (HARR, 2002).

Após descartarem-se a hiperuricemia pós-prandial e por desidratação severa, uma possível doença renal deve ser avaliada juntamente com análise de urina, radiografia, e / ou biópsia renal. Em casos extremos de disfunção renal, verifica-se o fenômeno da gota, em que há a precipitação deste ácido em forma de cristais nas articulações sinoviais e na superfície das vísceras (CAPITELLI e CROSTA, 2013). Esta patologia foi confirmada em pinguins-de-Magalhães, após um surto de clamidiose no Zoológico de São Francisco,

apresentando níveis de ácido úrico moderadamente aumentados (JENCEK et al, 2012).

Por outro lado, aumentos nos níveis de ácido úrico também estão associados ao estresse, jejum prolongado e má condição corporal, decorrente do catabolismo proteico e perda de massa muscular em pinguins (ALONSO-ALVAREZ et al, 2003). Simultaneamente, como o ácido úrico é um antioxidante, um aumento dos seus níveis normais poderia contribuir no combate ao estresse oxidativo (LIN et al, 2004). No entanto, Beaulieu et al (2011) demonstrou que o aumento da capacidade antioxidante em pinguins-de-Adélia (*P. adeliae*) em situações adversas não se deveu ao aumento dos níveis de ácido úrico, nem se mostrou correlacionado com a probabilidade de sobrevivência. Mais estudos são necessários para esclarecer a importância do ácido úrico como antioxidante em pinguins.

Situações de hipouricemia são raras e podem estar relacionadas a dano hepático severo com consequente diminuição da produção de ácido úrico. Todavia, se houver comprometimento renal e hepático

concomitante, é possível que os valores de ácido úrico se apresentem normais (HOCHLEITHNER, 1994).

2.2.2.2 Albumina (ALB)

Uma avaliação precisa da concentração de albumina permite a avaliação de doenças hipoproteinêmicas tais como insuficiência hepática, nefropatia e/ou enteropatia com perda de proteínas. Este diagnóstico pode levar à implementação de fluidoterapia com coloides, de forma a equilibrar a pressão oncótica, para evitar edema, raramente visto em aves, e ascite. Por outro lado, um verdadeiro aumento da albumina é patognomônico de desidratação e indicaria a necessidade de administração intravenosa de cristaloides (HARR, 2006).

A albumina atua como uma fonte móvel de aminoácidos em emergência nutricional e seu nível no plasma está positivamente correlacionado com o teor de água do corpo, proteínas e nitrogênio e está negativamente relacionado com o teor de gordura. Como acontece em alguns outros animais, a albumina

circulante pode ser um bom indicador das reservas proteicas em pinguins (GHEBREMESKEL et al, 1989).

Uma sugestão interessante foi levantada por Lewandowski et al (1986), cogitando que níveis altos de albumina poderiam refletir a capacidade da ave para resistir à infecção pela malária, mas mais detalhes não foram fornecidos em seus estudos.

Apesar dos trabalhos de Graczyk et al (1995) em pinguins africanos (*S. demersus*) não atribuírem elevado valor à albumina no diagnóstico da malária, os estudos de Campos et al (2014) levantaram de novo a questão da sua importância no diagnóstico e prognóstico desta doença em pinguins-de-Magalhães.

2.2.2.3 Alanina Aminotransferase (ALT)

A ALT é uma enzima com distribuição ubíqua, não sendo específica de nenhum orgão na maioria das espécies de aves e, como tal, a sua determinação pode não ser muito útil para o diagnóstico de doenças específicas (KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2004).

Por outro lado, Rozman et al (1974) encontrou atividades elevadas de ALT em casos de disfunção renal. Graczyk et al (1995) mostrou que a creatinina, ALT e GGT apresentaram mais de 57% de especificidade e valor preditivo para infecção por malária em pinguins, africanos (*S. demersus*), tendo concordância com a noção de que as infecções clínicas e subclínicas de malária aviária em pinguins provocam extensa alterações nos rins.

Estudos mais recentes sobre bioquímica clínica em pinguins confirmados com malária por PCR, não avaliaram a atividade da ALT (CAMPOS et al, 2014).

2.2.2.4 Aspartato Aminotransferase (AST)

AST não é uma enzima específica do fígado, ie exclusivamente indicadora de lesão hepática, mas segundo Lumeij (2008) e Harr (2006) é um indicador muito sensível na detecção de danos hepatocelulares em algumas espécies aviárias. Além disso, juntamente com a enzima específica do músculo, creatinaquinase (CK), é utilizada para diferenciar entre problemas

hepáticos e musculares (DABBERT E POWELL, 1993; JAENSCH et al, 2000).

Um estudo realizado por Najle et al (2006) em pinguins-gentoo (*P. papua*) e pinguins-de-Adélia (*P. adeliae*) tratados experimentalmente com substancias hepatotoxicas, verificou que os níveis de AST e ALT aumentaram em relação aos seus valores pré-tratamento e, como tal, podem fornecer dados valiosos sobre a condição hepatica destes animais frequentemente tratados com vermífugos hepatotoxicos, expostos a poluentes ou com enfermidades que acometem o fígado.

Villouta et al (1997) verificou um aumento da AST com o aumento dos dias de cativeiro em pinguins africanos (*S. demersus*), e justificou-o pela maior atividade muscular destes animais em cativeiro. Moreno-Salas et al (2014) contestaram esta afirmação, demonstrando que os valores de AST não variaram significativamente entre animais de cativeiro e de vida-livre e, apresentavam médias maiores em pinguins selvagens.

Campos et al (2014) reportaram que a atividade da AST foi acima da faixa normal em 66,6% dos pinguins confirmadamente infectados com malária (16/24), no entanto, não houve diferença significativa entre animais infectados e não infectados.

2.2.2.5 Colesterol (CHOL)

Os níveis de colesterol raramente são suficientes para se atingir um diagnóstico, mas podem ser úteis quando analisados em conjunto na determinação de várias doenças. (STANFORD, 2005).

2.2.2.6 Creatinaquinase (CK)

Ramírez et al (2010) estudaram a CK como parâmetro representativo do investimento reprodutivo em espécies de aves marinhas, decorrente de uma maior atividade muscular durante o período reprodutivo. Assim, a CK também pode apresentar variações por causas fisiológicas, como durante a reprodução, mas é não afetada pelo gênero ou a idade (HOCHLEITHNER, 1994).

2.2.2.7 Fosfatase Alcalina (FA)

Até ao momento, um aumento significativo da FA em diferentes espécies de aves foi associado apenas com o aumento da atividade osteoblástica incluindo estados de doença traumática, nutricional, neoplásica e infecciosa (LUMEIJ, 2008) O valor diagnóstico da FA para doença colestática e biliar em diferentes aves, ainda não foi estudado.

Ghebremeskel et al (1989) demonstraram que no período de muda a atividade de FA é superior à dos pinguins em período de repouso. Uma vez que uma elevada atividade de fosfatase alcalina está relacionada com a renovação celular e tecidual ou alta taxa anabólica, os valores aumentados observados nas aves de pós-muda pode ser um reflexo da síntese de penas. Além disso, a desnutrição proteica pode estar associada com reduções significativas na atividade da FA.

Moreno-Salas et al (2014) investigaram as diferenças entre pinguins de humboldt (*S. humboldti*) de zoológicos e de vida livre e verificou que a atividade da FA era maior nos animais de cativeiro. Esse aumento foi

atribuído inicialmente ao fato de que alguns dos animais de zoologico eram ainda juvenis em desenvolvimento, no entanto retirando esses exemplares os valores continuavam mais altos no grupo em confinamento, pelo que foi sugerido a presença de traumatismos ósseos devido às instalações artificiais. Levantou-se também a hipótese haver um erro na suplementação vitamínica em cativeiro, levando a uma hipervitaminose A responsável por danos hepatobiliares. Contudo, segundo o Grupo de Consultoria sobre o Táxon (TAG) de pinguins, isto seria improvável, uma vez que os pinguins são altamente resistentes à vitamina A devido à sua dieta natural psicívora, e por outro lado este aumento da FA em cativeiro não foi acompanhado pelas outras enzimas hepáticas mais específicas (ASSOCIATION OF ZOOS AND AQUARIUMS e PENGUIN TAXON ADVISORY GROUP, 2014).

2.2.2.8 Gama Glutamiltransferase (GGT)

A fonte primária da GGT circulante em aves é o sistema hepatobiliar, e níveis significativos de GGT provenientes do epitélio renal são encontrados na urina.

(HOCHLEITHNER, 1994; LUMEIJ et al, 1988; PHALEN et al, 1997).

Os níveis de GGT são normalmente baixos em pinguins saudáveis e podem ser inferiores ao limite de detecção de alguns ensaios utilizados no laboratório (CORAIOLA, 2012). Portanto, em geral, considera-se que o valor diagnóstico da GGT é ainda desconhecido (HOCHLEITHNER, 1994). Mesmo assim, como já foi referido, Graczyk et al (1995) sugeriram a avaliação da GGT como útil no diagnóstico de infecções clínicas e subclínicas de malária em pinguins africanos (*S. demersus*).

2.2.2.9 Glicose (GLU)

A maioria das aves possui valores de glicemia mais elevada do que em mamíferos e estes variam consoante o ciclo circadiano. O stress induz hiperglicemia em aves devido aos elevados níveis de glucocorticóides liberados (FUDGE, 2000; MENDES-DE ALMEIDA et al, 2007).

É de notar que a demora na separação do soro ou plasma das células não diminui de forma significativa a concentração de glicose nas aves, como acontece nos mamíferos, pois os eritrócitos das aves utilizam ácidos graxos e não glicose para seu metabolismo (CAMPBELL, 2004; SCHMIDT et al, 2007).

A hiperglicemia de estresse deve ser excluída antes de um diagnóstico de diabetes mellitus, uma vez que o diagnóstico desta doença é incomum na maioria das aves, aparentemente associado a tumores pancreáticos e pancreatites (LUMEIJ, 2008; CAMPBELL, 2004). Destaca-se apenas um caso descrito mas não confirmado em um pinguim imperador (PILNY, 2008).

Por outro lado, a hipoglicemia é encontrada com maior frequência, sendo as suas possíveis causas: jejum prolongado, doença hepática severa, septicemia ou distúrbios endócrinos (CAMPBELL, 2004). Assim, os níveis de glicose no sangue das aves selvagens mantidas em cativeiro são um fator importante para a avaliação clínica dos animais em recuperação (MENDES-DE-ALMEIDA et al, 2007) e também podem ser utilizados, juntamente com a proteína total e a

relação cálcio:fósforo, para estimar o sucesso reprodutivo e a sobrevivência da prole (DUNBAR et al, 2005).

2.2.2.10 Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima intracelular que tem funções na glicólise e está presente em vários tecidos: músculo esquelético, cardíaco, fígado, rim, osso e eritrócitos.

Apesar desta enzima não ser específica de nenhum órgão, os aumentos são frequentemente atribuídos a doenças hepáticas, em psitacídeos. A atividade da LDH parece aumentar e diminuir mais rapidamente do que a AST em aves com lesões hepáticas (CAPITELLI e CROSTA, 2013), podendo oferecer informações sobre a cronicidade da doença (HOCHLEITHNER, 1994; GRUNKEMEYER, 2010).

De acordo com Lumeij (2008), a enzima LDH em aves é indicadora de lesão hepática quando se verifica um aumento desta sem ser acompanhado de aumentos na atividade da CK (excluindo lesão muscular). Nos estudos de Moreno-Salas et al (2014) a atividade da

enzima LDH se apresentou mais elevada em pinguins de cativeiro, possivelmente relacionada com lesões musculares (decorrentes de atividade muscular inadequada).

Cita-se ainda um caso de um pinguim africano (*S. dermersus*) com doença cardíaca apresentando sinais respiratórios, hematológicos, hipooalbuminemia e LDH aumentada (MCNAUGHTON et al, 2014)

2.2.2.11 Proteínas totais (PT)

Apesar de não contribuir informações sobre a etiologia de uma doença específica, um resultado de proteínas totais conciso é uma informação importante para a avaliação do estado geral das aves e pode ser usada para estabelecer cuidados de suporte. Uma diminuição da proteína total pode indicar a necessidade de colóide e suplementação (estado de subnutrição) ou incitar uma busca por uma nefropatia, enteropatia ou insuficiência hepática subjacente. Em caso de aumento da proteína total, a atividade reprodutiva deve primeiro ser descartada para exemplares do sexo feminino e em seguida, a desidratação ou um estado de doença

inflamatória subjacente devem ser investigadas (HARR, 2002).

Em pinguins africanos (*S. demersus*), Villouta et al (1997) verificaram um aumento das proteínas totais, não relacionado com o fibrinogênio (proteína de fase aguda), à medida que aumentaram os dias de cativeiro, mas não forneceram uma explicação para esse fato.

Após uma contaminação hepática experimental, Najle et al (2006) demonstraram uma diminuição significativa das proteínas totais em pinguins-gentoo (*Pygoscelis papua*) e pinguins-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*). Já Graczyk et al (1995), postularam não haver relação entre as concentrações de proteína total, albumina (A), globulina (G), ou razão A / G com a presença clínica ou subclínica de malária em pinguins africanos (*S. demersus*). No entanto, os trabalhos de Campos et al (2014) relataram que a diminuição da concentração de proteínas totais em pinguins-de-Magalhães parasitados com malária, embora não significativa, se deveu provavelmente aos danos hepáticos e renais associados à doença.

Assim, embora, a hiperproteinemia possa estar associada a estados inflamatórios/infecciosos, um dos parâmetros sugeridos para a soltura de pinguins-de-Magalhães é um valor de proteínas totais igual ou superior a 6 g/dL, juntamente com valores hematológicos que, de certa forma, descartem a possibilidade de uma resposta imunológica acentuada (CORAIO LA et al, 2014).

2.2.2.12 Triglicérides (TG)

Em aves, há indícios de que os lipídeos podem ser uma fonte mais significativa de energia do que a glicose, especialmente durante a migração e jejum, já que estas fazem uso das reservas de gordura para poderem sobreviver durante períodos de restrições calóricas (REMAGE-HEALEY E ROMERO, 2001).

Os lipídios plasmáticos em pinguins imperador (*A. fuscata*) decrescem significativamente durante a muda das penas, mas após a conclusão da muda voltam a aumentar, ultrapassando o valor inicial (GROSCOLAS e ROBIN, 2001).

Em exemplares adultos de várias espécies de aves, admite-se uma correlação positiva entre os níveis circulantes de triglicérides e a deposição de gordura e ganho de peso. Da mesma forma, em populações de cisnes selvagens sofrendo falta de alimento por poluição do ambiente observou-se diminuição dos triglicerídeos que foi associada a menor ingestão de alimento e menor deposição de gordura (ARTACHO et al, 2007). Além disso, estudos demonstram que os níveis de triglicérides podem ter um valor preditivo na taxa de crescimento de animais jovens, sendo menores em animais com alta taxa de crescimento, pois toda a energia é utilizada para o crescimento, não sendo possível constituir reservas (ALBANO et al, 2011).

O valor diagnóstico dos triglicérides circulantes ainda não foi adequadamente avaliado em aves (HOCHLEITHNER, 1994).

Alguns estudos sugerem que estes podem refletir o estado nutricional, em conjunto com a massa corporal, proteínas totais e ácido úrico (REMAGE-HEALEY E ROMERO, 2001). O perfil lipídico também tem sido utilizado para caracterizar experimentalmente o

metabolismo das três fases associadas ao jejum de longo prazo em gansos e pinguins. Durante a fase 1, de adaptação, o catabolismo de proteínas diminui e aumenta a mobilização de lipídios. Durante a fase 2, os lipídeos são usados como uma fonte primária de energia, e, na fase 3, as reservas de proteínas do corpo já não podem ser preservadas e o catabolismo proteico aumenta (GROSCOLAS e ROBIN, 2001). Assim, é importante monitorizar os níveis de triglicérides, proteínas totais e ácido úrico em conjunto.

A remoção experimental da glândula uropigeal demonstrou não estar envolvida diretamente no metabolismo dos lipídeos, ao se constatar por análise bioquímica 32-120 dias após remoção da glândula, níveis normais de triglicérides e colesterol (SALIBIAN E MONTALTI, 2009). Logo, supõe-se que casos de infecção da glândula uropigeal, comum em pinguins (WALLACE, 2014) não estejam associados a uma alteração na concentração de triglicérides.

O aumento dos triglicérides pode ser devido a situações patológicas como celomite por gema ou hiperadrenocorticismo, contudo esta alteração

bioquímica também pode ser encontrada em estados pós-prandiais ou pós-exercício. Situações de diminuição de triglicérides estão relacionadas com muda de penas e/ou subnutrição (HOCHLEITHNER, 1994).

2.2.2.13 Ureia (UR)

Embora as aves sejam predominantemente uricotélicas, excretando o nitrogênio principalmente na forma de ácido úrico, a ureia continua a ser um componente menor dessa excreção.

A azotemia pré-renal pode ser observada em aves desidratadas (CORAIOLA, 2012). Porém, ao contrário de algumas espécies de rapinantes, em pinguins, a ureia não sofre o aumento pós-prandial que ocorre com o ácido úrico (HARR, 2006). Também já foi demonstrado em aves que doenças renais estão associadas a casos de azotemia (LUMEIJ et al, 2008). Assim a uréia e o ácido úrico podem ser utilizados em conjunto, juntamente com a história, exame físico e urinálise para distinguir adequadamente azotemia pré-renal de doença renal.

Valores de ureia diminuídos, associados a insuficiência hepática, ainda não foram avaliados em aves, mas há indícios de um possível valor diagnóstico nesse sentido em algumas espécies, tais como em cacatuas (HARR, 2002).

3 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 1.08.15, e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio, por meio do Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade – SISBIO, protocolo de número 48654-1.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 34 pinguins-de-Magalhães acolhidos no CETAS de Florianópolis, após reabilitação e constituição de um grupo suficiente de indivíduos considerados fisicamente aptos para avaliação de pré-soltura. Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 24 horas (LUMEIJ, 2008).

Foram realizadas a pesagem dos animais, pesquisa de lesões corporais e avaliação do escore corporal, classificado com base na palpação da musculatura peitoral, segundo Coraiola (2012) em: 1

(muito magro, quando a quilha do animal é facilmente observada, mesmo sem a palpação), 2 (magro, quando a quilha do animal não é facilmente observada mas pode ser palpada) ou 3 (normal, quando a quilha do animal não é facilmente observada ou palpada).

3.2 AMOSTRAS DE SANGUE

Por meio de punção da veia jugular, sob contenção física, foram colhidos 5 mL de sangue de cada animal utilizando seringas de 5 mL e agulhas de 24G (figura 1). O sangue contido na seringa foi imediatamente dividido em três recipientes preparados previamente: 1,5 mL num microtubo com 20 μ L do anticoagulante EDTA dissódico a 3%, 1,5 mL num microtubo de fundo redondo com 10 μ L do anticoagulante heparina sódica e 2 mL num tubo sem anticoagulante mas com ativador de coágulo, nesta ordem.

Figura 1 – Colheita de sangue de pinguim-de-Magalhães por contenção física e venopunção jugular.

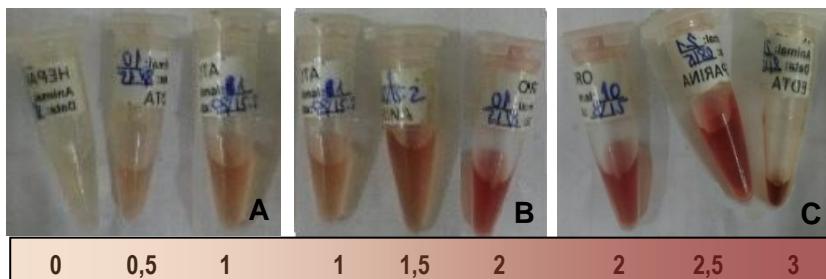


Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Aproximadamente 2 horas (mínimo 1 hora e máximo 4 horas) após a colheita, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos, no próprio local ou na estação ecológica de Carijós, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Selvagens, CEMAVE, localizado a 30 minutos de distância do CETAS. Durante o tempo decorrido até o processamento, as amostras se encontravam refrigeradas em caixas de isopor com gelo reutilizável. A ordem de centrifugação adotada deu

prioridade às amostras contendo anticoagulante. Após a separação e obtenção do plasma ou soro foi realizada a avaliação visual do grau de hemólise considerando uma escala gradativa conforme ilustra a figura 2 (A, B e C). Em 21 das amostras de plasma heparinizado, foi determinada a concentração de proteínas totais por refractometria. Todas foram depois armazenadas em gelo seco (Metarlogistica Ltda[©]) e levadas ao laboratório de Patologia Clínica Veterinário do CAV-UDESC, onde ficaram armazenadas a -20º C até o processamento.

Figura 2 – Exemplo da classificação visual do grau de hemólise nas amostras de soro/plasma: (A) amostra sem hemólise a discretamente hemolisada (0 -0,5-1); (B) hemólise discreta a moderada (1-1,5-2) ou (C) de moderada a intensa (2-2,5-3).



Fonte: Produzido pelo próprio autor

3.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Após o descongelamento das amostras o grau de hemólise foi novamente estimado por classificação visual e a mensuração dos seguintes analitos foi realizada por espectrofotometria em analisador automático de bioquímica úmida (Labmax Plenno, Labtest®): ácido úrico (método da uricase/peroxidase), uréia (UV Enzimático: Urease-GLDH), proteínas totais (método do biureto e refratometria), albumina (método do verde de bromocresol), globulinas (subtração do valor de albumina ao das proteínas totais), glicose (glicose oxidase), colesterol (hidrólise enzimática e oxidação), γ -glutamiltransferase (GGT) (método cinético-colorimétrico), aspartato amino transferase (AST) (método cinético-UV) e creatinaquinase (CK) (método UV otimizado). Os reagentes utilizados pertenciam a kits comerciais, utilizados conforme as instruções preconizadas pelo fabricante (Labtest®), excetuando o anticoagulante recomendado (tabela 2). Para a maioria dos analitos foi possível realizar as dosagens em duplicata.

A concentração aproximada de hemoglobina livre no soro ou plasma foi determinada seguindo um protocolo recomendado pela assessoria científica da Labtest®: 0,05 mL de amostra diluída em 2 mL de solução salina 85% com medição da absorbância a 415nm usando o fator 601 – este método foi validado pela medição correta do padrão de hemoglobina comercial diluído 1:10.

A tabela 2 mostra também os limites de hemoglobina livre a partir dos quais ocorrem interferências prejudiciais às dosagens bioquímicas, recomendados nas instruções de uso dos kits reagentes utilizados e em estudos sobre a influência da hemólise na bioquímica clínica de aves (ANDREASEN et al, 1996; ANDREASEN et al, 1997).

Tabela 2 - Instruções de uso dos kits Labtest e valores máximos de hemoglobina (HB máx) aceites pelo fabricante e na literatura de aves sem causar interferência na determinação dos analitos. Continua.

Analito	Ref.	Amostra	Método	HB máx Labtest® (mg/dL)	HB máx aves* (mg/dL)
Ácido Úrico	140-1	Soro ou plasma (EDTA ou heparina)	Colorimétrico (Enzimático Trinder).	200	62,5**
Albumina VET	1007	Soro. Não usar plasma.	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)	180**	500
ALT Liquiform	108	Soro ou plasma (EDTA ou heparina)	Cinético UV-IFCC.	180**	
AST Liquiform	109-2	Soro ou plasma (EDTA ou heparina)	Cinético UV-IFCC.	45	250**
Colesterol Liquiform	76-2	Soro. Não utilizar plasma com EDTA.	Colorimétrico (Enzimático de Trinder)	180**	
CKNAC	117	Soro ou plasma (EDTA ou heparina)	UV-IFCC.	120**	2000
Fosfatase Alcalina	40	Soro ou plasma (heparina)	Colorimétrico (Roy modificado)	30**	

*valores adaptados de ANDREASEN et al (1996) em aves domésticas e ANDREASEN et al (1997) em ratites.

**Limite de hemoglobina adotado neste estudo.

Tabela 2 - Instruções de uso dos kits Labtest e valores máximos de hemoglobina (HB máx) aceites pelo fabricante e na literatura de aves sem causar interferência na determinação dos analitos. Conclusão.

Analito	Ref.	Amostra	Método	HB máx Labtest® (mg/dL)	HB máx aves* (mg/dL)
GGT Liquiform	105-2	Soro ou plasma (EDTA).	Szasz modificado.	180**	250
Glicose Liquiform VET	1012	Soro ou plasma.	GOD-Trinder.	200**	
LDH Liquiform	86	Soro	UV - Método Piruvato- Lactato	50 hemólise visível	
Proteínas Totais	99	Soro.	Colorimétrico (Biureto).	130**	1000
Triglicérides Liquiform	87-2	Soro ou plasma (EDTA).	Colorimétrico (Reação de Trinder)	200**	
Ureia UV	104-2	Soro ou plasma (EDTA ou heparina)	Enzimático UV	300**	

*valores adaptados de ANDREASEN et al (1996) em aves domésticas e ANDREASEN et al (1997) em ratites.

**Limite de hemoglobina adotado neste estudo.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez concluída a dosagem bioquímica, os dados foram tabulados e analisados pelo programa computacional Excel RealStats (2010). A normalidade da distribuição dos resultados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Excluíram-se os valores dos analitos bioquímicos dos animais com lesões ao exame físico e cujas amostras tinham concentrações de hemoglobina superior às recomendações descritas nos kits reagentes ou em estudos sobre a hemólise em aves (tabela 2). Por essa razão, houve uma grande variação no N disponível para cada analito.

Os resultados da dosagem dos analitos com distribuição normal foram submetidos à análise de variância ANOVA uma via e ao teste t de Student. Já os resultados que não apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste de Wilcoxon Signed Rank. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando valor de $p < 0,05$.

Calculou-se o erro relativo entre os valores medidos no soro e no plasma de acordo com Hrubec et al (2002), pela seguinte formula:

$([\text{soro}]-[\text{plasma}]/[\text{soro}]) \times 100$, em que [soro] representa a média/mediana da concentração do analito medida no soro, e [plasma] corresponde à média/mediana do mesmo medida no plasma (de heparina ou EDTA). A mesma fórmula foi adaptada para o cálculo da diferença percentual das médias obtidas neste estudo ao limite do intervalo de referência da AZA:

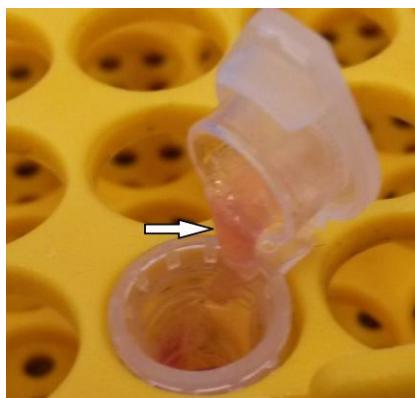
$([\text{limite}]-[\text{média}]/[\text{limite}]) \times 100$.

Foram correlacionados o método de avaliação visual da hemólise com o método de determinação da hemoglobina livre descrito acima e, também o método de medição das proteínas totais por refratometria e espectrofotometria, utilizando o coeficiente de correlação de Spearman/Pearson.

4 RESULTADOS

O peso médio das aves foi de $3,37 \pm 0,43$ kg e escore corporal médio de 3. A partir da data de chegada das aves ao CETAS e da data da colheita foi calculada a média de dias em cativeiro, a qual foi de 35 ± 14 dias. Do total de 34 aves que foram utilizadas, apenas três apresentaram lesões dignas de exclusão do presente ensaio, especificamente abscessos e pododermatite. Todos os pinguins contabilizados para o estudo eram juvenis. Verificou-se a formação do coágulo de fibrina em 18% das amostras de soro, o correspondente a seis amostras de 34 (figura 3).

Figura 3 – Coágulo de fibrina no soro (seta).



Fonte: Produzido pelo próprio autor.

Em relação aos valores dos analitos bioquímicos medidos no plasma heparinizado e com EDTA a 3% comparados aos do soro (tabela 3), notou-se que ocorreram menor número de diferenças estatísticas entre as médias no soro e no plasma com heparina do que entre o soro e o plasma com EDTA.

As diferenças estatísticas no plasma com heparina relativamente ao soro foram essencialmente no valor médio de albumina (superestimado), triglicérides (superestimado) e colesterol (subestimado).

No plasma com EDTA 3% verificaram-se oito analitos cujas médias/medianas apresentaram diferenças significativas em relação ao soro: proteína total (subestimada), fosfatase alcalina (subestimada), colesterol (subestimado), glicose (subestimada), ácido úrico (subestimado), GGT (subestimado), ALT (superestimada) e CK (superestimada).

Considerando como clinicamente relevantes apenas os analitos com erros relativos superiores a 10% (ANDREASEN, 1996; HAWKINS et al, 2006) o colesterol dosado no plasma com heparina não originou médias

com diferenças clinicamente significativas em relação ao soro, resultando em apenas dois analitos problemáticos neste tipo de amostra. Já as dosagens no plasma com EDTA, levaram a diferenças com significância clínica relativamente ao soro em seis analitos: PT, FA, Colesterol, GGT, ALTe CK.

Tabela 3. Valores médios/medianos da concentração ou atividade enzimática dos analitos bioquímicos de *Spheniscus magellanicus* em amostras de soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA. Continua.

	N	Soro Média ± Std	EDTA Média ± Std	Erro relativo (%)		N	Soro Média ± Std	Heparina Média ± Std	Erro relativo (%)
Albumina (g/dL)	29	0,99±0,13	0,95±0,11		Albumina (g/dL)	31	0,98±0,13	2,40*±0,92	-143,93
FA (U/L)	3	45,00±11,76	8,17*±7,29	81,85	FA (U/L)	5	56,30±25,11	46,00±32,07	
AST (U/L)	30	154,30±44,39	145,72±35,55		AST (U/L)	30	152,68±43,72	149,72±44,68	
Colesterol (mg/dL)	30	218,13±43,59	184,0*±41,96	15,63	Colesterol (mg/dL)	30	216,20±41,24	206,55*40,85	4,46
GGT (U/L)	10	10,35±6,32	4,00*±2,87	61,35	GGT (U/L)	16	12,22±6,51	14,94±8,23	
Glicose (mg/dL)	31	184,03±25,76	168,7*±26,93	8,32	Glicose (mg/dL)	30	183,58±26,08	179,13±19,43	
Triglicérides (mg/dL)	30	45,20±16,81	45,50±16,47		Triglicérides (mg/dL)	30	45,20±16,81	65,63*±18,63	-45,21
Proteínas totais (g/dL)	32	7,530,93	6,73*±1,10	10,61	Proteínas totais (g/dL)	31	7,55±0,94	7,53±0,92	
Ácido úrico (mg/dL)	13	9,58±1,61	8,70*±1,52	9,20	Ácido úrico (mg/dL)	14	10,00±2,18	9,56±2,43	
Ureia (mg/dL)	29	4,97±2,11	5,90±3,35		Ureia (mg/dL)	25	4,96±1,99	4,64±2,66	

*Diferença estatisticamente significativa segundo o teste t para amostras emparelhadas em relação à média no soro.

**Diferença estatisticamente significativa segundo o teste Wilcoxon Sign Rank para amostras emparelhadas em relação à mediana no soro

Tabela 3. Valores médios/medianos da concentração ou atividade enzimática dos analitos bioquímicos de *Spheniscus magellanicus* em amostras de soro, plasma heparinizado e plasma com EDTA. Conclusão.

	N	Soro		EDTA	Heparina	Erro
		Mediana e	Percentil (25 e 75)			
ALT (U/L)	28	27,0 (20,25-37,25)		37,5** (22,25-47,75)	26,0 (15-36)	-38,89
CK (U/L)	26	209,0 (141,75-257)		486** (266-1080)	210,0 (172-210,75)	-132,54
LDH (U/L)	9	533,0 (374-837)		855 (378-1315)	601,0 (471-697)	

*Diferença estatisticamente significativa segundo o teste t para amostras emparelhadas em relação à média no soro.

**Diferença estatisticamente significativa segundo o teste Wilcoxon Sign Rank para amostras emparelhadas em relação à mediana no soro

Ao comparar os resultados deste estudo com os valores de referência propostos pela AZA por meio da tabela 4, verificou-se que os valores médios de globulinas (no soro) e fosfatase alcalina (em plasma contendo EDTA) estavam fora dos intervalos de referência estabelecidos. Por outro lado, todos os valores médios/médianos medidos em plasma heparinizado estavam dentro dos intervalos de referência da AZA.

Uma vez que os intervalos de referência da AZA são bastante abrangentes, foram considerados como próximo do limite, isto é, passível de erro, quando os valores médios ficaram abaixo de 20% de diferença do valor estipulado como limiar entre saudável e patológico.

Assim, foi possível constatar que alguns valores médios ficaram próximos dos limites do intervalo de referência nas medições feitas no plasma com EDTA, principalmente a concentração de globulinas (3 % do limite superior), concentração de colesterol (11% do limite inferior), concentração de glicose (12% do limite inferior) e atividade da LDH (17,23% do limite superior).

Tabela 4. Valores médios/medianos dos analitos dosados em soro, plasma/EDTA 3% e plasma/heparina no presente estudo e os valores da literatura ou intervalo de referência da Associação de Zoológicos e Aquários (AZA) para *Spheniscus magellanicus*.

Variável	Presente estudo (soro)	Presente estudo (EDTA)	Presente estudo (heparina)	Teare et al, 2013 (AZA)	Campos et al, 2014 (soro)	Coraiola 2012 (soro)	Ghebremeskel et al 1989 (heparina)	Intervalo de Referência (AZA)	Diferença do limite %
Ácido úrico (mg/dL)	10,00	8,62	9,72	9,6	10,12	9,36	-	1,9-26,1	
Albumina (g/dL)	0,99	0,95	2,40	1,9	1,25	2,07	1,16 (1,95)	0,3-3,7	
ALT (U/L)	27	37,5	26	78	-	-	9,4 (38)	0-191	
AST (U/L)	154	145	147	206	249	169,6	167,8 (471)	59-538	
CK (U/L)	209	486	210	336	-	327,3	-		
Colesterol (mg/dL)	219	183	206	300	-	223,6		165-463	10,90 (EDTA)
FA (U/L)	64,94	6,44	62,32	140		106,8	181,2 (89,8)	29-388	
GGT (U/L)	12,25	5,03	15,97	-	-	13,86	1,5	-	
Glicose (mg/dL)	184	167	177	215	-	203,3	-	149-283	12,08 (EDTA)
Globulinas (g/dL)	6,62	5,71	5,15	3,1	2,87	3,87	2,64 (3,05)	0,1-5,9	3,22 (EDTA)
LDH (U/L)	533	855	601	375	-	972,5	-	65-1033	12,7 (heparina)
Proteínas totais (g/dL)	7,53	6,73	7,52	5,8	4,08	5,94	3,8 (5,3)	3,7-8,4	17,23 (EDTA)
Triglicérides (mg/dL)	44,73	44,98	62,23	-	-	-	-	-	-
Ureia (mg/dL)	4,97	6,06	4,71	5	-	-	12,65 (16,26)	0-9	

Ital Valores em itálico representam medianas; Resultados entre parêntesis correspondem a determinações durante a pré-muda da plumagem.

Valores em negrito se encontram fora do intervalo referência da AZA

Neste trabalho, compararam-se ainda dois métodos empíricos com o método bioquímico: a determinação de proteínas totais no refratômetro e no espectrofotômetro pelo método do biureto (tabela 5) e, a classificação visual da hemólise com a dosagem espectrofotométrica da concentração de HB livre (tabela 6). Os resultados demonstraram uma elevada correlação entre os métodos.

Obtiveram-se resultados de proteínas totais por meio do uso de refractômetro em 21 das 34 amostras, sempre em plasma heparinizado. As médias entre os dois métodos no mesmo tipo de amostra diferiram significativamente, sendo mais elevadas no método bioquímico, mas evidenciaram estar altamente correlacionadas (tabela 5).

Tabela 5. Concentração plasmática média das proteínas totais (PT) mensurada por refratometria e por espectrofotometria.

	Média PT Método Bioquímico Plasma heparina (g/dL)	Média PT Refratometro Plasma heparina (g/dL)	Coef. Correlação de Pearson
N=21	7,7 ^a	7,3 ^b	0,9

^{a,b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste t para amostras emparelhadas com $p<0,05$.

Por outro lado, as medianas obtidas pela dosagem da concentração de hemoglobina livre e da classificação visual da hemólise não diferiram significativamente nos diferentes tipos de amostra, nem com o congelamento, mas os métodos também mostraram elevada correlação entre si. O plasma com EDTA foi o tipo de amostra com os maiores resultados medianos de hemoglobina livre. Já o soro, obteve um resultado maior nos valores medianos da classificação visual da hemólise, tanto antes do congelamento (inicial) como após (final) (tabela 6).

Tabela 6. Estimativa do grau de hemólise *in vitro* nos diferentes tipos de amostra baseada nos valores medianos da classificação visual (inicial e final) e da concentração de hemoglobina livre.

	N	Mediana Class. visual inicial da hemólise	Mediana Class. visual final da hemólise	Concentração mediana de HB livre (mg/dL)	Coef. Spearman
Soro	34	0,25 ^a	0,5 ^a	58,95 ^A	0,82
EDTA	34	0,25 ^a	0,25 ^a	62,24 ^A	0,89
Heparina	34	0 ^a	0 ^a	45,47 ^A	0,84

^a, ^A símbolos iguais na mesma coluna representam medianas sem diferenças significativas pelo teste Wilcoxon Signed Rank para amostras emparelhadas ($p < 0,05$)

5 DISCUSSÃO

O peso e escore corporal dos animais estudados neste ensaio, foi similar ao encontrado em outros trabalhos com pinguins de Magalhães de reabilitação, e considerados adequados para soltura (CORAIOLA, 2012).

A ocorrência de 18% de amostras de soro com coágulos de fibrina, mostrou concordância com os estudos de Harr (2002), o qual descreve este fenômeno em até 25% das amostras séricas de aves.

No presente estudo considerou-se como *gold standard* a dosagem bioquímica no soro, sendo os valores séricos utilizados como referência, a partir da qual foi possível comparar e discutir os resultados emparelhados das dosagens feitas no plasma com os diferentes anticoagulantes. Este postulado foi apoiado, em parte, pelo trabalho de Parsons et al (2015) em pinguins africanos (*S. demersus*), em que os autores dão preferência às amostras de soro em relação às amostras de plasma quando não há possibilidade de uma rápida separação da fração celular e fração líquida, uma vez

que o soro se separa naturalmente e está relacionado com menos alterações artificiais, sendo assim presumivelmente mais fidedigno. No Laboratório de Patologia Clínica do CAV-UDESC considera-se uma separação rápida até 2 horas.

As dificuldades práticas na preparação das amostras de animais selvagens levam frequentemente à obtenção de bases de dados pouco comparáveis devido à falta de padronização dos métodos de colheita (LOW et al, 2006). No presente trabalho não foi possível padronizar exatamente o tempo da colheita à separação, mas esta ocorreu em até 4 horas para todas as amostras, média de aproximadamente 2 horas, dando-se prioridade às amostras com anticoagulante. A razão do estabelecimento dessa ordem, foi a de diminuir ao máximo o tempo de contato entre as duas frações sanguíneas no sangue total e o anticoagulante, minimizando-se as interferências da hemólise e metabolismo celular nas amostras de plasma, em detrimento do soro. De acordo com os estudos de Eisenhawer et al (2008) em tartarugas-marinhas-comuns (*Caretta caretta*), tem-se que as amostras de sangue total com anticoagulante podem ser armazenadas em

contentores térmicos de transporte por até 24 horas, sem alteração significativa em grande parte dos analitos bioquímicos.

Em seguida apresenta-se a discussão dos resultados obtidos para cada analito, em relação aos tipos de amostra ensaiados, aos intervalos de referência e literatura disponível e aos métodos de determinação utilizados.

5.1 ALBUMINA

No presente estudo, 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, os quais encontraram valores significativamente mais elevados no plasma heparinizado de avestruzes do que no soro das mesmas (MOHRI et al, 2009). O mesmo foi evidenciado em trabalhos com galinhas (HRUBEC et al, 2002), com ovelhas (MOHRI e REZAPOOR, 2009) e em cães (STOKOL et al, 2001). Segundo este último autor, as diferenças encontradas nas concentrações de albumina medidas no plasma heparinizado foram

devidas à presença de fibrinogênio decorrentes da utilização de plasma, o qual também reage com o corante verde de bromocresol (BCG), dando origem a resultados de albumina superestimados (falsamente elevados).

Porém, estudos comparando a eletroforese em gel e o método bioquímico usando o BCG têm revelado que até no mesmo tipo de amostra estes originam resultados de albumina circulante significativamente diferentes (CRAY et al, 2011; SPANO, 1988.).) No trabalho de Cray et al (2011) em pinguins do gênero *Spheniscus* spp, foi demonstrado que uma diferença entre os dois métodos é a ocorrência da reação cruzada das globulinas com o reagente BCG, o que não acontece no caso da eletroforese. Dada esta complicação, não é possível aplicar nenhum fator de correção aos resultados da bioquímica com BCG. Portanto, segundo Cray et al (2011), a metodologia BCG não deve ser utilizada para determinar a concentração de albumina em amostras de pinguins.

Além disso, Cray et al (2011) também demonstrou uma variabilidade ainda não descrita na reação do BCG

em amostras de aves; nomeadamente uma superestimação da concentração de albumina em amostras de animais com alterações clínicas, e valores de albumina subestimados em animais sem sintomatologia. Este último fenômeno também foi descrito em uma revisão com amostras de psitacídeos clinicamente normais (JONHSTON et al, 2007).

Embora nos seus estudos em pinguins-de-Magalhães, Cray et al (2011) não tenha encontrado diferença entre o soro e o plasma heparinizado, concluiu-se que os valores de albumina mensurados pelo método do BCG não são confiáveis nestes animais, quer pela interferência das globulinas com o corante, quer pela presença do fibrinogênio, quer pela utilização de padrões de albumina humana.

O corante púrpura de bromocresol (BCP) também é comumente usado em laboratórios humanos e possui uma melhor afinidade de ligação à albumina humana, mas a sua utilidade na medicina aviária ainda não foi testada.

5.2 ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

Neste trabalho, os valores de atividade da ALT no plasma com EDTA foram significativamente inferiores aos do soro, tal como ocorreu no estudo de Alves (2013) em araras Canindé (*Ara ararauna*). Segundo Mohri et al (2007), o EDTA quela não somente o cálcio, mas também os íons magnésio, zinco e ferro, necessários como cofatores para a atividade da enzima mencionada, o que poderia justificar a diferença observada neste estudo ao se comparar amostras de plasma com EDTA e soro.

5.3 COLESTEROL (CHOL)

Embora tenham havido diferenças significativas nas médias entre o plasma dos dois anticoagulantes e o soro, o erro relativo no plasma com heparina foi abaixo de 10%, o qual não é considerado clinicamente relevante. Já no plasma com EDTA, o erro relativo foi maior e, portanto, estimado como possivelmente significativo em termos clínicos.

Segundo as instruções do fabricante, o plasma com EDTA não deve ser usado para a mensuração dos níveis de colesterol, pois dá origem a resultados subestimados (falsamente diminuídos). Mohri e Rezapoor (2009) também verificaram diminuição nos valores de colesterol no plasma com EDTA de ovinos, atribuindo como causa a inibição de reagentes cromógenos e interferência com outras reações.

Tal como no presente trabalho, Hrubec et al (2002) descreveu a ausência de diferenças significativas entre os valores de colesterol medidos no soro e plasma com heparina em galinhas; em contrapartida não foram encontrados dados sobre a influência do EDTA nas dosagens bioquímicas de colesterol em aves.

5.4 CREATINAQUINASE (CK)

Hrubec et al (2002) encontraram diferenças significativas entre a atividade de CK mensurada no plasma heparinizado e no soro de galinhas, estando os valores diminuídos no plasma. Entretanto, no presente trabalho foram encontradas diferenças nos valores medidos no plasma com EDTA mas não no plasma com

heparina, sendo os resultados superestimados (falsamente aumentados) em relação ao soro. Em conformidade com Hrubec et al (2002) mas em contraste com o ensaio em questão, estudos reportados em humanos demonstraram que o EDTA resulta em valores de CK falsamente diminuídos (YOUNG e BERMES, 1999).

A CK é uma enzima citosólica e mitocondrial presente nos miócitos (músculo esquelético e liso – cardíaco e gastrointestinal) dependente de magnésio. Compostos como o EDTA que interferem com a concentração destes íons circulantes podem inibir a reação utilizada na mensuração da sua atividade. Embora tenha diferido do previsto, supõe-se que causa do aumento da atividade desta enzima no plasma com EDTA possa estar relacionada com o maior grau de hemólise verificado neste tipo de amostra. Neste caso, uma vez que o magnésio é, após o potássio, o segundo cátion mais abundante no fluido intracelular dos organismos vivos, a presença deste íon em grandes quantidades no plasma poderia superar a capacidade quelante do EDTA e acabaria por resultar em uma maior ativação enzimática (HOCHLEITNER, 1994).

Segundo Lumeij (2008), a dosagem da CK deve ser avaliada em conjunto com a enzima LDH para a obtenção de um maior valor diagnóstico. Por um lado, a enzima LDH, também é afetada pela hemólise por ser um componente intra-eritrocitário, logo, aumentos concomitantes nas duas enzimas não são conclusivos. Porém, um aumento da CK sem o aumento correspondente da LDH, pode ser um indicador de lesão muscular e, por sua vez, um aumento da LDH sem aumento da CK pode estar relacionado com uma lesão hepática. Dado esta característica sinérgica do valor diagnóstico das duas enzimas, alterações na atividade da CK devido à presença do EDTA podem facilmente levar a diagnósticos equivocados.

Outra possível causa dos aumentos de CK no plasma com EDTA pode estar relacionada com a punção acidental de tecido muscular durante a colheita sanguínea, em que se verificaria um aumento desta enzima nos primeiros mililitros de sangue, e, portanto, a sua atividade estaria aumentada apenas no tubo preenchido em primeiro lugar, neste caso o tubo contendo EDTA. Esta hipótese, sugerindo o descarte dos

primeiros mililitros de sangue após a colheita para excluir os efeitos de lesões musculares na atividade da CK, permanece por ser testada (DAWSON et al, 2011).

5.5 FOSFATASE ALCALINA (FA)

Como esperado, encontraram-se diferenças estatísticas nos valores de FA no plasma com EDTA, sendo diminuídos em relação às amostras de plasma com heparina e soro.

O EDTA forma complexos com o magnésio, que é um importante ativador da ação enzimática, inviabilizando a sua mensuração. Hawkins et al (2006) verificou uma diminuição considerada não clinicamente significativa na atividade da FA no plasma heparinizado de papagaios-do-mangue (*Amazona amazonica*). Não foram encontrados estudos com medições deste analito em plasma com EDTA de aves.

Por outro lado, a mensuração da FA sofre fortemente interferências pela presença de hemoglobina (>30 mg/dL) restando poucas amostras com um grau de hemólise e/ou concentração de hemoglobina livre

suficientemente baixas para perfazer um N adequado para comparação. Ainda assim, os resultados no plasma com EDTA apareceram consideravelmente diminuídos, não só em relação aos valores encontrados no soro e plasma heparinizado, mas também quando comparados com os valores da literatura e intervalos de referência da AZA.

5.6 GAMA GLUTAMILTRANSFERASE (GGT)

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

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. No entanto, outros estudos em aves (flamingos-americanos - *Phoenicopterus ruber*, araras

azuis grandes - *Anodorhynchus hyacinthinus* e em patos-reais - *Anas platyrhynchos*) não demonstraram estas diferenças (FRANCO et al, 2010). Igualmente, o presente estudo corroborou com trabalhos em que não ocorreram diferenças nos valores de GGT entre soro e plasma heparinizado tal como em equinos (MOHRI et al, 2007), ovinos (MOHRI e REZAPOOR, 2009), felinos (KAMALI e MOHRI, 2015) e avestruzes (MOHRI et al, 2009).

5.7 PROTEÍNAS TOTAIS (PT)

Os valores de proteínas totais foram superiores no soro do que no plasma com os diferentes anticoagulantes. Sendo a principal diferença entre plasma e soro a presença do fibrinogênio no plasma, o qual por ação do anticoagulante não é utilizado na cascata de coagulação, seria de esperar uma concentração de proteínas totais maior no plasma do que no soro (MELILLO, 2013). Contudo, em estudos realizado em outras aves, como o papagaio-do-mangue (*Amazona amazonica*) (HAWKINS et al, 2006) e em galinhas (HRUBEC et al, 2002) os valores de proteínas totais também foram superiores no plasma heparinizado

em relação ao soro, 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.

Valores maiores de proteínas totais no plasma em relação ao soro foram encontrados por outros autores em outras espécies, como em bovinos, em que supostamente pode estar relacionada com o deslocamento osmótico de líquidos a partir dos eritrocitos para o plasma (MOHRI et al, 2007). Franco et al (2010), em estudos com flamingos-americano (*P. ruber*), araras azuis grandes (*A. hyacinthinus*) e patos-reais (*A. platyrhynchos*) encontrou valores maiores no soro do que no plasma e atribuiu a diferença à presença de fibrinogênio. Isto realça a diferenças entre as espécies de aves e a necessidade de se realizarem estudos espécie-específicos.

Adicionalmente, os valores médios de proteínas totais obtidos neste estudo pareceram estar aumentados em relação a todos os estudos publicados para a mesma espécie, independentemente do tipo de amostra. Devido

a este fato, poderia duvidar-se da validade do método empregado no atual trabalho uma vez que os animais se encontravam supostamente saudáveis e hidratados, sem nenhuma razão para um aumento nesse analito. Contudo, a dosagem das proteínas totais no presente estudo foi realizada também por meio do uso de refractómetro, fornecendo mais dados sobre a qualidade do método.

Apesar das medianas emparelhadas no plasma heparinizado medidas por refratometria (7,3) ou espectrofotometria (7,7) terem diferido significativamente, os valores foram altamente correlacionados ($r^2=0,9$) e ainda elevados relativamente à literatura. Embora a refratometria para determinação das proteínas totais na maioria das aves não seja recomendada devido à interferência de outros solutos, tais como lípideos e a glicose, os quais em elevada quantidade provocam a refração de luz no plasma, estudos em galiformes demonstraram uma boa correlação entre as concentrações de proteínas obtidas por refratometria e pelo método bioquímico do biureto (ANDREASEN et al, 1989). Tanto quanto se sabe, não existem estudos comparando estes dois métodos em pinguins-de-

Magalhães. O método de biureto é o método mais preciso para quantificar a proteína total no ambiente clínico, em que as amostras a partir de muitas espécies diferentes podem ser avaliadas, mas a realização dos dois métodos em simultâneo permite, de certa forma, validar a veracidade dos resultados (HARR, 2006).

5.8 TRIGLICÉRIDES (TG)

Foram encontradas diferenças significativas na concentração de triglicérides em relação ao soro apenas quando mensurada no plasma heparinizado.

Segundo Harr (2006), o plasma com EDTA é preferível para dosagens de triglicerídeos, por ter efeito estabilizador sobre lipoproteínas, ao contrário da heparina, que por ser uma ativadora da enzima lipoproteína lipase, hidrolisa os triglicerídeos diminuindo o seu teor e aumentando o glicerol livre. Neste estudo, ao contrário do esperado, foram obtidos valores superiores no plasma heparinizado em comparação ao soro, talvez devido ao método empregado não ter descontado o excesso de glicerol livre.

Segundo Alves (2013) os resultados de triglicerídeos em araras Canindé (*A. ararauna*) tiveram médias plasmáticas (tanto no EDTA como na heparina) significativamente abaixo da média do soro e demonstraram ser uma variável bastante instável para a espécie, com coeficientes de variação acima de 90%, inclusive em amostras de soro. Embora, estudos com ovinos descrevam resultados com diminuição significativa deste analito também no plasma com EDTA (LABORDE et al, 1995; MORRIS et al, 2002), existem trabalhos em que esta diferença não foi encontrada nos valores de triglicerídeos plasmáticos de cães, cavalos e camelos (CÉRON et al, 2004; MORHI et al, 2007; MOHRI et al, 2008).

Além disso, verificou-se que nenhum dos trabalhos com dados da bioquímica clínica de pinguins-de-Magalhães apresentaram valores de triglicérides, nem mesmo os intervalos de referência da AZA. Encontraram-se apenas valores de triglicérides para pinguins de outras espécies, nomeadamente em pinguins africanos (*Spheniscus demersus*), média 56 mg/dL medido no soro (GRACZYK et al, 1995) e média 82 md/dL no plasma heparinizado (CRAY et al, 2010), 75

mg/dL em pinguins do gênero *Pygoscelis* spp medidos no plasma heparinizado (AGUILERA et al, 1993) e aproximadamente 80 mg/dL em pinguins de barbicha (*Pygoscelis antártica*) medidos também em plasma heparinizado (FERRER et al, 1994). Nestas espécies os valores parecem semelhantes aos do presente estudo, pelo que podem ser considerados como referência para pinguins-de-Magalhães, mas o seu valor diagnóstico continua por estudar.

5.9 GLOBULINAS

Os valores de globulinas deste estudo não são confiáveis, pois dependem da mensuração de albumina, cujo método de determinação não foi considerado aceitável para pinguins-de-Magalhães (CRAY et al, 2010). Logo, estes não serão discutidos com o intuito de comparar a viabilidade diferentes tipos de amostra, mas sim como comparação do presente estudo com os intervalos de referência fornecidos na literatura, o quais também foram, na sua maioria, obtidos pelo mesmo método.

O fato dos valores médios das globulinas no soro deste trabalho terem sido acima dos valores de referência fornecidos pela AZA, reflete na realidade os baixos valores médios de albumina e os altos valores médios de proteínas totais. Uma vez que os valores de albumina não podem ser discutidos devido à ineficiência do método, pode-se focar nos valores de proteínas totais. Estes foram relativamente elevados em comparação com todos os artigos de bioquímica clínica publicados em *S. magellanicus* (CAMPOS et al, 2014 ; CORAIOLA, 2012; GHEBREMESKEL et al, 1989).

A hipótese mais simples para explicar o elevado teor de proteínas totais neste estudo seria a presença de desidratação nestes animais de reabilitação, mas esta não se confirma devido aos valores de albumina e ácido úrico normais.

Por outro lado, os altos valores médios de proteínas totais também poderiam ser devidos a uma hiperglobulinemia verdadeira causada por estados inflamatórios, no entanto os animais com alterações visíveis ao exame físico foram excluídos, e, portanto, teriam de se tratar de inflamações subclínicas.

Segundo Villouta et al (1997), o confinamento por mais de três semanas de pinguins de vida livre pode levar a um aumento das proteínas totais e globulinas.

Face ao problema do BCG na determinação da albumina e, consequentemente das globulinas, Cray et al (2011) propôs a implementação da eletroforese em gel nas avaliações clínicas de pinguins-de-Magalhães, uma vez que permite avaliar as frações proteicas mais detalhadamente e com menos interferências.

5.10 GRAU DE HEMÓLISE

Finalmente, tal como mostrou a tabela 6, tanto a concentração de hemoglobina livre como a classificação visual da hemólise, não apresentaram uma distribuição paramétrica, o que já era esperado uma vez que os fatores que influenciam a hemólise são diferentes de amostra para amostra, como fragilidade osmótica, tempo de separação ligeiramente diferente, diferenças na pipetagem.

Optou-se por utilizar a classificação visual da hemólise final, ao invés da inicial (registrada no dia da separação), para comparação dos métodos de avaliação da hemólise pelo coeficiente de correlação, pois a pontuação hemolítica visual final foi realizada no mesmo dia da dosagem da hemoglobina, contemplando nos dois casos, os efeitos do congelamento e, portanto, levando a uma comparação dos métodos com menos variáveis interferentes. No entanto, o registro da classificação visual nas duas etapas foi importante, fornecendo dados sobre o efeito dos anticoagulantes durante o tempo de armazenamento e após o descongelamento.

A correlação elevada (>0.8) encontrada entre a classificação visual de hemólise e a dosagem da concentração de hemoglobina livre medidas em todas as amostras, foi contrária aos estudos de Hawkins et al (2006) em papagaios-do-mangue, onde não relataram correlação entre os dois métodos, provavelmente porque estes se basearam em uma escala visual menos detalhada que a do presente estudo.

Embora as amostras de plasma com EDTA tenham tido uma mediana de concentração de

hemoglobina livre mais elevada que no soro e plasma com heparina, as amostras de soro tiveram uma maior pontuação hemolítica geral. No entanto, todas estas diferenças foram consideradas estatisticamente insignificantes ($p<0,05$) pelo teste de Wilcoxon Sign Rank para amostras emparelhadas.

Provavelmente os anticoagulantes minimizam a hemólise *in vitro* (BLANK et al, 1985) e, neste estudo o EDTA pareceu menos eficaz do que a heparina nesse efeito tanto na dosagem de hemoglobina livre como na classificação visual da mesma. Outro dado que sugeriu a existência de um efeito protetor da heparina, sobre a hemólise *in vitro*, foi a comparação da classificação visual inicial e final da hemólise (antes e depois do descongelamento), em que se verificou aumento da pontuação hemolítica em sete amostras de plasma com EDTA após o descongelamento contra apenas duas no plasma com heparina. Apesar destas diferenças, o valor mediano da classificação visual nos dois tipos de amostra de plasma manteve-se igual antes e depois do congelamento. Entretanto, oito amostras de soro hemolisadas também aumentaram a sua pontuação hemolítica após o descongelamento, chegando a

aumentar o score hemolítico mediano final, possivelmente devido à ausência de agentes anticoagulantes com efeito protetor.

A causa do maior índice hemolítico ter sido encontrado no soro (depois do congelamento), mas este ter tido uma menor concentração mediana de hemoglobina livre do que o plasma com EDTA, pode ser devida ao fato da separação do soro após centrifugação ser mais difícil, pelo menor volume da amostra, podendo ter havido pipetagem accidental da fração celular, mas sem hemólise aparente. Com o advento do descongelamento, alguma parte da fração celular pipetada no soro poderá ter sofrido hemólise, mas ainda não atingindo a quantidade de hemoglobina livre presente no plasma com EDTA. Estes dados sugerem que o EDTA, mais do que o descongelamento, pode estar associado à hemólise das células sanguíneas em pinguins-de-Magalhães. No entanto, estas sugestões (efeito protetor da heparina ou efeito deletério do EDTA) necessitam de estudos comprobatórios.

Cita-se novamente o trabalho de Parsons et al (2015) em pinguins africanos (*S. demersus*), em que este

preferiu a utilização de soro em relação ao plasma devido a impossibilidade de separação imediata das amostras, aludindo ao desconhecimento sobre o efeito da presença (prolongada) de anticoagulantes na análise bioquímica, daí que mais estudos são necessários para confirmar as sugestões deste estudo.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com a metodologia adotada, pode-se concluir que o plasma heparinizado é um tipo de amostra confiável para avaliação bioquímica do sangue de pinguins-de-Magalhães na maioria dos metabólitos e enzimas avaliados, ao contrário do plasma com EDTA. Além disso, a heparina apresenta menores índices de hemólise *in vitro* (visual e dosagem de hemoglobina livre) em relação ao EDTA e ao soro, embora não se tenha confirmado nem determinado a causa do seu possível efeito protetor.

Estudos com um maior número de animais e analitos ensaiados são necessários para explorar a necessidade de intervalos de referência específicos para o plasma heparinizado.

7 REFERÊNCIAS

AGUILERA, E.; MORENO, J.; FERRER, M. Blood chemistry values in three *Pygoscelis* penguins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 105, n. 3, p. 471-473, 1993.

ALBANO, N., MASERO, J. A., VILLEGAS, A., ABAD-GÓMEZ, J. M., e SÁNCHEZ-GUZMÁN, J. M. Plasma metabolite levels predict bird growth rates: a field test of model predictive ability. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology**, v.160, n.1, p. 9-15, 2011.

ALONSO-ALVAREZ, C.; FERRER, M.; VINUELA, J.; AMAT, J. A Plasma chemistry of the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* during fasting periods: a case of poor adaptation to food deprivation? **Polar Biology**, Berlin, v. 26, p. 14-19, 2003.

ALVES, G.M. **Efeitos dos anticoagulantes – citrato de sódio, EDTA-K3 e heparina sódica nas análises hematimétricas e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemys scripta*) e Pacamás (*Lophiosilurus alexandri*).** – Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

ANDREASEN, C. B.; ANDREASEN, J. R.; THOMAS, J. S. Effects of hemolysis on serum chemistry analytes in ratites. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 26, n. 4, p. 165-171, 1997.

ANDREASEN, C. B.; LATIMER, K. S.; KIRCHER, I. M.; BROWN, J. Determination of chicken and turkey plasma and serum protein concentrations by refractometry and the biuret method. **Avian Diseases**, v. 33, p.93-96, 1989.

ANDREASEN, J. R.; ANDREASEN, C. B.; SONN, A. B.; ROBESON, D. C. The effects of hemolysis on serum chemistry measurements in poultry. **Avian Pathology**, v. 25, n. 3, p. 519-536, 1996.

ANDRIOLO, A.; BARBOSA, I.V. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. **Medicina laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. São Paulo**, v. 2, 2009.

ARTACHO, P.; SOTO-GAMBOA, M.; VERDUGO, C.; NESPOLO, R. F. Blood biochemistry reveals malnutrition in black-necked swans (*Cygnus melanocoryphus*) living in a conservation priority area. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, Oxford, v. 146, n. 2, p. 283–290, 2007.

ASSOCIATION OF ZOOS AND AQUARIUMS, PENGUIN TAXON ADVISORY GROUP. **Penguin (Spheniscidae) Care Manual**. Silver Spring, 2014.

BEAULIEU, M.; REICHERT, S.; LE MAHO, Y.; ANCEL, A.; CRISCUOLO, F. Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event. **Functional Ecology**, v. 25, n. 3, p. 577-585, 2011.

BECHERT, U.; CHRISTENSEN, J. M.; POPPENGA, R.; LE, H.; WYATT, J.; SCHMITT, T. Pharmacokinetics of orally administered terbinafine in African penguins

(*Spheniscus demersus*) for potential treatment of aspergillosis. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 2, p. 263-274, 2010.

BLANK, D.; KROLL, M. H.; RUDDEL, M. E.; ELIN, R. J. Hemoglobin interference from in vivo hemolysis. **Clinical chemistry**, v. 31, n. 9, p. 1566-1569, 1985.

BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, v. 58, n. 7, p. 597-607, 2008.

BOERSMA, P. D.; FRERE, E.; KANE, O.; POZZI, L. M.; PÜTZ, K.; RAYA-REY, A.; REBSTOCK, G. A.; SIMEONE, A.; SMITH, J.; VAN BUREN, A.; YORIO, P.; BORBOROGLU, P. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). In: BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D. **Penguins: natural history and conservation**. Seattle: Washington University Press, p. 145-152, 2013.

BOERSMA, P. D.; REBSTOCK, G. A.; FRERE, E.; MOORE, S. Following the fish: penguins and productivity in the South Atlantic. **Ecological Monographs**, v. 79, n. 1, p. 59-76, 2009.

BOERSMA, P. D.; STOKES, D. L.; YORIO, P. M. Reproductive variability and historical change of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Punta Tombo, Argentina. In: DAVIS, L. S.; DARBY, J. T. **Penguin Biology**. San Diego: Academic Press, p.15-43. 1990.

BORBOROGLU, P. G.; BOERSMA, P. D. (Eds.) **Penguins: natural history and conservation**. University of Washington Press. 2013.

BORBOROGLU, P., ...; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1652-1657, 2010.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Cartilha do Projeto Nacional de Monitoramento do pinguim-de-Magalhães. 2010.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, A. R. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**, (5^a ed.) WB Saunders, Philadelphia, p. 31-43, 2001.

CAMPBELL, T. Blood biochemistry of lower vertebrates. **55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)**, (Ed.) Publisher: American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA. 2004.

CAMPOS, S. D.; ...; ALMOSNY, N. R. Analysis of hematologic and serum chemistry values of *Spheniscus magellanicus* with molecular detection of avian malarial parasites (*Plasmodium* spp.). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1236-1242, 2014.

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.

CERÓN, J. J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; HENNEMANN, C. E; TECLES, F. The effects of different anticoagulants

on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, v.167, p. 294-301. **2004**.

CORAIOLA, A. M. Indicadores clínicos, hematológicos, bioquímicos e toxicológicos na pré e pós-reabilitação de Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus Magellanicus*) no Sul do Brasil.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CORAIOLA, A. M.; KOLESNIKOVAS, C. K.; KRUL, R.; MANGINI, P. R.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Clinical, hematological, total plasma protein and fibrinogen parameters of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) pre-and post-rehabilitation. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 43-48, 2014.

CRANFIELD, M. R. Sphenisciformes (Penguins). In: **FOWLER, M. E.; MILLER, R. E.** **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5 (ed). St Louis. WB Saunders, cap.11, p. 103-110, 2003.

CRAY, C.; STREMME, D. W.; ARHEART, K. L. Post prandial biochemistry changes in penguins (*Spheniscus demersus*) including hyperuricemia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 2, p. 325-326, 2010.

CRAY, C.; WACK, A.; ARHEART, K. L. Invalid measurement of plasma albumin using bromcresol green methodology in penguins (*Spheniscus species*). **Journal of avian medicine and surgery**, v. 25, n. 1, p. 14-22, 2011.

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

DABBERT, C. B.; POWELL, K. C. Serum enzymes as indicators of capture myopathy in mallards (*Anas platyrhynchos*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 29, n. 2, p. 304-309, 1993.

DAWSON, D. R.; DEFRENANCISCO, R. J.; MIX, S. D.; STOKOL, T. Reference intervals for biochemical analytes in serum and heparinized plasma and serum protein fractions in adult alpacas (*Vicugna pacos*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 538-548, 2011.

DUBIN, S.; HUNT, P. Effect of anticoagulants and glucose on refractometric estimation of protein in canine and rabbit plasma. **Laboratory Animal Science**. v. 28, p. 541–544, 1979.

DUNBAR, M. R.; GREGG, M. A.; CRAWFORD, J. A.; GIORDANO, M. R.; TORNQUIST, S. J. Normal hematologic and biochemical values for prelaying greater sage grouse (*Centrocercus urophasianus*) and their influence on chick survival. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 3, p. 422-429, 2005.

EISENHAWER, E.; COURTNEY, C. H.; RASKIN, R. E.; JACOBSON, E. Relationship between separation time of plasma from heparinized whole blood on plasma biochemical analytes of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 39, n. 2, p. 208-215, 2008.

ELLIS, S.; BRANCH, S. **Penguin Husbandry Manual.** (Ed.) AZA, EUA, p. 134, 1994.

Excel RealStats. Microsoft Office, 2010.

FERRER, M. I.; AMAT, J. A.; VIÑUELA, J. Daily variations of blood chemistry values in the Chinstrap Penguin (*Pygoscelis antarctica*) during the Antarctic summer. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107, n. 1, p. 81-84, 1994.

FRANCO, K. H.; HOOVER, J. P.; BACKUES, K. A.; PAYTON, M. E. Comparison of biochemical values of paired serum and plasma samples from American Flamingos (*Phoenicopterus ruber*), Indian Runner ducks (*Anas platyrhynchos*), and Hyacinth Macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 19, n. 2, p. 169-176, 2010.

FUDGE, A. M. **Laboratory medicine: Avian and exotic pets.** Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000.

GERLACH, C. Differential blood count and plasma enzymes in birds of prey during one year: May 1977- May 1978. **Prakt Tierärzt**, v. 60, n. 8, p. 673-680, 1979.

GHEBREMESKEL, K.; WILLIAMS, G.; KEYMER, I. F.; HORSLEY, D.; GARDNER, D. A. Plasma chemistry of Rockhopper (*Eudyptes crestatus*), Magellanic (*Spheniscus magellanicus*) and Gentoo (*Pygoscelis papua*) wild penguins in relation to moult. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 92, n. 1, p. 43-47, 1989.

GOLDSTEIN, D. L.; SKADHAUGE E. Renal and extrarenal regulation of body fluid composition. In: Whittow GC (ed): **Sturkie's Avian Physiology**. San Diego, Academic Press, p. 265-298, 2000.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; BICKNESE, E. J. Evaluation of serum chemistry values associated with avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitology research**, v. 81, n. 4, p. 316-319, 1995.

GROSCOLAS, R.; ROBIN, J. P. Long-term fasting and re-feeding in penguins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 128, n. 3, p. 643-653, 2001.

GRUNKEMEYER, V. L. Advanced diagnostic approaches and current management of avian hepatic disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 13, n. 3, p. 413-427, 2010.

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

HARR, K. E. Diagnostic value of biochemistry. **Clinical Avian Medicine**, v. 2, p. 611-630, 2006.

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.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: Principles and application**. 1 (ed.) Florida: Wingers Publishing, p. 223-245, 1994.

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 2015. **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 15 mai 2016.

JAENSCH, M. J.; CULLEN, L.; RAIDAL, S. R. Assessment of liver function in galahs/cockatoos (*Eolophus roseicapillus*) after partial hepatectomy: enzyme concentrations, serum bile acid levels, and galactose clearance tests. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.14, p. 164-171, 2000.

JENCEK, J. E.; BEAUFRÈRE, H.; TULLY JR, T. N.; GARNER, M. M.; DUNKER, F. H.; BASZLER, T. V. An outbreak of *Chlamydophila psittaci* in an outdoor colony of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26, n. 4, p. 225-231, 2012.

JOHNSTON, M. S.; ROSENTHAL, K. L., SHOFER, F. S. Assessment of a point-of-care biochemical analyzer and comparison with a commercial laboratory for the measurement of total protein and albumin concentrations in psittacines. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 12, p. 1348-1353, 2007.

KAMALI, H.; MOHRI, M. Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of cat: comparison with serum. **Revue de Medicine Veterinaire**, v. 166, n. 9-10, p. 275-279, 2005.

KOLMSTETTER, C. M.; RAMSAY, E. C. Effects of feeding on plasma uric acid and urea concentrations in blackfooted penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 14, n. 3, p. 177-179, 2000.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. Aids to diagnosis. In: **Essentials of Avian Medicine and Surgery**. B. H. Coles, (ed.) Blackwell Publishing, Oxford, UK. p. 56-75, 2004.

LABORDE, C. J.; CHAPA, A. M.; BURLEIGH, D. W.; SALGADO, D. J.; FERNANDEZ, J. M. Effects of processing and storage on the measurement of nitrogenous compounds in ovine blood. **Small Ruminant Research**, v. 17, n. 2, p. 159-166, 1995.

LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Williams and Wilkins, Philadelphia, Wang KH, Musa HH. p 486-490, 2007.

LEWANDOWSKI, A. H.; CAMPBELL, T. W.; HARRISON, G. J. Clinical chemistries. In: Harrison GL, Harrison LR (ed.) **Clinical Avian Medicine and Surgery**. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 192-200, 1986.

LIMA-OLIVEIRA, G. D. S.; PICHETH, G.; SUMITA, N. M. E.; SCARTEZINI, M. Quality control in the collection of diagnostic blood specimens: illuminating a dark phase of

preanalytical errors. **Jorna I Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 441-447. 2009.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*): Chronic exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, n. 4, p. 737-744, 2004.

LOW, M.; EASON, D.; ELLIOTT, G.; MCINNES, K.; PAUL-MURPHY, J. Hematologic and biochemical reference ranges for the Kakapo (*Strigops habroptilus*): Generation and interpretation in a field-based wildlife recovery program. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 20, p. 80-88, 2006.

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.

LUMEIJ, J. T.; MEIDAM, M.; WOLFSWINKEL, J.; VAN DER HAGE, M. H.; DORRESTEIN, G. M. Changes in plasma chemistry after druginduced liver disease or muscle necrosis in racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Avian Patholgy**, v. 17, p. 865-874, 1988.

MÄDER, A.; SANDER, M.; CASA JR., G. Ciclo sazonal de mortalidade do pinguim-de-Magalhaes, *Spheniscus magellanicus* influenciado por fatores antrópicos e climáticos na costa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**. v. 18, n. 3, p. 228-233, 2010.

MAZZARO, L. M.; MEEGAN, J.; SARRAN, D.; ROMANO, T. A.; BONATO, V.; DENG, S.; DUNN, J. L. Molt-associated changes in hematologic and plasma biochemical values and stress hormone levels in African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 27, n. 4, p. 285-293, 2013.

MAZZARO, L. M.; TUTTLE, A.; WYATT, J.; GOODMAN, J.; KADYSZEWSKI, E.; DUNN, J. L. Plasma electrolyte concentrations in captive and free-ranging African penguins (*Spheniscus demersus*) maintained with and without dietary salt supplements. **Zoo Biology**, v.23, n. 5, p. 397-408, 2004.

MCNAUGHTON, A.; FRASCA JR. S.; MISHRA, N.; TUTTLE, A. D. Valvular dysplasia and congestive heart failure in a juvenile african penguin (*Spheniscus demersus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 45, n. 4, p. 987-990, 2014.

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

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FEDULLO, L. P. L.; FROMM-TRINTA, A.; LANDAU-REMY, G.; RAMOS JR, V. A.; LABARTHE, N. Avaliação da glicose sérica em pinguim de magalhães (*Spheniscus magellanicus* FOSTER, 1781) (Sphenicidae-aves) em cativeiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 390-391, 2007.

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, 2008.

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

MOHRI, M.; SANI, R. N.; 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. 845-849, 2009.

MORENO-SALAS, L.; NILSSON-SAÉZ, L.; CORVALÁN, F.; ARDILES-VILLEGAS, K.; MERINO-MUÑOZ, V.; ISLAS-LETELIER, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. Comparación de los valores hematológicos y bioquímicos en pingüinos *Spheniscus humboldti* (Sphenisciformes: Spheniscidae) salvajes y en cautiverio. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 24, n. 3, p. 267-272, 2014.

MORRIS, J. D.; FERNANDEZ, J. M.; CHAPA, A. M.; GENTRY, L. R.; THORN, K. E.; WEICK, T. M. Effects of sample handling, processing, storage, and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 2, p. 157-166, 2002.

NAJLE, R.; SOLANA, H. D.; BOTTINO, D.; JUÁRES, M. A.; MAUAD, M.; MONTALTI, D. The use of serum proteins as biological markers of contamination of gentoo *Pygoscelis papua* and adelie *P. adeliae* penguins. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 107-112, 2006.

NIEMEYER, C.; VANSTREELS, R.; RUOPPOLO, V.; NASCIMENTO, T. A. D.; CATÃO-DIAS, J. L.; SAVIOLI, J.; ... MARACINI, P. Resultados patológicos preliminares sobre a morte de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no litoral do estado de São Paulo. **Anais da Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli**, v. 4, n. 1, p. 33, 2010.

PARSONS, N. J.; SCHAEFER, A. M.; VAN DER SPUY, S. D.; GOUS, T. A. Establishment of baseline haematology and biochemistry parameters in wild adult African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 86, n. 1, p. 01-08, 2015.

PHALEN, D. N.; HOMCO, L.; JAEGER, L. Investigation into the etiologic agent of internal papillomatosis of parrots and ultrasonographic and serum chemical changes in Amazon parrots with bile duct carcinomas. In: **Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians. AAV, Boca Raton, FL**, p. 53-56, 1997.

PILNY, A. A. The avian pancreas in health and disease. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 1, p. 25-34, 2008.

POZZI, L. M.; BORBOROGLU, P. G.; BOERSMA, P. D.; PASCUAL, M. A. Population regulation in magellanic penguins: what determines changes in colony size? **PloS one**, v. 10, n. 3, p. 0119002, 2015. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0119002>.

RAJMAN, M.; JURÁNI, M.; LAMOSOVA, D.; MACAJOVA, M.; SEDLACKOVA, M.; KOSTAL, L.; JEZOVA, D.; VYBOH, P. The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus gallus*). **Comparative Biochemistry and Phisiology**, Part A, n. 145, p. 363-371, 2006.

RAMÍREZ, F.; HOBSON, K. A.; WANGENSTEEN, O. S.; GENOVART, M.; VISCOR, G.; SANPERA, C.; JOVER, LL. A physiological marker for quantifying differential reproductive investment between the sexes in yellow-legged gulls (*Larus michahellis*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 396, n. 1, p. 48–52, 2010.

REMAGE-HEALEY, L.; ROMERO, L. M. Corticosterone and insulin interact to regulate glucose and triglyceride levels during stress in a bird. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 3, p. 994-1003, 2001.

ROZMAN, R.S.; LOCKE, L.N.; MCCLURE, S.F. Enzyme changes in mallard ducks fed iron or lead shot. **Avian Diseases**, v. 18, p. 435-445, 1974.

RUOPPOLO, V.; ADORNES, A. C.; NASCIMENTO, A. C.; SILVA R. P. Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, v. 51, p. 78-83, 2004.

SALIBIAN, A; MONTALTI, D. Physiological and biochemical aspects of the avian uropygial gland. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 437-446, 2009.

SCHMIDT, E.; LOCATELLI -DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SCOLARO, J. A.; WILSON, R. P.; LAURENTI, S.; KIERSPEL, M.; GALLELLI, H.; UPTON, J. A. Feeding preferences of the Magellanic penguin over its breeding range in Argentina. **Waterbirds**, p.104-110. 1999.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**: uma introdução. 1 (ed.) Rio de Janeiro, Nova Fronteira, p. 912, 1997.

SILVA, P. M. Conteúdo gastrointestinal do Pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil: análise dos itens alimentares e resíduos poliméricos. – **Trabalho de conclusão da graduação em Ciências Biológicas**, 2013.

SILVA, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (Pinguim). In: Zalmir Cubas; Jean Carlos Ramos Silva; José Luiz Catão-Dias. (Org.). **Tratado de Medicina Veterinária de Animais Selvagens**. São Paulo: (Ed.) Roca, p. 309-323. 2006.

SMITH, K. M.; ... COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. **Avian diseases**, v. 52, n. 1, p. 130-135, 2008.

SPANO, J. S. WHITESIDES, J. F., PEDERSOLI, W. M., KRISTA, L. M., & RAVIS, W. M. Comparative albumin determinations in ducks, chickens, and turkeys by electrophoretic and dye-binding methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 3, p. 325-326, 1988.

STANFORD, M. Significance of cholesterol assays in the investigation of hepatic lipidosis and atherosclerosis in psittacine birds. **Exotic DVM**, v. 7, n. 3, p. 28, 2005.

STOKOL, T.; TARRANT, J.M.; SCARLETT, J.M. Overestimation of canine albumin concentration with the bromcresol green Método in heparinized plasma samples. **Veterinary Clinical Pathology**, v.30, n. 4, p. 170-176, 2001.

TEARE,J.A.("Spheniscus_magellanicus_No_selection_by_gender_All_ages_combined_Conventional_American_units_2013_CD.html" (ed.) *In: ISIS Physiological Reference Intervals for Captive Wildlife*: A CD-ROM Resource., International Species Information System, Eagan, MN, 2013.

TRAVIS, E. K.; VARGAS, F. H.; MERKEL, J.; GOTTDENKER, N.; MILLER, R. E.; PARKER, P. G. Hematology, serum chemistry, and serology of Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galapagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 3, p. 625-632, 2006.

VANSTREELS, R. E. T. **Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins na costa atlântica da América do Sul**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

VANSTREELS, R. E. T.; ...; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of Plasmodium in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil, **Plos one**, v.9, n.4, e94994, 2014. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094994>.

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

VILLOUTA, G.; HARGREAVES, R.; RTVEROS, V. Haematological and clinical biochemistry findings in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). **Avian Pathology**, v. 26, n. 4, p. 851-858, 1997.

WALLACE, R. S. Sphenisciformes (Penguins). **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine**, p. 8-82, 2014.

WILLIAMS, S. M.; HOLTHAUS, L.; BARRON, H. W.; DIVERS, S. J.; MCBRIDE, M.; ALMY, F.; BUSH, S; LATIMER, K. S. Improved clinicopathologic assessments of acute liver damage due to trauma in Indian ring-necked parakeets 52 (*Psittacula krameri manillensis*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26, n. 2, p. 67–75, 2012.

WILSON, R. P.; JACKSON, S.; THOR STRATEN, M. Rates of food consumption in free-living Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus*. **Marine Ornithology**, v. 35, p. 109-111, 2007.

YOUNG, D. S.; BERMES, E. W. **Specimen collection and processing: sources of biological variation.** In: Burtis, C.A., Ashwood, A.R. (Ed.), Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd (ed.) W.B. Saunders, Philadelphia, p. 42-72, 1999.