



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM JOVENS DE CEGONHA-BRANCA  
(*Ciconia ciconia*) NO ESTADO SELVAGEM**

Lara Sofia Gonçalves Baptista

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes  
Vítor Villa de Brito

ORIENTADOR  
Dr. Fernando González González

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de  
Sousa Jesus

CO-ORIENTADOR  
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Dr. Fernando González González

2011

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM JOVENS DE CEGONHA-BRANCA  
(*Ciconia ciconia*) NO ESTADO SELVAGEM**

Lara Sofia Gonçalves Alves Baptista

Disseertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes  
Vítor Villa de Brito

ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de  
Sousa Jesus

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Dr. Fernando González González

2011

LISBOA

---

*“E se o espaço não fosse imenso?  
E se o espaço nos desse tempo?  
(...)  
E se o tempo não fosse escasso?  
E se o tempo nos desse espaço?  
(...)  
E se o espaço tivesse tempo?  
E se o tempo tivesse espaço?”*

Rui Mendes da Costa



## Agradecimentos

---

Ao meu orientador, Dr. Fernando González González, e à equipa de veterinários do hospital do GREFA, por terem permitido e apoiado a realização do meu trabalho. À equipa de voluntários do laboratório, Leyre, Javi e Cármen pelas horas de apoio profissional e emocional, para conseguir finalmente colocar o Cobas a funcionar. A toda a equipa do GREFA por me terem ensinado tanto em tão pouco tempo, em especial ao Nacho, Isabel e Sandra por me mostrarem e partilharem a sua força e pelo carinho demonstrado. A todos os voluntários e estagiários que passaram pelo GREFA nestes seis meses, no fundo foram vocês que me ensinaram tudo o que aprendi.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, por ter aceite ser meu co-orientador, por todos os conselhos, disponibilidade e pela sua compreensão.

A Marisa Puerta, da Universidade Complutense, pelo envio de artigos importantes à discussão deste estudo e pela partilha do gosto pela cegonha-branca.

Ao Professor Telmo Nunes, por me transmitir os seus conhecimentos na área da estatística, tão imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros no estágio Bea e João, que me incentivaram com a sua boa disposição e força de vontade. Voltamos a encontrar-nos pelo Mundo.

À Janeca, à Jil e à Sofia, por serem as melhores companheiras de viagens. À Ritinha pelas conversas e por me ajudares a compreender a mim própria. À Nídia ... obrigada.

A todas os meus amigos com quem tive a sorte de partilhar estes anos. Em especial ao Ivo pela boa recepção que me fez à chegada a esta faculdade, ao Zé por ser um bom amigo por quem tenho grande admiração, à Fábica por todas as horas de estudo passadas juntas, ao André pelos conhecimentos culturais e pela companhia durante o estágio, ao Diniz pelo seu gosto pela natureza e pelo seu humor que tanto me faz rir, à Teresa pelo riso contagiante, à Daniela pelas fotografias que tanto nos vão fazer recordar, à Cátia pela amizade, à Doxy que tive o prazer de conhecer melhor durante os meses que partilhamos no estágio e me surpreendeu.

À Joana e à Cláudia pela amizade, e pelas noitadas de estudo e de festa. Vocês viram-me crescer e transformar-me no que sou hoje.

Ao Rafael, por me mostrar a simplicidade da vida e incentivar a expressão dos 5 sentidos. Obrigada pelo apoio e pela lareira.

Aos meus avós paternos que desde cedo me permitiram o prazer de arrancar uma fruta da árvore e sentir o cheiro da terra.

Aos meus avós maternos que sempre foram exigentes e quiseram que eu fosse a melhor. Só mais tarde me apercebi que o que queriam dizer era que ser a melhor não é ter melhores notas ou simplesmente Ter, mas sim Ser.

Por fim, uma palavra às pessoas mais importantes para mim, a minha família. À minha mãe que me surpreende a cada dia com a sua inocência e cuja presença me transmite tranquilidade e felicidade. Ao meu pai que partilha comigo os meus passatempos e, cada vez mais me vou apercebendo que aquilo que me fascina já o fascinou a ele e que ainda tem muito para dar e para me ensinar. À minha irmã, por ser a minha melhor amiga. Obrigada por participarem nos meus sonhos.

# HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM JOVENS DE CEGONHA-BRANCA (*Ciconia ciconia*) NO ESTADO SELVAGEM

## Resumo

A hematologia e bioquímica sanguínea são duas ferramentas de diagnóstico, cuja utilização se encontra em expansão na clínica de aves selvagens. Devido à elevada variabilidade inter-específica e variação constante dos estatutos de conservação de cada espécie, provocada pela quantidade de ameaças existentes a estes animais, tornou-se indispensável o conhecimento dos valores de cada espécie, para assim poder realizar um melhor trabalho clínico em centros de recuperação.

O principal objectivo deste trabalho foi a obtenção de valores hematológicos e bioquímicos, em 77 indivíduos jovens de cegonha-branca (*Ciconia ciconia*), admitidos no hospital de fauna selvagem do *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* e, pesquisa da influência da idade e jejum nos resultados obtidos.

Em relação aos parâmetros hematológicos em estudo foram obtidos valores variáveis com a idade dos indivíduos, sugerindo um aumento no valor do hematócrito e contagem total de eritrócitos com o crescimento e, uma redução no valor da contagem total de leucócitos, não ocorrendo alterações na contagem total de trombócitos em função da idade. Foi também realizada a pesquisa de hemoparasitas, não tendo estes sido detectados na amostra.

Nos parâmetros bioquímicos foram também obtidas diferenças relacionadas com a idade, sugerindo os resultados um aumento no valor plasmático de proteínas totais, cálcio, glucose e alanina aminotransferase (ALT) com o crescimento e, uma redução no valor plasmático de fosfatase alcalina, fósforo, aspartato aminotransferase (AST). Foi também observado um aumento pós-prandial do valor plasmático de ácidos biliares, ácido úrico e triglicéridos e a influência do tipo de alimentação nos valores de fósforo, proteínas totais, ácido úrico e triglicéridos. Foram obtidos valores mais elevados de lactato desidrogenase (LD) e creatina quinase (CK) em animais potencialmente sujeitos a lesão muscular. Por último não foram encontradas alterações, em função da idade e período de jejum, nos valores de gama glutamiltransferase (GGT) e creatinina.

**Palavras-chave:** *Ciconia ciconia*, Cegonha-branca, Idade, Jejum, Hematologia, Bioquímica Sanguínea.





# HEMATOLOGY AND BLOOD CHEMISTRY OF FREE-LIVING YOUNG WHITE STORKS (*Ciconia ciconia*)

## Abstract

Hematology and blood chemistry are two diagnostic tools, which use is expanding in the wild birds clinical practice. Due to the high variability and inter-specific variation in the conservation status of each species, caused by the amount of existing threats to these animals, it became essential to know the reference values of each species, so that clinical rehabilitation centers be able to perform a better job.

The aim of this work was to obtain hematological and blood chemical parameters in young white stork (*Ciconia ciconia*) and assess the influence of age and fasting.

The study methodology was based in blood collection from 77 young animals who were admitted in GREFA, in Madrid, identified as healthy after physical examination and showing good body condition.

With regard to hematological parameters age related differences were obtained, suggesting that an increase in age is accompanied by an increase in hematocrit and total red blood cells count and a decrease in the value of total white blood cells count. There was no change in the total thrombocyte count. The presence of blood parasites has was investigated, but no parasites were found in the sample.

Age related differences were found in blood chemical parameters, suggesting that an advance in age is accompanied by an increase in the amount of total protein, calcium, glucose and alanine aminotransferase (ALT), and a decrease in the amount of alkaline phosphatase, phosphorus, aspartate aminotransferase (AST), uric acid and triglycerides. A postprandial increase in plasma levels of bile acids, triglycerides and uric acid and the influence of food variety in the amounts of phosphorus, total protein and triglycerides was observed. Higher values of lactate dehydrogenase (LD) and creatine kinase (CK) were also obtained in animals potentially subjected to muscle injury. Finally, age and fasting didn't influence gamma glutamyl transferase (GGT) and creatinine's values.

**Key-words:** *Ciconia ciconia*, White Stork, Age, Fasting, Hematology, Blood Chemistry.



# ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Índice de gráficos.....	x
Índice de tabelas.....	xi
Abreviaturas e acrónimos.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
ESTÁGIO CURRICULAR.....	4
DESENVOLVIMENTO TEÓRICO.....	7
1. Ecologia da cegonha-branca ( <i>Ciconia Ciconia</i> ).....	7
1.1 Caracterização da espécie.....	7
1.2 Distribuição Mundial e na Península Ibérica.....	10
1.3 Estatuto de conservação e protecção legal.....	11
1.4 Principais ameaças.....	12
2. Análises laboratoriais sanguíneas.....	13
2.1 Métodos de colheita e armazenamento da amostra sanguínea.....	13
2.2 Hemograma.....	16
2.2.1 Características hematológicas das aves.....	16
2.2.1.1 Eritrócitos.....	17
2.2.1.2 Leucócitos.....	18
2.2.1.3 Trombócitos.....	21
2.2.2 Influências artefactuais, fisiológicas e patológicas nas características hematológicas das aves.....	21
2.2.3 Hemoparasitas.....	24
2.3 Bioquímica sanguínea.....	27
2.3.1 Avaliação renal.....	27
2.3.1.1 Anatomia e fisiologia.....	27
2.3.1.2 Sinais clínicos e exames de diagnóstico na avaliação renal em aves.....	29
2.3.1.3 Parâmetros bioquímicos na avaliação renal em aves.....	30
2.3.2 Avaliação hepática.....	34
2.3.2.1 Anatomia e fisiologia.....	34
2.3.2.2 Sinais clínicos e exames de diagnóstico na avaliação hepatobiliar em aves.....	34
2.3.2.3 Parâmetros bioquímicos na avaliação hepatobiliar em aves.....	35
2.3.3 Influências fisiológicas nos parâmetros bioquímicos plasmáticos das aves.....	42
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	46
1. Objectivos.....	46
2. Materiais e métodos.....	46
2.1 Amostra.....	46
2.1.1 Critérios de inclusão.....	46
2.1.2 Critérios de exclusão.....	48
2.2 Exame físico.....	48
2.3 Colheita das amostras de sangue.....	49
2.4 Análises laboratoriais hematológicas.....	49
2.4.1 Preparação, fixação e coloração do esfregaço sanguíneo.....	50
2.4.2 Hematócrito (Ht).....	50
2.4.3 Métodos de contagem celular.....	51
2.5 Análise laboratorial bioquímica.....	53
2.6 Análise Estatística.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
1. Parâmetros e características hematológicas.....	55
1.1 Hematócrito.....	57

1.2	Contagem total de eritrócitos (TRBC).....	58
1.3	Contagem estimativa total de trombócitos (TTC).....	59
1.4	Contagem total de leucócitos (TWBC).....	60
1.5	Contagem estimativa diferencial de leucócitos.....	62
1.5.1	Heterófilos.....	62
1.5.2	Eosinófilos.....	62
1.5.3	Basófilos.....	64
1.5.4	Linfócitos.....	64
1.5.5	Monócitos.....	65
1.5.6	Rácio H/L.....	65
1.6	Hemoparasitas.....	66
2.	Parâmetros bioquímicos.....	67
2.1	Ácidos biliares.....	70
2.2	Glucose.....	70
2.3	Proteínas totais.....	71
2.4	Triglicéridos.....	73
2.5	Alanina aminotransferase (ALT).....	75
2.6	Aspartato aminotransferase (AST).....	75
2.7	Gama glutamiltransferase (GGT).....	76
2.8	Fosfatase alcalina (FA).....	76
2.9	Lactato desidrogenase (LD).....	77
2.10	Creatina quinase (CK).....	78
2.11	Ácido úrico.....	79
2.12	Creatinina.....	80
2.13	Cálcio.....	81
2.14	Fósforo.....	81
3.	Discussão final.....	84
	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	85
	Bibliografia.....	87
	Anexos.....	97

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Cegonha-branca (fotografias originais).....	8
<b>Figura 2.</b> Sistema de Hacking (fotografias originais).....	48
<b>Figura 3.</b> Postura das crias após captura (fotografia original). ....	48
<b>Figura 4.</b> Sequência exemplificativa da técnica de esfregaço por esgotamento (original). ....	50
<b>Figura 5.</b> Tubo de microhematócrito e escala de leitura (original). ....	51
<b>Figura 6.</b> Contagem manual total de eritrócitos e leucócitos em câmara de Neubauer, aplicando a “Regra do L” (original). ....	52
<b>Figura 7.</b> Células hemáticas de cegonha-branca – Parte I (fotografias originais). ....	59
<b>Figura 8.</b> Células hemáticas de cegonha-branca – Parte II (fotografias originais). ....	63

## Índice de gráficos

---

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição em Classes dos indivíduos admitidos, entre Janeiro e Junho, no Hospital do GREFA (valor absoluto).....	4
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição dos indivíduos admitidos no hospital do GREFA, entre o período de Janeiro e Junho de 2011 (valor absoluto). ....	5
<b>Gráfico 3.</b> Causas de admissão no hospital do GREFA, entre Janeiro e Junho (frequência relativa). .....	5
<b>Gráfico 4.</b> Trabalho realizado no hospital do GREFA entre os meses de Janeiro e Junho de 2011 (frequência relativa). ....	6
<b>Gráfico 5.</b> Distribuição ordenada dos valores de (a) hematócrito, (b) TRBC, (c) TTC, nos grupos A, B e C. ....	57
<b>Gráfico 6.</b> Distribuição ordenada dos valores de (a) TWBC, (b) heterófilos, (c) eosinófilos, (d) basófilos, (e) linfócitos e (f) monócitos nos grupos A, B e C. ....	61
<b>Gráfico 7.</b> Distribuição ordenada dos valores de ácidos biliares para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	70
<b>Gráfico 8.</b> Distribuição ordenada dos valores de glicose nos grupos A, B e C. ....	71
<b>Gráfico 9.</b> Distribuição ordenada dos valores de PT (método do biureto) para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	72
<b>Gráfico 10.</b> Distribuição gráfica dos valores de PT determinado por refractometria e método do biureto. ....	73
<b>Gráfico 11.</b> Distribuição ordenada dos valores de TG para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	74
<b>Gráfico 12.</b> Distribuição ordenada dos valores de (a) ALT, (b) AST, (c) GGT e (d) FA nos grupos A, B e C. ....	75
<b>Gráfico 13.</b> Distribuição ordenada dos valores de LD para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	78
<b>Gráfico 14.</b> Distribuição ordenada dos valores de CK para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	79
<b>Gráfico 15.</b> Distribuição ordenada dos valores de ácido úrico para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	80
<b>Gráfico 16.</b> Distribuição ordenada dos valores de creatinina nos grupos A, B e C. ....	81
<b>Gráfico 17.</b> Distribuição ordenada dos valores de cálcio nos grupos A, B e C. ....	81
<b>Gráfico 18.</b> Distribuição ordenada dos valores de fósforo para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2. ....	82

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Interpretação clínica da combinação dos parâmetros do perfil hepático. ....	45
<b>Tabela 2.</b> Caracterização da amostra.....	47
<b>Tabela 3.</b> Valores hematológicos obtidos para a totalidade da amostra.....	55
<b>Tabela 4.</b> Valores hematológicos obtidos para a os Grupos A, B e C. ....	56
<b>Tabela 5.</b> Proporção de cada linha celular na totalidade da amostra e em cada grupo. ....	62
<b>Tabela 6.</b> Valores do rácio H/L por grupo e para a amostra. ....	65
<b>Tabela 7.</b> Valores bioquímicos obtidos para a totalidade da amostra.....	67
<b>Tabela 8.</b> Valores bioquímicos obtidos para os grupos A, B e C. ....	68
<b>Tabela 9.</b> Valores bioquímicos para os Subgrupos A1 e A2. ....	69
<b>Tabela 10.</b> Valores bioquímicos para os Subgrupos B1 e B2. ....	69
<b>Tabela 11.</b> Valores do rácio Ca/P por grupo e para a amostra .....	83
<b>Tabela 12.</b> Animais pertencentes a Ordem Ciconiformes, residentes ou nidificantes na Europa.	97
<b>Tabela 13.</b> Características da espécie Ciconia ciconia. ....	98
<b>Tabela 14.</b> Índice policromático adaptado de Pendl e Samour (2009) e Pendl (2011). ....	99
<b>Tabela 15.</b> Alteração na concentração das células sanguíneas. ....	100
<b>Tabela 16.</b> Morfologia atípica das células sanguíneas, por activação celular. ....	101
<b>Tabela 17.</b> Valores de referência dos parâmetros de hemograma, para a maioria das espécies de aves. ....	102
<b>Tabela 18.</b> Valores de referência dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, para a maioria das espécies de aves.....	103
<b>Tabela 19.</b> Técnica Wright Giemsa modificada por Jaime Samour para coloração de esfregaços, adaptada de Pendl (2011).....	104
<b>Tabela 20.</b> Teste laboratorial utilizado para cada parâmetro. ....	106
<b>Tabela 21.</b> Descrição dos estudos anteriormente realizados em cegonha-branca. ....	108
<b>Tabela 22.</b> Valores hematológicos e bioquímicos obtidos nos trabalhos anteriores realizados em cegonha-branca.....	109





## Abreviaturas e acrónimos

---

AB	Ácidos Biliares
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
AU	Ácido Úrico
Cél.	Células
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK	Creatina Quinase
cm	Centímetros
D.G.K.C.	<i>Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie</i>
dL	Decilitro
EAAV	European Association of Avian Veterinarians
ECZM	European College of Zoological Medicine
EDTA	Ácido etileno diamina tetra acético
FA	Fosfatase Alcalina
FR	Frequência Relativa
g	Gramas
GGT	Gama Glutamiltransferase
GLD	Glutamato Desidrogenase
GREFA	<i>Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat</i>
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
h	Horas
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
Ht	Hematócrito
ICNB	Instituto de Conservação da Natureza e Biodiversidade
I.F.C.C.	<i>International Federation of Clinical Chemistry</i>
ISIS	International Species Information System
kg	Quilogramas
L	Litro
LD	Lactato Desidrogenase
mg	Miligramas
mm	Milímetros
n	Número de indivíduos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PCV	<i>Packed cell volume</i>
PT	Proteínas Totais
PTH	Paratormona

Rácio Ca/P	Rácio Cálcio/Fósforo
Rácio H/L	Rácio Heterófilos/Linfócitos
Rácio N/C	Rácio Núcleo/Citoplasma
Rácio U/AU	Rácio Ureia/Ácido Úrico
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TG	Triglicéridos
TRBC	Contagem total de Eritrócitos
TTC	Contagem total de Trombócitos
TWBC	Contagem total de Leucócitos
VCM	Volume Corpuscular Médio
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\bar{x}$	Média
$\sigma$	<i>Desvio Padrão</i>

## INTRODUÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Estágio Curricular realizado no *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA, 40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O), um Centro de Recuperação de Fauna Selvagem localizado na Comunidade de Madrid, Espanha.

Nas últimas décadas ocorreu um aumento na população de cegonha-branca, e como tal, estes animais ingressam cada vez mais em centros de recuperação. É de extrema importância haver uma compreensão das características, problemas mais comuns, e um aprofundamento do conhecimento na investigação laboratorial, permitindo assim um aperfeiçoamento do cuidado veterinário e sucesso nos programas de reabilitação.

O diagnóstico de uma doença numa ave pode ser um desafio, pois são animais muito resistentes e que mostram sinais de doença apenas quando esta se encontra em estado avançado. Briscoe, Rosenthal e Shofer (2010) referem que psitacídeos selvagens podem mascarar sinais de doença, perante potenciais predadores. Esta característica é demonstrada pelas aves em geral e ocorre também em animais mantidos em cativeiro ou hospitalizados, o que torna complicado fazer um diagnóstico apenas com um exame físico, uma vez que na grande maioria das vezes a história do animal não é conhecida.

Uma análise sanguínea é um método de diagnóstico bastante simples e económico e que permite recolher informação valiosa no campo da hematologia, bioquímica, parasitologia, toxicologia, microbiologia, entre outros (Samour 2000). Sendo já um exame de rotina amplamente utilizado em Medicina Humana e Medicina Veterinária em animais de companhia, o exame laboratorial sanguíneo tem vindo a ganhar cada vez mais importância, como ferramenta de trabalho, tanto no acompanhamento de animais em recuperação como no diagnóstico de doenças em aves selvagens. Assim, e devido à elevada variedade inter-específica, torna-se cada vez mais importante a determinação de valores de referência para cada espécie (Samour & Pendl, 2009).

Este trabalho caracteriza-se como um estudo preliminar com o objectivo geral de contribuir para a obtenção de valores de referência em animais jovens e selvagens da espécie *Ciconia ciconia* com idade variando entre 20 e 70 semanas, de modo a auxiliar o clínico veterinário na avaliação laboratorial à altura de ingresso no centro. Para tal, foram estudados parâmetros hematológicos e bioquímicos e realizada uma pesquisa de hemoparasitas, comparando os valores obtidos com os estudos já existentes. Para além disso foram comparados os valores obtidos na determinação de proteínas totais pelo método do biureto e por refractometria, com intuito de demonstrar a sobrestimação de valores no segundo método, e foram também comparados os valores obtidos na contagem total de leucócitos (TWBC) pelo método directo e pelo método estimativo. A escolha dos parâmetros em estudo foi realizada tendo em conta a sua utilidade clínica, a disponibilidade dos meios para realização da análise e considerações económicas.

Até à data da redacção do presente trabalho existem 4 estudos publicados referentes a hematologia e/ou bioquímica em cegonha-branca e estão também disponíveis no ISIS (International Species Information System, 2002), valores de referência para esta espécie. Três estudos foram realizados em Espanha, nomeadamente por Puerta, Muñoz-Pulido, Huecas e Abelenda (1989) que apresentam o primeiro estudo de hematologia e bioquímica em crias de cegonha-branca e cegonha-preta. Alonso *et al.* (1991) apresentam um estudo hematológico e bioquímico realizado em adultos de cegonha-branca, e Montesinos, Sainz, Pablos, Mazzucchelli & Tesouro (1997) expõem um estudo para determinar intervalos de referência de valores hematológicos e bioquímicos para crias de cegonha-branca em estado selvagem e em cativeiro, com idade compreendida entre os zero e 90 dias de idade. Mais recentemente, na Polónia, Jerzak *et al* (2010) apresentam um novo estudo para demonstrar que os valores bioquímicos em cegonha-branca variam com o sexo e idade.

Neste trabalho foram analisadas amostras sanguíneas de 77 animais selvagens que deram entrada no hospital de fauna selvagem do GREFA na Primavera de 2011, entre Maio e Junho. Uma parte das cegonhas-brancas admitidas pertencia a uma colónia de cegonhas do *Parque del Sureste*, na Comunidade de Madrid, da qual a Companhia Rede Eléctrica procedeu à destruição de ninhos das torres de alta tensão na rota de passagem dos aviões, sendo que os ovos e as crias presentes nos ninhos foram anilhados e levados para o GREFA (Instinto animal, 2011). Fazem ainda parte do estudo animais jovens que ingressaram isoladamente após queda do ninho.

Todos os animais presentes no estudo foram considerados saudáveis após realização de um exame físico. Os animais foram divididos em 3 grupos, consoante o peso (A, B e C), não tendo sido possível a determinação do sexo e idade precisa. O grupo A e B foram ainda divididos em subgrupos A1 e A2 e B1 e B2, respectivamente, com o intuito de avaliar a interferência do jejum nos valores bioquímicos. Foi retirado sangue a cada indivíduo e procedeu-se à determinação do hematócrito (Ht), contagem total de trombócitos (TTC), eritrócitos (TRBC), contagem total de leucócitos (TWBC) e contagem diferencial de leucócitos. Os parâmetros bioquímicos estudados foram essencialmente renais e hepáticos, tendo sido determinado o valor plasmático de ácido úrico (AU), creatinina, cálcio, fósforo, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LD), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), proteínas totais (PT), triglicéridos (TG), ácidos biliares (AB) e glucose. Todos os indivíduos do estudo foram posteriormente libertados em Sistema de *Hacking*, dentro das instalações do GREFA, e alimentados até estarem aptos para voar.

Dado que o principal objectivo deste trabalho é a obtenção de valores de referência, o estudo apresenta limitações na incidência da amostra, uma vez que não foi possível a determinação do sexo e idade exacta de cada animal. A abrangência da influência dos factores fisiológicos foi também uma limitação no sentido que todos os indivíduos foram

testados unicamente entre Maio e Junho de 2011, devido a ser um trabalho integrado nas actividades do estágio curricular e, como tal, não foi possível inferir acerca da influência sazonal nos parâmetros em estudo. A colheita da amostra não foi realizada a uma hora constante, sendo que pode ter havido influência do ritmo circadiano nos valores obtidos, o efeito da localização geográfica também não foi possível testar pois todos os animais são provenientes de colónias da Comunidade de Madrid e o efeito da migração também não pôde ser estudado uma vez que a amostra só inclui indivíduos jovens nascidos no presente ano e que nunca foram sujeitos às intempéries da migração. É também importante ter em conta as limitações do método analítico, uma vez que os testes não foram duplicados e foi um trabalho realizado por vários operadores, devido ao ingresso simultâneo de vários indivíduos, sendo que, o método de colheita não foi homogéneo.

No entanto, o facto de podermos dispôr de um número considerável de animais e de simultaneamente o GREFA colocar à nossa disposição os aparelhos e reagentes necessários, assim como o interesse manifestado nesta investigação, levou-nos a efectuar a mesma, pese o facto de haver as condicionantes já mencionadas.

O presente estudo encontra-se estruturado da seguinte forma: inicialmente é realizada uma breve descrição das actividades realizadas durante o período do estágio curricular; o tópico seguinte incide sobre uma revisão bibliográfica acerca da ecologia da cegonha-branca para melhor entender a sua evolução ao longo dos tempos, e também numa caracterização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em aves, não existindo todavia na literatura uma caracterização específica da espécie em estudo; é também realizada uma abordagem mais intensiva do trabalho realizado, especificando objectivos e materiais e métodos utilizados; são apresentados os resultados obtidos e realizada a discussão em simultâneo; e, por último são reveladas as conclusões e recomendações para trabalhos futuros.

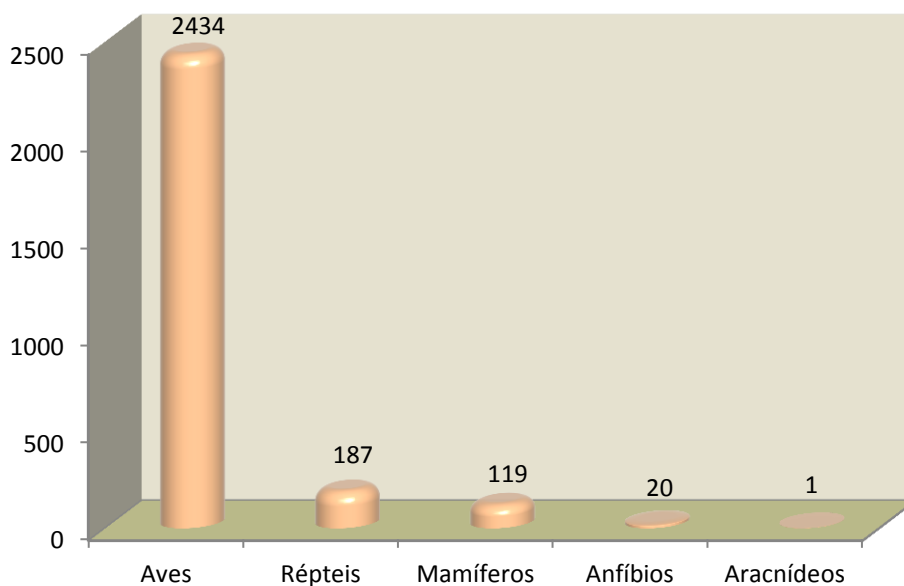
## ESTÁGIO CURRICULAR

Este trabalho foi integrado num Estágio curricular realizado entre os meses de Janeiro e Junho de 2011 no Hospital de Fauna Selvagem do GREFA (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O), localizado em Majadahonda, na Comunidade de Madrid, Espanha.

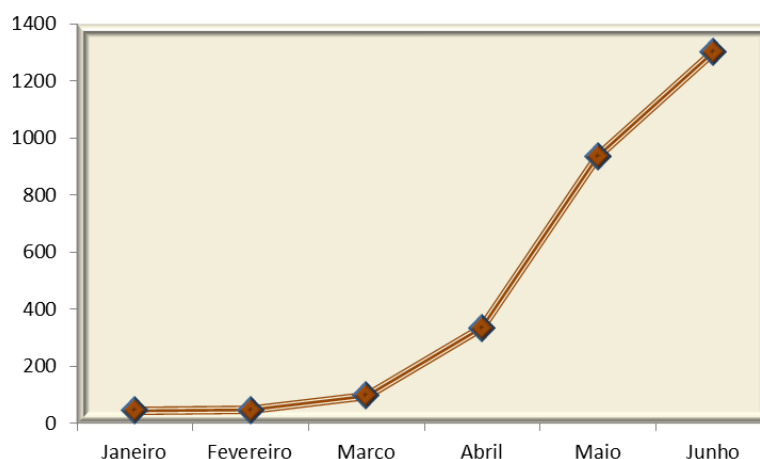
Durante o período do estágio, sempre que possível, era realizado um regime rotativo entre todos os estagiários de modo a passarem pelas diversas actividades realizadas na enfermaria, englobando trabalho no Hospital, trabalho laboratorial e necrópsias. Foram efectuadas aproximadamente 70 horas semanais, o que perfaz um total de cerca 1700 horas em seis meses.

Os animais ingressam no Centro de Recuperação, trazidos pela equipa de resgate ou por privados e a todos é efectuado um exame físico e respectivo tratamento. Durante estes meses ingressaram neste Hospital um total de 2761 animais, sendo a grande maioria aves (88%), como está representado no Gráfico 1, e desta classe 9% eram cegonhas-brancas. A taxa de ingresso de animais num Centro de Recuperação ao longo do ano é flutuante, ocorrendo um aumento coincidente com o regresso dos animais da migração e nidificação no local, como representado no Gráfico 2.

**Gráfico 1.** Distribuição em Classes dos indivíduos admitidos, entre Janeiro e Junho, no Hospital do GREFA (valor absoluto).

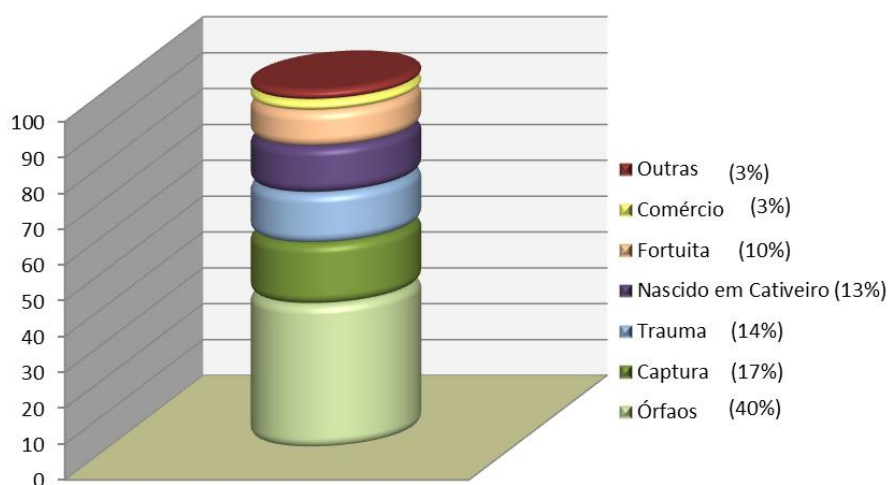


**Gráfico 2.** Distribuição dos indivíduos admitidos no hospital do GREFA, entre o período de Janeiro e Junho de 2011 (valor absoluto).



O ingresso de animais em centros de recuperação ocorre por uma grande variedade de causas. No caso do hospital do GREFA, entre os meses de Janeiro e Junho, a entrada de crias por queda do ninho ou destruição do mesmo ( $\approx 40\%$ ) foi a causa mais prevalente. Outras causas de admissão no hospital foram a captura (directa, espoliação, armadilhas), traumatismos (choque contra janela, disparo, electrocussão, atropelamento, ataque por parte de outros animais), o nascimento em cativeiro uma vez que GREFA tem um departamento de reprodução, fortuita (animais encontrados em propriedades), animais comercializados (doação, fuga ou apreensão), entre outras, nomeadamente ingestão de corpo estranho (anzóis e elásticos – que ocorre bastante em cegonhas) ou intoxicação (Gráfico 3).

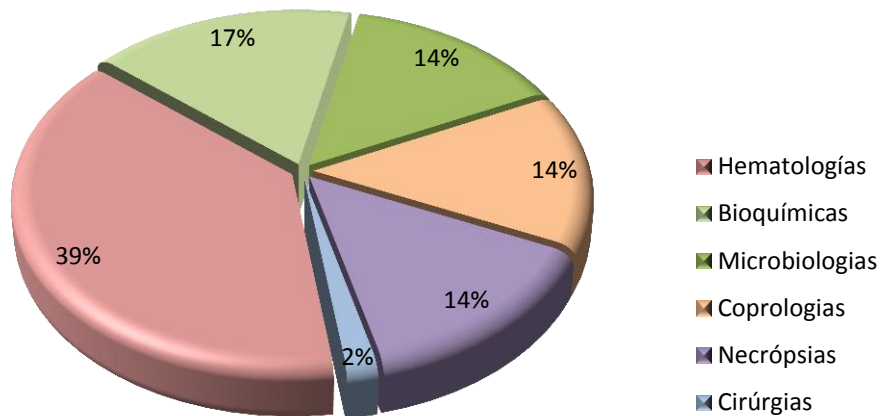
**Gráfico 3.** Causas de admissão no hospital do GREFA, entre Janeiro e Junho (frequência relativa).





Durante o período do estágio, tive a oportunidade de auxiliar no trabalho realizado no hospital de fauna selvagem, participar em cirúrgias e necrópsias, trabalhar no laboratório do GREFA nas áreas de hematologia, bioquímica, parasitologia e microbiologia e ainda de colaborar nos departamentos de reabilitação, reprodução em cativeiro e no trabalho de campo, nomeadamente em censos e anilhagem de aves. O trabalho realizado no Hospital entre os meses de Janeiro e Junho está representado no Gráfico 4.

**Gráfico 4.** Trabalho realizado no hospital do GREFA entre os meses de Janeiro e Junho de 2011 (frequência relativa).



Adicionalmente, tive a oportunidade de participar, como voluntários, na organização do 11º Congresso Europeu da Associação de Veterinários de Aves (*11<sup>th</sup> European AAV Conference*) e 1º Encontro do Colégio Europeu de Medicina Zoológica (*1<sup>st</sup> Scientific ECZM Meeting*) decorridos de 26 a 30 de Abril, frequentar o primeiro módulo de um curso de Ecografia em pequenos animais realizado nas instalações do GREFA, e assistir a um Seminário realizado por voluntários do Hospital do GREFA intitulado de “Antibioterapia aplicada em Centros de Recuperação”.

## DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

Neste Capítulo do trabalho vai ser realizada uma abordagem teórica dos vários temas mencionados ao longo do estudo. Inicialmente é feita uma caracterização da espécie em estudo – *Ciconia ciconia* – seguida de uma revisão de características hematológicas e bioquímicas de aves.

### 1. Ecologia da cegonha-branca (*Ciconia ciconia*)

A cegonha-branca é uma das espécies de aves da Família *Ciconiidae*, pertencentes à Ordem Ciconiformes (Tabela 12 - Anexo I) residente, ou que visita a Península Ibérica como nidificante. Outra espécie semelhante é a cegonha-preta (*Ciconia nigra*) (Rodriguez, 1987). A caracterização da espécie *Ciconia ciconia* (Tabela 13 - Anexo II), abordando temas como a anatomia, habitat, alimentação, nidificação e migração, é apresentada no tópico que se segue, sendo posteriormente realizado um estudo bibliográfico da sua distribuição Mundial e na Península Ibérica nas últimas décadas, do seu estatuto de conservação e dos principais factores que constituem actualmente uma ameaça a esta espécie.

#### 1.1 Caracterização da espécie

Os indivíduos desta espécie não apresentam dimorfismo sexual acentuado. O macho é ligeiramente mais corpulento e com bico mais grosso, sendo muito difícil distinguir visualmente a fêmea e o macho (Rodriguez, 1987; Severo, 2009).

Os *adultos* são caracterizados pelo pescoço comprido, membros posteriores compridos e de cor vermelha, bico vermelho brilhante e íris de cor castanho-escuro. Toda a plumagem é da mesma geração, sendo as grandes supra-alares, as escapulares, rémiges primárias, secundárias e terciárias de coloração preta e a restante plumagem de coloração branca (Rodriguez, 1987; Severo, 2009).

Os *juvenis* no primeiro ano de idade possuem bico e membros posteriores de coloração acinzentada (Fig. 1) progredindo para um vermelho pálido, os olhos são cinzentos e as penas supra-alares primárias possuem coloração acastanhada. Os indivíduos no segundo ano de vida são considerados *sub-adultos*, e assemelham-se bastante aos adultos, no entanto não terminaram ainda a muda das penas de voo, mostrando contraste entre as penas da asa (Severo, 2009). A muda pós-juvenil ocorre entre Dezembro e Maio do segundo ano de vida, é uma muda lenta e dura mais de seis meses. O ciclo da muda pós-nupcial em aves adultas dura dois a três anos e realiza-se entre Maio e Agosto (Rodriguez, 1987; Severo, 2009).

**Figura 1.** Cegonha-branca (fotografias originais).

Detalhe da (a) coloração acinzentada do bico e (b) formação das penas em juvenis.

---



As cegonhas-brancas podem habitar isoladamente ou em colónias, essencialmente perto das zonas de alimentação, preferindo zonas abertas ocupadas com pastagens, pousios ou culturas de sequeiro, estuários, lagoas costeiras, prados húmidos, arrozais, cursos de água, pauis, charcos, açudes, barragens e lixeiras, evitando locais frios e zonas de vegetação densa e alta (Rodríguez, 1987; Severo, 2009).

Os ninhos são encontrados em locais ensolarados, nomeadamente em árvores altas (alfarrobeiras, amendoeiras, araucárias, árvores mortas, choupos, oliveiras, eucaliptos e ciprestes), construções humanas (armazéns, igrejas, chaminés, telhados, ruínas, depósitos de água, moinhos de maré) e estruturas artificiais (candeeiros públicos, postes de alta tensão, postes de betão, postes de madeira), geralmente perto de zonas favoráveis de alimentação (ICNB, 2006; Severo, 2009). A nidificação em postes de alta tensão tem vindo a ser cada vez mais o local de eleição, por ser um local alto e fora do alcance dos predadores. Muitas vezes são encontradas outras espécies a nidificar e reproduzir-se na mesma estrutura, como os pardais comuns (*Passer domesticus*), ou na proximidade como o peneireiro das torres (*Falco naumanni*), andorinhão (*Apus apus*), estorninho preto (*Sturnus unicolor*), coruja das torres (*Tyto alba*) e a andorinha-dos-beirais (*Delichon urbica*) (Rodríguez, 1987; Severo, 2009; Instinto animal, 2011).

Tal como foi referido anteriormente, as cegonhas preferem locais perto das zonas de alimentação, sendo esta muito diversificada. Na natureza capturam presas vivas como pequenos mamíferos, peixes, insectos, larvas, répteis e anfíbios e recorrem também com alguma frequência a desperdícios gerados pelo Homem que são obtidos em lixeiras e aterros municipais (Severo, 2009; Instinto animal, 2011). Mais raramente alimentam-se dos ovos e das crias das aves que nidificam no solo, moluscos, crustáceos e escorpiões (ICNB, 2006). Alimentam-se durante o dia isolados, em pares, em família ou em bandos. O alimento

é procurado em terrenos abertos ou em zonas de água pouco profunda, caminhando ou correndo com o bico apontado para o chão. Quando detectam a presa, lançam o bico com grande precisão e rapidez, matando-a de imediato (ICNB, 2006; Severo, 2009).

A cegonha-branca é uma espécie monogâmica, essencialmente gregária. Geralmente o macho regressa mais cedo da migração e inicia a reconstrução do ninho que é, regra geral, reutilizado todos os anos pelo mesmo casal. Com os dois membros pousados no ninho iniciam-se as manifestações nupciais caracterizadas pelo bater ruidoso do bico (matraquear) e inclinação da cabeça para trás, que são sucedidas pela cópula. Este comportamento é realizado durante vários dias sucessivos (Rodriguez, 1987; Severo, 2009).

A época de reprodução verifica-se nos meses de Março e Abril. Os indivíduos desta espécie realizam uma única postura anual, a incubação é realizada indistintamente por um dos membros do casal e a eclosão ocorre geralmente em Maio. As crias apresentam um crescimento muito rápido, são protegidas e alimentadas pelos pais, estando aptas a voar ao fim de cerca de 70 dias, e para a migração em Agosto (ICNB, 2006; Severo, 2009; Instinto Animal, 2011).

Em vôo, mantém o pescoço esticado, levando as patas projectadas para trás. As asas largas e compridas têm um batimento lento e regular. Executam vôos planados prolongados, aproveitando as correntes térmicas ascendentes que se formam sobre a superfície terrestre, permitindo-lhes percorrer longas distâncias com um baixo consumo de energia. Por esta razão, durante a migração tendem a concentrar-se no estreito de Gibraltar e no estreito do Bósforo (Severo, 2009).

A migração consiste na deslocação regular entre habitats, realizada por uma determinada espécie no Outono e na Primavera, vivendo meio ano no local de nidificação e outro meio ano na área de invernada, onde encontra temperaturas e alimento adequados. Este movimento é realizado por etapas, descansando em determinadas zonas até chegar ao local de destino (Rodriguez, 1987; Severo, 2009). A anilhagem das cegonhas tem permitido detectar, as suas rotas migratórias e zonas de invernada. Todos os anos no final de cada Verão a cegonha-branca inicia a chamada “migração pós-nupcial” voando até à área de invernada em África, a sul do deserto do Saara. A “migração pré-nupcial” corresponde à viagem de regresso ao local de nidificação na Europa assim que surge a Primavera, completando assim o seu ciclo migratório (Rodriguez, 1987; Severo, 2009).

É uma viagem muito longa e com vários perigos associados, nomeadamente as más condições climáticas, predadores, a caça na passagem por Marrocos, a travessia do deserto, atropelamentos, colisão com edifícios e a progressiva degradação e desaparecimento das zonas transitórias de alimentação e recuperação de energia (zonas de descanso). Nestas zonas as aves páram em média de 1 a 5 dias para recuperar energia e restabelecer as suas reservas de gordura, fundamentais para um sucesso migratório (Rodriguez, 1987; Severo, 2009).

Foram já realizados vários estudos para determinar os factores que levam à migração das aves, e pensa-se que o fenómeno está relacionado com a regulação do seu sistema glandular, o clima e a disponibilidade de alimento (ICNB, 2006; Severo, 2009). Importa, contudo, referir que a disponibilidade de alimento proporcionada por arrozais e lixeiras tem contribuído para a fixação de uma população invernante provocando assim a alteração dos hábitos das populações Ibéricas, tornando-se estas cada vez mais sedentárias (Rodriguez, 1987; ICNB, 2006).

## **1.2 Distribuição Mundial e na Península Ibérica**

A cegonha-branca é uma espécie residente ou nidificante estival. Nidifica na Península Ibérica, Centro-Este e Sudeste da Europa, Norte de África e África Oriental e Sudeste e Sudoeste Asiático (Martín, 2003).

Em 1934 foi realizado o primeiro censo internacional de cegonha-branca, com o objectivo de perceber a dinâmica populacional desta espécie. Em 1958 e 1974 foram realizados o segundo e terceiro censos, respectivamente, sendo que, a partir desta data estes registos passaram a realizar-se a cada década. No quarto censo Internacional, realizado em 1984, participaram 24 Países e a população Mundial foi estimada em 135 000 casais, registando-se uma redução na população. Em 1994, no quinto censo Internacional, foi documentado um aumento da população em 23%, sendo a população estimada de 166 000 casais (Thomsen & Hötker, 2006). O mais recente censo Internacional da população desta espécie foi realizado em 2004 e a população Mundial de cegonha-branca foi estimada em 230 000 casais, o que significa um aumento de 39% em dez anos (Thomsen & Hötker, 2006).

Na Península Ibérica, a cegonha-branca, habita a metade ocidental, com excepção do Norte de Portugal e Galiza, não existindo também na metade oriental de Espanha, estando apenas presente na zona do rio Ebro. Abunda na Região da Extremadura, Castela-Mancha, Castela e Leão, Madrid e Centro e Sul de Portugal. Esta ocupação está interligada com o tipo de habitat que prefere, e abundância de alimento (Martín, 2003; Rosa, Encarnação & Candelária, 2004; Rosa, 2006; Severo, 2009).

Em Portugal a cegonha-branca foi a primeira espécie de avifauna alvo de um censo a cobrir a maioria do território Nacional. Em 1961, tendo como base a realização de inquéritos, o número de ninhos recenseados foi de 3.490. Entre 1974 e 1977, o número de ninhos registou uma queda de aproximadamente 45%, tendo sido recenseados 1.930 ninhos com base em inquéritos e confirmação *in loco*. Entre 1984 e 1989 foi realizado um censo mais amplo e abrangente, o método foi alterado, tendo sido prospectado todo o território nacional onde existiam registos da presença de ninhos e/ou habitat disponível, e foram recenseados 1.533 ninhos ocupados, correspondendo a redução de cerca de 17% face ao período anterior. Foi considerada espécie vulnerável no Livro vermelho dos vertebrados de Portugal de 1990, 1991 e 1993. Em 1994 ocorreu uma inversão da tendência de regressão

populacional, uma vez que o número de ninhos ocupados<sup>(1)</sup> recenseados foi de 3.302, um aumento em cerca de 54% face ao censo anterior. Em 2004 foram recenseados 7 630 ninhos ocupados e actualmente a população portuguesa nidificante possui o estatuto de conservação “Pouco Preocupante” (Rosa *et al*, 2004; ICNB, 2004).

Espanha acolhe uma das maiores populações de Cegonha-branca da Europa, juntamente com a Polónia e Ucrânia. Foram realizados vários censos, sendo os três primeiros baseados em inquéritos em 1948, 1957 e 1974, cujo resultado foi respectivamente 14 503, 12 701 e 7 343 casais, tendo ocorrido tal como em Portugal, um decréscimo na população. Em 1984 foi realizado novo censo por método misto com inquérito e censo directo e foram recenseados 6 753 casais. Em 1994 começa a haver uma inversão do declive da população e são recenseados por observação directa e trabalho de campo 16 643 casais. Por fim em 2004 o crescimento da população é de 99.59%, em relação a 1994, tendo sido localizados 33 217 casais reprodutores (Molina & delMoral, 2004). Na Comunidade de Madrid foram recenseados 989 a 1013 casais de cegonha-branca em 2001, sendo toda a zona de prados, e junto aos rios ocupada por esta espécie (Martín, 2003).

Ao longo dos últimos anos, a população de cegonha-branca da Europa foi sujeita a vários censos. Ao analisar os dados é possível observar que em meados do século XX a população inicia uma regressão, invertendo-se esta tendência a partir de 1994 a nível Europeu. Esta recuperação que ocorreu na Península Ibérica nos últimos anos deve-se a um conjunto de factores. Em primeiro lugar, a alteração dos métodos de recenseamento que são agora mais fiáveis pois contam com colaboração especializada. Em segundo lugar a melhoria das condições climáticas na área de invernada (fim de um período prolongado de seca). Em terceiro lugar os esforços no âmbito da conservação dirigidos a esta espécie, o crescimento da educação ambiental e consequente aumento da sensibilidade ambiental, a proliferação de uma espécie exótica invasora – o lagostim vermelho de Louisiana – na Península Ibérica, que passou a constituir a base da alimentação em várias regiões e a importância dos aterros sanitários contribui para o aumento da população de cegonha-branca residente na Península Ibérica e para a diminuição da mortalidade associada à migração e invernada na África Subsariana (Molina & delMoral, 2004; Rosa *et al*, 2004).

### **1.3 Estatuto de conservação e protecção legal**

O estatuto de conservação global da cegonha branca foi considerado pouco preocupante pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2004). O estatuto de conservação em Portugal e em Espanha foi também classificado como pouco preocupante (Madroño, Gonzalez & Atienza, 2004). Contudo, na *BirdLife International* (2004) a cegonha-

---

<sup>(1)</sup> Entende-se por ninho ocupado quando há um indivíduo/casal pousado no ninho, ninho recentemente (re)construído, indícios de presença recente de aves (dejectos), indícios de nidificação durante a presente época de nidificação (cascas de ovos, ovos, crias, penugem de crias, etc.) (Rosa, Encarnação & Candelária 2004).

branca é classificada como espécie com estatuto de conservação desfavorável (SPEC2), dado que a população Mundial se encontra concentrada na Europa.

Os principais objectivos de conservação são a manutenção dos efectivos populacionais e a conservação das áreas de nidificação e alimentação, para tal é de extrema importância a educação ambiental e a sensibilização das populações locais (ICNB, 2006; Severo, 2009).

Esta espécie encontra-se protegida legalmente por Convenções Internacionais assinadas por Portugal, nomeadamente a Convenção sobre a conservação das espécies migradoras pertencentes à fauna selvagem (Convenção de Bona), estando incluída no anexo II do Decreto-Lei n.º 103/80 de 11 de Outubro, e a Convenção relativa à protecção da vida selvagem e dos ambientes naturais na Europa (Convenção de Berna), estando também incluída no anexo II do Decreto-Lei n.º 316/89 de 22 de Setembro. Para além disso está incluída no anexo I da Directiva Comunitária nº 79/409/CEE, do Conselho, de 2 de Abril (Directiva Aves), do Decreto-Lei nº140/99 de 24 de Abril, alterado pelo Decreto-Lei nº 49/2005 de 24 de Fevereiro (Severo, 2009). Esta Directiva Comunitária foi alterada pelas Directivas nº 91/244/CEE, da Comissão, de 6 de Março, 94/24/CE, do Conselho, de 8 de Junho, e 97/49/CE, da Comissão, de 29 de Junho.

#### **1.4 Principais ameaças**

A cegonha-branca é extremamente sociável e tolerante à proximidade dos humanos. Desde há muitos anos que existe uma espécie de colaboração entre Homem e Cegonha, esta construía o ninho em edificações humanas onde estaria a salvo de predadores e em contrapartida promovia o controlo de pragas nas plantações (Martín, 2003).

Com o decorrer do tempo, surgiram várias ameaças a esta espécie, marcadas pela utilização de adubos, pesticidas e herbicidas que contaminam os recursos alimentares, reduzem a fertilidade da espécie e aumentam a percentagem de ocorrência de deformações em crias. A poluição da água por efluentes domésticos, industriais e agrícolas e a drenagem de zonas húmidas é também um problema, pois estas são áreas de alimentação da espécie. O encerramento de lixeiras pode vir a ser problemático, uma vez que estas são fonte importante de alimentação da espécie (Martín, 2003; Rosa, 2006).

Na actualidade, a principal causa de admissão em centros de recuperação de animais desta espécie está relacionada com electrocussão e colisão com linhas de transporte de energia, e impactação gastrointestinal por ingestão de elásticos e plásticos (Martín, 2003; Rosa, 2006).

Outra causa bastante comum é o ingresso de animais jovens por destruição de ninhos em edifícios históricos ou em rotas de passagem de aviões. No caso de ser necessário provocar o derrube de um ninho, o interessado deverá solicitar a autoridade competente, e em caso de aceitação é importante avaliar a melhor altura e as contrapartidas necessárias, de modo a não prejudicar a espécie (ICNB, 2006).

## **2. Análises laboratoriais sanguíneas**

A hematologia é a ciência que estuda o sangue e tecidos sanguíneos. Esta ciência está relacionada com a fisiologia sanguínea e também com os meios de diagnóstico, terapêutica e fisiopatologia das doenças relacionadas. O sangue é um sistema dinâmico com uma barreira pouco clara entre o fisiológico e o patológico, uma vez que os valores obtidos laboratorialmente apresentam elevada variabilidade intra e inter-específica, estando também dependentes do método de colheita, da sensibilidade, limite de detecção e coeficiente de variação do procedimento analítico adoptado e por último da formação do operador (Hochleithner, 1994; Samour & Pendl, 2009).

A variabilidade inter-específica dos valores laboratoriais, está relacionada com a elevada diversidade de espécies e adaptação a ambientes extremos (Clark, Boardman & Raidal, 2009). A variabilidade intra-específica é provocada pela influência dos factores fisiológicos, nomeadamente, actividade metabólica dependendo a mesma do género, da idade, do estado reprodutivo, do ritmo circadiano, da estação do ano, da dieta e do habitat (Villegas, Sánchez Guzmán, Corbacho, Corbacho & Vargas, 2004; Samour & Pendl, 2009; Jerzak *et al.*, 2010). A variabilidade do método e operador promove uma variação dos valores de laboratório para laboratório. Para obtenção de um resultado fidedigno, os testes deverão ser duplicados e é recomendado a elaboração de amostras seriadas (Pendl, 2011b).

A hematologia e a bioquímica sanguínea são ferramentas complementares muito importantes para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de doenças em aves. Para tal, e apesar da elevada variabilidade, é necessário o estabelecimento prévio de valores de referência para cada espécie, de modo a ser possível o reconhecimento de valores anómalos, ou seja, dos desvios face aos intervalos de referência.

Seguidamente serão descritos os métodos de colheita sanguínea e armazenamento de amostras e realizada uma breve revisão bibliográfica acerca dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em aves.

### **2.1 Métodos de colheita e armazenamento da amostra sanguínea**

O volume total de sangue de uma ave corresponde aproximadamente a 10% do seu peso vivo. O volume sanguíneo possível de colher, sem provocar efeitos nefastos, está dependente do tamanho e estado geral de saúde, o que num animal saudável corresponde aproximadamente a 10% (6-12ml/100gr peso vivo) da quantidade total de sangue, devendo este volume ser reduzido em animais debilitados. De uma forma geral, comparativamente aos mamíferos, as aves possuem maior tolerância a perdas de sangue graves, devido à sua maior capacidade de mobilização do fluído extra-vascular (Campbell, 1994).

Para realizar a colheita de sangue numa ave, a contenção manual é a técnica mais indicada, uma vez que ainda não são bem conhecidos os efeitos da anestesia nas características hematológicas destes animais (Clark *et al.*, 2009).



Existem várias técnicas de colheita. Em animais de maiores dimensões (>500gr.), a veia ulnar superficial, que cruza a superfície ventral da articulação úmero-radio-ulnar, e repousa imediatamente debaixo da pele, é a técnica de eleição pelo seu fácil acesso, permitindo reduzir o stresse experienciado pelo animal. Pode igualmente ser utilizada a veia metatarsal medial, localizada no lado medial do tibiotarso (Campbell, 1995a; Clark et al., 2009).

Em animais de menores dimensões (<500gr.), estas veias possuem um calibre pequeno e estão associadas a uma maior dificuldade de colheita, o que propicia a formação de hematomas, colapso da veia e coagulação da amostra. Assim, para estes animais existem outras opções como a veia jugular direita, que tem um calibre superior à jugular esquerda, o corte da unha, punção cutânea, punção cardíaca, ou colheita de sangue do seio venoso occipital. Importa, contudo, referir que estas duas últimas técnicas são altamente perigosas e stressantes para o animal, estando reservadas para a colheita de sangue durante a realização de necrópsias, quando necessário (Campbell, 1995a).

As espécies pertencentes à Ordem Ciconiformes possuem pernas longas, livres de plumagem, o que torna a veia metatarsal medial o local de eleição para colheita de sangue devido à fácil visualização e reduzida propensão para formação de hematomas (Waters, 2003; citado por Clark *et al.*, 2009).

Para minimizar todos os problemas inerentes à colheita de sangue em aves, esta deve ser realizada com a combinação de uma seringa de volume reduzido, apropriada à quantidade de sangue que é necessário colher, acoplada a uma agulha de maior calibre possível, escolhida de acordo com o tamanho do animal. Deste modo, será exercida uma menor força de sucção o que consequentemente diminui a probabilidade de ocorrer colapso da veia (Samour & Pendl, 2009). Ainda assim, em animais mais pequenos nos quais existe maior probabilidade de coagulação da amostra, pelo tempo que demora a obtenção da quantidade de sangue requerido, a colheita deverá ser realizada apenas com uma agulha, fluindo o sangue directamente para um tubo com anticoagulante (Campbell, 1994; Campbell, 1995a; Clark *et al.*, 2009).

Em qualquer dos casos devem ser estabelecidas prioridades na utilização do sangue. Deste modo, a primeira porção de sangue destina-se à realização de um esfregaço sanguíneo, pois é um método rápido, de baixo custo e que fornece informação valiosa na prática clínica. Na elaboração do esfregaço sanguíneo deve ser utilizado sangue total fesco, sem anticoagulante ou com EDTA (Campbell, 1995a), e alguns autores referem ainda a junção de uma gota de albumina bovina a 22% a 5 gotas da amostra de sangue (Guzman et al., 2008), ou a junção de uma gota de albumina bovina purificada a igual quantidade de sangue (Campbell, 2006a), para minimizar a lesão celular. De seguida é preenchido o tubo de microhematócrito e o restante é colocado em tubos com anticoagulante (Pendl, 2006; Samour, 2006a).

Tal como nos animais de companhia, o EDTA (Ácido Etileno Diamina Tetra Acético) é o anticoagulante de eleição para realização de hemograma e, a heparina lítio para análises bioquímicas (Samour, 2006a; Samour & Pendl, 2009). No entanto, o EDTA causa hemólise artefactual em amostras sanguíneas obtidas de determinadas espécies de aves nomeadamente, os corvos (Espécie: *Corvus corax* e *Corvus monedula*; Família: *Corvidae*), guarda-rios (Espécie: *Alcedo atthis*; Família: *Alcedinidae*), algumas espécies de grou (Espécie: *Balearica pavonina* e *Balearica regulorum*; Família: *Gruidae*), avestruzes (Espécie: *Struthio camelus*; Família: *Struthionidae*), bufos reais (Espécie: *Bubo bubo*; Família: *Strigidae*), perús do mato (Espécie: *Alectura lathami*; Família: *Megapodiidae*), mutumporangas (Espécie: *Crax alector*; Família: *Cracidae*), cucaburras (Espécie: *Dacelo novaeguineae*; Família: *Halcyonidae*) e calaus-coroados (Espécie: *Tockus alboterminatus*; Família: *Bucerotidae*) Nas espécies referidas, a heparina lítio deve ser utilizada como alternativa ao EDTA (Campbell, 1994; Krautwald-Junghanns, 2007; Guzman, Mitchell, Gaunt, Beaufrère & Tully, 2008; Samour & Pendl, 2009; Clark *et al.*, 2009).

Há estudos que mencionam a obtenção de valores mais elevados na medição do hematócrito e concentração de proteínas plasmáticas e de valores mais reduzidos na contagem de linfócitos com a heparina lítio (Fudge, 2000; Knoll, 2000; citado por Guzman *et al.*, 2008). Guzman *et al.* (2008) chegaram à conclusão de que para um curto período de armazenamento, a diferença de valores obtidos na utilização de um ou outro anticoagulante é subjectivamente pequena, fazendo a ressalva de que o mesmo anticoagulante deve ser utilizado tendencialmente com o mesmo paciente.

No que diz respeito às análises bioquímicas, a heparina lítio é o anticoagulante de eleição pois o EDTA interfere com diversas reacções dando origem a alterações artefactuais (Mohri & Rezapoor, 2009). É aconselhada a obtenção imediata de soro ou plasma e posterior processamento ou armazenamento (Andreansen, Andreansen, Sonn & Robeson, 1996). O soro obtido de sangue coagulado é preferível para análises bioquímicas, no entanto, o plasma obtido de um anticoagulante apropriado pode ser igualmente válido e em alguns casos até preferível ao soro, em particular em casos urgentes e em que a quantidade de amostra é reduzida, uma vez que a obtenção de plasma é mais rápida e a quantidade de plasma obtida de uma mesma quantidade de sangue total é sempre maior que a quantidade de soro, permitindo a realização de um maior número de análises (Mohri & Rezapoor, 2009). O transporte ou armazenamento de longa duração deve ser evitado, pois para além da lise celular vai ocorrer crescimento bacteriano. Nenhum destes dois casos pode ser diferenciado, num esfregaço, de uma condição patológica (Samour & Pendl, 2009).

Para realizar qualquer procedimento hematológico ou bioquímico devemos certificar-nos de que o sangue foi correctamente colhido e conservado. Idealmente as análises devem ser realizadas três a quatro horas após a colheita, e em caso de não ser possível as amostras devem ser refrigeradas a 4-5 °C e processadas em 24 a 48 horas para o caso de análises

hematológicas, ou ainda congelado o plasma a  $-18^{\circ}\text{C}$ , para o caso das análises bioquímicas. Antes de se iniciar qualquer procedimento, a amostra deve ser manual ou mecanicamente homogeneizada, pois a componente celular rapidamente se separa da componente plasmática e deposita, o que leva a posteriores erros de medição (Samour, 2006a).

## **2.2 Hemograma**

O hemograma corresponde ao conjunto de provas hematológicas que permitem analisar células sanguíneas. Embora os resultados de um hemograma isolado raramente permitam realizar um diagnóstico etiológico (são exceção os hemoparasitas e leucemia), são indispensáveis para avaliar o estado geral do animal, monitorizar a progressão de uma doença e formar um prognóstico (Samour & Pendl, 2009).

Um painel sanguíneo permite determinar o estado actual das células existentes na circulação periférica, no entanto, como já foi referido anteriormente existem vários factores que podem provocar uma variação desse estado, o que torna o hemograma muito sensível mas pouco específico como ferramenta de diagnóstico (Samour & Pendl, 2009).

Um painel sanguíneo total consiste numa avaliação eritrocitária, leucocitária e trombocitária. O primeiro inclui testes de avaliação do hematócrito, contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, cálculo dos índices eritrocitários, contagem de reticulócitos e morfologia eritrocitária. O segundo consiste numa contagem total e diferencial de leucócitos e numa avaliação da morfologia celular. O terceiro consiste numa contagem total de trombócitos, quando possível (Campbell, 1995a; Doneley, 2010).

Com a utilização rotineira deste teste foram surgindo nos últimos anos analisadores automáticos que permitem fazer a contagem celular em amostras sanguíneas de aves, no entanto o seu uso em aves não está livre de erros, sendo ainda preferível a contagem manual (Samour, 2000).

Dentro deste tópico serão abordadas as características hematológicas das aves, especificando eritrócitos, leucócitos e trombócitos, as influências fisiológicas e patológicas nos parâmetros hematológicos e uma revisão da presença de hemoparasitas em aves selvagens.

### **2.2.1 Características hematológicas das aves**

O sangue das aves contém eritrócitos, leucócitos e trombócitos. A grande diferença em relação aos mamíferos é que em qualquer destas linhas celulares as células maduras retêm o núcleo durante toda a vida, sendo este tempo de semi-vida de aproximadamente 20 dias em aves, variando com a espécie, em comparação com 120 dias na maioria dos mamíferos (Harris, 2009).

A hematopoiese define o processo de formação do sangue, sendo o termo utilizado para mencionar o processo de produção e maturação de células sanguíneas, que se caracteriza por ser complexo e extremamente regulado (Reagen *et al.*, 1999; Gasper, 2000).

A medula óssea é o local primário onde ocorre o desenvolvimento de todas as linhas celulares após o nascimento, existem porém, outros tecidos hematopoiéticos nas aves, como a bolsa de Fabricius, o timo e o baço (Campbell 1995b; Campbell 2006a). E devido às necessidades excessivas que estas apresentam no período fetal e de crescimento, uma vez que só adquirem imunocompetência alguns dias após o nascimento, a eritropoiese e granulopoiese podem ocorrer também a nível do rim e fígado, na zona ao redor da espinal medula, nervos cranianos, gânglios espinhais, coração, faringe, tecido subcutâneo, músculo e gónadas (Pendl, 2011a). De acordo com alguns estudos realizados, o tecido eritropoiético começa a reduzir, assim que os indivíduos atingem a massa corporal do adulto da mesma espécie (Ollé, 2006; citado por Pendl, 2011a).

Tendo sido abordados os métodos de colheita e processamento da amostra sanguínea, importa agora referir as principais características observáveis nas células maduras das linhas celulares sanguíneas nomeadamente dos eritrócitos, leucócitos e trombócitos, por forma a obter uma ideia geral das características hematológicas das aves. É importante ter em consideração a existência de uma variabilidade inter-específica nas características e populações celulares, sendo estas heterogéneas (Salakij, Salakij, Narkkong, Pitakkingthong & Pothong, 2003).

### **2.2.1.1 Eritrócitos**

O eritrócito é uma célula altamente especializada cuja principal função é o transporte de oxigénio dos pulmões aos tecidos e de dióxido de carbono no sentido inverso. As aves, em especial, necessitam de uma circulação efectiva de eritrócitos para proporcionar uma oxigenação adequada dos músculos responsáveis pelo voo (Clark *et al.*, 2009). Assim estas células estão constantemente a ser produzidas e passam por um processo de maturação que inclui sete estádios – rubriblasto, prorubricito, rubricito basofílico, rubricito policromático prematuro, rubricito policromático tardio, eritrócito policromático (reticulócito) e eritrócito maduro. Ao longo da maturação a célula evolui de redonda para oval, assim como o núcleo que vai ocupar uma posição central nas células maduras. A cromatina torna-se mais condensada e com uma coloração mais intensa, apresentando-se basofílica e uniformemente agrupada nas células maduras. O rácio N/C diminui, tornando-se o citoplasma abundante e com uma coloração eosinofílica e homogénea (Campbell, 1994; Campbell, 1995b; Campbell 2006a; Clark *et al.*, 2009; Samour & Pendl, 2009).

A forma elíptica, característica das células maduras, apresenta uma grande variação inter-específica, sendo que em determinadas espécies as células são mais arredondadas, enquanto em outras espécies se apresentam mais estreitas e alongadas (Clark, *et al.*,

2009). Outra característica que varia consoante a espécie é o tamanho celular, variando os valores médios de 10.7 x 6.1µm a 15.8 x 10.2µm (Campbell, 2006a). Clark *et al.* (2009) descrevem os eritrócitos dos Ciconiformes como células ovais, com núcleo oval composto por cromatina densamente aglomerada e com citoplasma eosinofílico.

É frequente encontrar num esfregaço de sangue periférico de animais adultos saudáveis, um grau de 1-10% de regeneração eritrocitária, o que representa aproximadamente 2 a 10 células imaturas (células policromáticas) por campo de imersão, quando na presença de monocamada (Pendl & Samour, 2009). As células imaturas geralmente encontradas são os reticulócitos. Quando presentes em excesso é um sinal de maturação assíncrona, devido a uma eritropoiese acelerada, para reposição celular. O índice policromático é uma escala qualitativa utilizada para a avaliação da morfologia eritrocitária e pode ser observado no Anexo III (Tabela 14) (Campbell, 1994; Pendl & Samour, 2009).

### **2.2.1.2 Leucócitos**

Tal como nos mamíferos, é possível distinguir dois grupos de leucócitos no sangue das aves – granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos possuem grânulos citoplasmáticos e podem ser classificados como heterófilos, eosinófilos e basófilos, sendo ainda os dois primeiros designados de acidófilos pois os seus grânulos apresentam afinidade para colorações ácidas (Campbell, 1994; Clark *et al.*, 2009). Agranulócitos ou células mononucleares é a designação que se dá aos linfócitos e monócitos (Campbell, 2006a).

O processo de maturação dos granulócitos tem o nome de granulopoiese, evoluindo os linfócitos e monócitos por linhas celulares distintas – a linfopoiese e a monopoiese. A linfopoiese corresponde ao desenvolvimento da linha linfocitária, que envolve três estádios de maturação – linfoblasto, prolinfócito e linfócito maduro - sendo que em animais saudáveis 90% dos linfócitos encontrados nos tecidos linfóides são células maduras (linfócitos B e T) (Campbell, 1994). A Monocitopoiese está pouco estudada em aves, sabe-se que passa por quatro estádios de desenvolvimento – monoblasto, promonócito precoce, promonócito tardio e monócito maduro. As células maduras são libertadas na corrente sanguínea e ao passar para os tecidos corporais são transformadas em macrófagos (Campbell, 1995b).

O processo de maturação dos granulócitos, tal como nos mamíferos possui seis estádios de desenvolvimento - mieloblasto (granuloblasto), progranulócito (promielócito), mielócito, metamielócito, granulócito em bastonete e granulócito maduro - ocorrendo uma diminuição progressiva no tamanho e basofilia do citoplasma, o núcleo inicialmente redondo começa a segmentar (excepto nos basófilos) e a cromatina aparece mais condensada. Os grânulos citoplasmáticos específicos de cada célula aparecem nos últimos estádios de desenvolvimento (Campbell, 1994; Campbell, 2006a).

Os *heterófilos* são os leucócitos mais comumente encontrados no sangue periférico de determinadas espécies, sendo estas chamadas de espécies granulocíticas. Até à data estão

classificadas como granulocíticas as ordens Psitaciformes, Falconiformes e Strigiformes, por possuírem na contagem diferencial de leucócitos uma maior proporção de heterófilos (rácio H/L>1) (Samour & Pendl, 2009). As células maduras são geralmente arredondadas, o núcleo é lobado (dois a três lobos), composto por aglomerados de cromatina com coloração púrpura e aparece geralmente escondido pelos grânulos citoplasmáticos. O citoplasma incolor é ocultado pelos grânulos em forma de bastonete, que se distinguem dos restantes por terem um corpo central retráctil (Campbell 1995a, Pendl & Samour 2009). A aparência geral destas células não varia muito de espécie para espécie, e são susceptíveis a artefactos (Pendl & Samour, 2009). Os heterófilos das aves são considerados funcionalmente equivalentes aos neutrófilos dos mamíferos, apresentam uma função importante na resposta imunitária inata, participam activamente em respostas inflamatórias, na fagocitose de microrganismos e apresentam actividade bactericida (Campbell, 2006a; Samour & Pendl, 2009; Pendl 2011b).

Os *eosinófilos* são células tipicamente redondas, mas que possuem uma grande variabilidade inter-específica e pouca susceptibilidade para artefactos. As células maduras são caracterizadas pelo seu núcleo lobado, corado intensamente e com uma estrutura bem definida. O citoplasma apresenta-se incolor a basofílico e está geralmente escondido por grânulos grandes e redondos (elípticos nos Anseriformes), com uma coloração que varia entre incolor, eosinofílica e basofílica e que possuem brilho devido à elevada concentração de arginina. Nos grânulos eosinofílicos não é possível identificar um corpo central (Campbell, 1995a; Pendl & Samour, 2009). O papel dos eosinófilos das aves é ainda desconhecido, no entanto, parece não existir relação entre eosinofilia e reacções parasitárias ou anafilácticas. Actualmente, sugere-se a sua ligação ao trauma tecidual e dermatopatias (Campbell, 2006a; Samour & Pendl, 2009; Pendl, 2011b).

Os *basófilos* são células redondas, com um núcleo redondo, não lobado, que se apresenta como uma estrutura pouco definida corada geralmente com um azul ténue. Geralmente este aparece escondido pelos grânulos citoplasmáticos. A coloração do citoplasma varia entre incolor, eosinofílico ou basofílico e os grânulos variam bastante devido à elevada tendência para a desintegração que apresentam estas células. Nas células íntegras pode ver-se uma grande densidade de pequenos grânulos com coloração violeta escuro. A morfologia observada num esfregaço está dependente da técnica utilizada. São células muito susceptíveis aos artefactos (Campbell, 1995a; Pendl & Samour, 2009). Os basófilos são frequentemente encontrados na circulação periférica de aves saudáveis, a sua função ainda não é totalmente conhecida, mas parece estar associada a reacções antiinflamatórias e de hipersensibilidade tipo IV e também a trauma tecidual grave (Campbell, 2006a; Samour & Pendl, 2009; Pendl, 2011b).

São designadas por espécies linfocíticas (Galiformes, Anseriformes, Columbiformes e Fasianiformes), aquelas em que os linfócitos são os leucócitos mais encontrados no sangue

periférico (rácio H/L<1) (Samour & Pendl, 2009). Os *linfócitos* são geralmente células redondas, mas que se deformam com o contacto com células adjacentes. Em termos de tamanho são classificados em três grupos: pequenos, médios e grandes, sendo que os primeiros quase não possuem citoplasma (elevado rácio N/C) e as últimas apresentam citoplasma abundante. Usualmente, em esfregaços de sangue periférico são mais encontrados linfócitos pequenos e médios (Campbell 1995a, Pendl & Samour 2009). O núcleo destas células é geralmente redondo, com localização central e a cromatina nuclear densamente aglomerada ou reticulada. O citoplasma é homogéneo, fracamente basofílico e ocasionalmente podem visualizar-se vacúolos e projecções irregulares – pseudópodes. (Campbell, 1995a; Pendl & Samour, 2009). Os linfócitos estão implicados na resposta imunitária adquirida e podem dividir-se em dois grupos funcionais, os linfócitos T responsáveis pela imunidade celular, e os linfócitos B responsáveis pela produção de imunoglobulinas e outros mediadores celulares (Samour & Pendl, 2009; Pendl, 2011b).

Os *monócitos* são células de tamanho médio a grande e geralmente são redondos mas podem também ser deformados pelo contacto com células adjacentes. O seu núcleo, na maioria das vezes em posição excêntrica, varia de redondo a bilobado e por vezes pode observar-se uma forma de rim. Os aglomerados de cromatina integrados na cromatina reticular podem estar presentes, mas em número reduzido. O citoplasma apresenta-se com uma coloração azul acinzentada que pode conter uma zona mais fracamente corada e outra mais intensa, a sua aparência é finamente granular e ocasionalmente contém vacúolos. A presença de vacúolos alaranjados e pseudópodes são sinal de activação (Campbell, 1995a; Pendl & Samour, 2009). Os monócitos funcionam como mediadores entre as respostas imunitárias inata e adquirida. Participam activamente na fagocitose de microrganismos, em respostas inflamatórias e no processamento de antígenos. São também responsáveis pela interacção antígeno-imunoglobulina específica, e pela apresentação de antígenos aos linfócitos (Campbell, 2006a; Samour & Pendl, 2009; Pendl 2011b).

Não existe até à data nenhum estudo realizado acerca das características leucocitárias da cegonha-branca, no entanto, Clark *et al.* (2009) inferem em relação aos leucócitos dos animais pertencentes à Ordem Ciconiformes, caracterizando os *heterófilos* como células irregularmente redondas com grânulos proeminentes, de coloração vermelho-escuro a acastanhado, presentes em elevada densidade. Os *eosinófilos* são caracterizados pelos seus grânulos de tamanho variável, redondos e brilhantes, que estão presentes em quantidade moderada a elevada, num citoplasma ligeiramente basofílico. Os *basófilos* são pequenos, redondos e com grânulos também redondos e fortemente basofílicos, encontrando-se presentes em elevada densidade, contudo, em algumas células em que ocorreu desgranulação, é possível observar um núcleo redondo e citoplasma sem cor. Os *linfócitos* e *monócitos* possuem morfologia consistente com as características gerais demonstradas pelas aves.

### **2.2.1.3 Trombócitos**

Os trombócitos das aves têm origem numa linha de células mononucleares na medula óssea. A maturação consiste em cinco estádios de desenvolvimento – tromboplasto, trombócito imaturo precoce, médio e tardio e trombócito maduro – ocorrendo uma redução do tamanho da célula, que evolui de redonda para oval. O rácio N/C aumenta, sendo que o núcleo aparece em posição incerta, possui forma redonda ou oval e a cromatina nuclear está densamente aglutinada, conferindo-lhe uma coloração muito escura. O citoplasma evolui de basofílico para acinzentado e não homogéneo, podendo ter aparência reticulada. Os trombócitos maduros das aves contêm frequentemente um ou mais grânulos vermelhos nos pólos celulares (Campbell, 1995a; Pendl & Samour, 2009; Campbell, 2006a).

As células maduras são mais pequenas e redondas que os eritrócitos maduros. Aparecem muitas vezes agregadas e neste caso apenas o núcleo é visível, tendo um aspecto polimórfico, o que facilita a sua identificação, mas dificulta a contagem. Pode obter-se uma estimativa do número de trombócitos a partir de um esfregaço, sendo que, em média é esperado encontrar por campo, com presença de monocamada e objectiva de imersão, um ou dois trombócitos permitindo uma classificação subjectiva quanto à quantidade como “Normal”, “Aumentada”, ou “Reduzida”. (Campbell, 1995a; Pendl, 2011b).

Os trombócitos desempenham um papel primordial na hemostase, participam activamente na formação de trombos e cicatrização de feridas, apresentando também uma função fagocitária (Campbell, 1995a; Campbell, 2006a; Samour & Pendl, 2009).

### **2.2.2 Influências artefactuais, fisiológicas e patológicas nas características hematológicas das aves**

A análise sanguínea fornece informação valiosa acerca do estado de saúde do animal, através de um método pouco invasivo, no entanto é necessária alguma prática para permitir a diferenciação de alterações (i) artefactuais, (ii) fisiológicas e/ou (iii) patológicas, que podem afectar a concentração e a morfologia celular (Clark *et al.*, 2009).

**i)** As alterações provocadas por artefactos como a presença de poeiras no esfregaço, lise celular provocada pela extensão, podem levar a conclusões erróneas, em caso de pouca experiência por parte do operador.

**ii)** A influência de factores fisiológicos como a idade, sexo, stresse, estação do ano, ritmo circadiano, efeito da migração e localização geográfica, pode afectar a concentração (Tabela 15 – Anexo III) em que estão presentes as células sanguíneas, mas geralmente não afecta a sua morfologia (Clark *et al.*, 2009).

Foram encontrados na literatura estudos que relacionam a influência da idade nos valores de hemograma em cegonha-branca (Puerta *et al.*, 1989; Montesinos *et al.*, 1997) e em outras espécies (Hawkey, Hart & Samour, 1984; Howlett, Bailey, Samour, Naldo, D’Aloia,



2002; Lanzarot, Barahona, SanAndrés, Fernández-García & Rodríguez, 2005; Hernández & Margalida, 2010).

Regra geral, os indivíduos jovens apresentam valores mais baixos de hematócrito, concentração de hemoglobina e concentração de eritrócitos e valores mais elevados na concentração de leucócitos do que indivíduos adultos da mesma espécie. Este facto pode ser justificado por um aumento da taxa de eritropoiese ao longo do crescimento (Fair, Whitaker & Pearson, 2007) devido a uma maior necessidade de oxigénio por parte das aves adultas para adaptação ao voo (Dujowich, Mazet & Zuba, 2005). Uma contagem de leucócitos mais elevada em animais jovens pode ser indicativo de maiores níveis de stresse, interacção social, captura e taxa de crescimento (Marco, Vinas, Velarde, Pastor & Lavin, 1997; citado por Dujowich *et al.*, 2005).

Prinzinger e Misovic (2010) apresentam um estudo em pombos, em que comparam o hematócrito e concentração de hemoglobina em pacientes adultos e geriátricos, obtendo diferenças significativas. O valor mais elevado de hematócrito pode ser observado em animais com 2 anos de idade, mantendo-se este valor estável até aos 6 anos de idade, altura em que ocorre um decréscimo anual ( $\approx 0.8\%$ ) até aos 14 anos. A concentração de hemoglobina atinge um valor máximo aos 2 anos de idade e permanece estável até aos 9 anos, altura em que inicia um decréscimo anual ( $\approx 3.2\%$ ) até aos 14 anos.

Pelo contrário, a alteração dos valores sanguíneos, consoante o sexo, não é constante nas espécies já estudadas, e não foram encontrados estudos realizados com o intuito de estudar essas alterações em cegonha-branca. De uma forma geral, fora do período de reprodução, parece existir uma maior concentração de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em machos do que em fêmeas da mesma espécie. (Campbell 2006a; Hauptmanova *et al.*, 2006 e Dos Santos Schmidt *et al.*, 2007, citados por Clark *et al.*, 2009). No entanto, outros estudos, não demonstram a existência dessas alterações nos valores do hemograma (Haefele, Sidor, Evers, Hoyt & Pokras, 2005; Limiñana, López-Olvera, Gallardo, Fordham & Urios, 2009).

Em relação ao estado reprodutivo um estudo comparativo em fêmeas obteve valores mais elevados de hematócrito em fêmeas fora da época de reprodução, quando comparado com fêmeas em actividade reprodutiva (Gayathri & Hegde, 2006; citado por Clark *et al.*, 2009). Foram ainda encontrados valores eritrocitários mais baixos em espécies que produzem uma maior quantidade de ovos (Kalmbach, Griffiths, Crane & Furness, 2004).

O efeito do stresse sobre as características hematológicas varia consoante a presença de um estímulo stressante agudo ou crónico, nomeadamente stresse de captura, colocação em instalações, interacções sociais, condições ambientais, alterações na rotina, sexo do indivíduo, presença de doença, temperaturas extremas e crescimento (Campbell, 1994), podendo assim provocar uma redistribuição das células nos tecidos ou uma imunossupressão, respectivamente (Dhabhar & McEwen, 1997). No caso de animais

selvagens sujeitos a um processo de captura, é considerado um estímulo agudo, reflectindo-se principalmente sobre as concentrações dos heterófilos e linfócitos, sendo que o factor indutor de stresse vai provocar o aumento do número de heterófilos e a diminuição do número de linfócitos (Vleck, Vertalino, Vleck & Bucher, 2000). O rácio H/L é facilmente obtido por avaliação do esfregaço sanguíneo e é considerado um excelente índice de medida para o stresse (Vleck *et al.*, 2000).

Vários estudos apontam para uma variação sazonal dos valores hematológicos, sendo os valores de hematócrito, a concentração de eritrócitos e de hemoglobina mais elevados durante o Inverno e início da Primavera (Williams & Trainer, 1971) e a contagem total de leucócitos apresenta valores mais baixos durante o Inverno (Spagnolo, Crippa, Marzia & Sartorelli, 2006).

A flutuação dos valores hematológicos com o ritmo circadiano foi observada em alguns estudos, concluindo que as concentrações de heterófilos e eosinófilos são mais elevadas e a concentração de infócitos mais reduzida, durante a manhã (Choudhury *et al.* 1982; citado por Clark *et al.*, 2009). Foi também observado um aumento do valor do hematócrito e concentração de eritrócitos pela manhã, diminuindo ao longo do dia (Rehder, Bird, Laguë & Mackay, 1982; Dawson & Bortolotti 1997, citado por Clark *et al.*, 2009).

Um estudo acerca da variação das características hematológicas com as horas de voo revelou que o hematócrito é dependente do estado do animal (em descanso ou em voo) e da massa corporal (gordura e músculo), ocorrendo uma diminuição nos valores de hematócrito após algumas horas de voo, em especial em animais sem depósitos de gordura (Jenni, Müller, Spina, Kvist & Linström, 2006). Em animais testados durante a migração, numa paragem em uma zona de descanso, os indivíduos que chegavam apresentavam valores mais baixos de hematócrito e concentração de hemoglobina que os animais que já estavam de partida para continuar a migração (Landys-Cianelli, Jukema & Piersma, 2002).

A localização geográfica de cada individuo e a comunidade de espécies com que interage podem afectar os seus valores hematológicos, o que é indicativo da interacção de vários factores como o habitat, competição, nutrição, idade, sexo, estrutura social, stresse e estado de saúde (Clark *et al.*, 2009). Haefele *et al.* (2005) reporta valores hematológicos dependentes da localização geográfica dos indivíduos testados e Dutton, Allchurch e Cooper (2002) observaram que existem valores hematológicos distintos em diferentes populações da mesma espécie, sugerindo que pode ser devido a diferenças na dieta e estado de hidratação.

**iii)** A presença de doença pode afectar a concentração das células sanguíneas, a morfologia ou ambas e, como tal, a presença de morfologia atípica (Tabela 16 - Anexo III) é uma forte evidência de resposta a um processo patológico (Clark *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Hemoparasitas

O parasitismo é definido como uma relação simbiótica entre duas espécies, na qual uma (o parasita) obtém benefícios da associação trófica com um organismo vivo de outra espécie (o hospedeiro), sendo este último prejudicado (Wobeser, 2008).

Existem vários constrangimentos ao estudo do parasitismo em aves selvagens, nomeadamente:

- ✓ Falta de informação acerca do hospedeiro, pois muito poucos animais são marcados;
- ✓ Falta de informação detalhada da biologia da espécie do hospedeiro, para percepção da interacção hospedeiro-parasita;
- ✓ Desconhecimento epidemiológico, dado que não são conhecidas prevalências, incidências, taxa de morbilidade e mortalidade;
- ✓ Necessidade de considerar o efeito a longo prazo do parasita sobre a manutenção de indivíduos na população, pois tende a ocorrer um aumento dos recursos por cabeça, e a melhoria dos factores reprodutivos, diminuindo a mortalidade por outros factores.
- ✓ A amostra de animais testados pode não ser representativa do estado da população na natureza; ou as técnicas tradicionais não serem suficientes para identificação do parasita (Valkiunas, 2005; Wobeser, 2008).

Os prejuízos provocados por determinado parasita no hospedeiro não são bem conhecidos, apesar de regra geral, os hemoprotozoários serem considerados pouco patogénicos em aves selvagens. Esta aparente benignidade, pode também ser justificada pela existência de recursos que permitem ao hospedeiro ultrapassar a infecção na altura em que é testado, ou ainda devido ao facto de animais infectados serem mais facilmente predados, sem serem detectados (Wobeser, 2008).

Apenas numa pequena quantidade de situações está descrito o parasitismo associado a alteração funcional, que pode ser caracterizada como doença. Foram já reportados casos de mortalidade em juvenis no ninho, aves debilitadas e em populações sem contacto prévio com os parasitas (Valkiunas, 2005). E existem evidências de que estes parasitas possam diminuir os índices reprodutivos das aves, sendo ainda considerados agentes de selecção natural das espécies (Sol, Jovani & Torres, 2003; Marzal, Lope, Navarro & Moller, 2005; Tomé, Santos, Cardia, Ferrand & Korpimaki, 2005).

A pesquisa de hemoparasitas é um dos únicos achados hematológicos que pode originar um diagnóstico etiológico, sendo estes encontrados ocasionalmente em esfregaços de aves (Pendl, 2011b). O hemoparasitismo das aves é tipicamente causado por hemosporídeos - *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium* - (Donovan, Schrenzel, Tucker, Pessier & Stalis, 2008). Os hemosporídeos são parasitas sanguíneos com distribuição cosmopolita, apresentam ciclo de vida heteroxeno, cujos hospedeiros invertebrados são dípteros sugadores de sangue e os hospedeiros vertebrados são anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Valkiunas, 2005). Os hemosporídeos são um dos grupos de protozoários mais bem

estudados e conhecidos, devido ao facto de incluírem o agente da malária (*Plasmodium spp.*) (Valkiūnas, 2005).

Para além dos hemosporídeos, podem também ser encontrados na circulação periférica de aves outros parasitas, mais raros e menos estudados, nomeadamente microfilárias, *Trypanosoma*, *Hepatozoon*, *Aegyptianella*, *Atoxoplasma*, *Borrelia* e *Babesia* (Campbell 2006a).

Apesar de não existir evidência científica, alguns estudos apontam para uma maior prevalência de hemoparasitas na fase em que as crias se encontram no ninho, devido à sua maior exposição aos vectores neste local ou devido ao impacto do stresse nutricional ou ambiental na susceptibilidade aos parasitas sanguíneos (Blanco, Gajón, Doval & Martínez 1998). Gabaldon & Ulloa (1985) citado por Valkiūnas (2005) descrevem um surto epizoótico de *Plasmodium* acompanhado de elevada mortalidade, em Ciconiiformes na altura da reprodução, na Venezuela.

Outros estudos revelam que a altura da migração é também problemática, sendo o *Plasmodium* e *Haemoproteus* transmitidos em especial nas zonas de invernada e zonas de descanso, pois é onde se encontram vários animais de várias espécies e localizações geográficas; e o *Leucocytozoon* e *Trypanosoma* transmitidos maioritariamente nas áreas de reprodução. Ocorrem flutuações anuais de incidência de infecção devido à variação na abundância dos vectores, determinada pelas condições climáticas nos territórios de invernada e ao longo da migração (Shurulinkov & Mihaela, 2009).

Existem vários estudos acerca da prevalência de hemoparasitas em variadas populações de aves, sendo que foi relatada a aparente ausência de hemoparasitas em algumas espécies de rapinas (Blanco *et al.*, 1998), aves marinhas (Jovani *et al.*, 2001; citado por Martínez-Abraín, Esparza e Oro, 2004), passeriformes (Stewart *et al.*, 1997; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004), cegonhas (Jovani, Tella, Blanco & Bertellotti, 2002), espécies da família *Apodiidae* (Tella *et al.*, 1995; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004), membros da Ordem Charadriiformes (Figuerola *et al.*, 1996; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004) e noitibós (Forero *et al.*, 1997; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

A presença ou ausência de hemoparasitas em determinadas espécies é um tópico complexo e como tal, ao longo do tempo têm vindo a ser colocadas várias hipóteses alternativas para a sua explicação (Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

A ausência aparente de parasitas sanguíneos em algumas espécies de aves, é comumente justificada pela ausência ou escassez de vectores ornitófilos em alguns habitats como o marinho, ventoso, árido, áreas abertas, ou ambientes com elevadas altitudes ou latitudes. Para além destes factores extrínsecos aparece a imunocompetência do hospedeiro e ausência de especificidade hospedeiro-parasita ou densidade reduzida de hospedeiros e tempo insuficiente de co-evolução de hospedeiro, vector e parasita para que

ocorra infecção. Martínez-Abraín *et al.* (2004) sugerem uma nova hipótese na qual uma elevada carga de ectoparasitas pode repelir os vectores dos hemoparasitas.

Ao colocar a hipótese da ausência de parasitas é imprescindível ter em conta factores extrínsecos, pois a aparente ausência de hemoparasitas pode ser devida a um artefacto causado pela dificuldade de detecção de determinado parasita, ou pela baixa taxa de detectabilidade de determinada técnica utilizada, ou ainda pela ausência ou escassez de vectores específicos. Pode também ser devido à variação individual na susceptibilidade do hospedeiro para ser parasitado dependendo da idade, sexo, comportamento, habitat e época do ano em que é realizada a amostragem (Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

Em relação à hipótese da associação significativa entre hospedeiro-parasita, vários estudos realizados, sugerem uma co-evolução e fidelidade entre estes (Hafner & Nadler, 1988; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004), sendo pouco frequente a troca de espécie de hospedeiro por parte de determinada espécie de parasita. Esta especificidade sugere que apesar de um dado parasita sanguíneo ser detectado numa comunidade de aves, as espécies de aves pouco relacionadas taxonomicamente podem estar livres de parasitas sanguíneos, apesar da presença dos vectores na área (Ricklefs & Fallon, 2001; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

Foram já realizados vários trabalhos para determinar a importância da imunocompetência do hospedeiro no controlo do parasitismo. Num estudo realizado foi descoberto que em espécies não-rapinas altriciais, a presença de hemoparasitas está inversamente relacionada com a duração do período de incubação (Ricklefs, 1992; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

O sistema imunitário apresenta um papel importante na prevenção de infecções por hemoparasitas. Apesar da presença dos vectores apropriados e da existência de uma associação específica entre hospedeiro e parasita, as aves podem estar livres da presença de hemoparasitas se apresentarem um sistema imunitário competente (Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

A nova hipótese colocada por Martínez-Abraín *et al.* (2004) acerca da exclusão competitiva de vectores de hemoparasitas mediante a presença de ectoparasitas, é baseada no facto de várias espécies de aves serem livres de hemoparasitas, encontrando-se altamente infestadas com ectoparasitas, o que é sugestivo da presença de interações biológicas entre alguns grupos de ectoparasitas e os vectores dos hemoparasitas.

De uma perspectiva evolutiva, os ectoparasitas defendem os hospedeiros, numa relação de mutualismo. Isto é, os hospedeiros que apresentam elevada prevalência e intensidade de ectoparasitas móveis podem obter uma defesa física contra as moscas e mosquitos mordedores que transmitem os parasitas sanguíneos. Se esta hipótese for verdadeira, a remoção artificial de todos os ectoparasitas de um hospedeiro pode ter consequências negativas (Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

Pode também ocorrer que a resposta imunitária montada contra o efeito dos ectoparasitas proteja o hospedeiro da infecção por outros parasitas, como parece acontecer entre algumas espécies de parasitas sanguíneos (Cox, 2001; citado por Martínez-Abraín *et al.*, 2004).

A conclusão a que chegaram Martínez-Abraín *et al.* (2004) foi que as hipóteses formuladas até ao momento ocorrem em simultâneo.

## **2.3 Bioquímica sanguínea**

A bioquímica sanguínea é uma ferramenta essencial para avaliação da função orgânica, estado de desidratação, performance e perfil inflamatório. É importante ter em consideração que esta análise é apenas um complemento adicional importante à história clínica, exame físico e hemograma, para determinar o estado geral de saúde do animal.

Os parâmetros bioquímicos, com algumas excepções, não fornecem um diagnóstico mas podem ser sugestivos do grau de envolvimento de determinado órgão (Fudge, 1997; Wernery, Wernery, Kinne & Samour, 2004).

Em medicina de aves selvagens, muitos diagnósticos são realizados *post mortem*. O recurso crescente aos exames complementares de diagnóstico tem vindo a reverter um pouco esta situação, sendo as análises bioquímicas cada vez mais uma ferramenta auxiliar de diagnóstico. No entanto, é importante ter em consideração a existência de diferenças anatómicas e fisiológicas em relação aos mamíferos, e a necessidade de medição de diferentes metabolitos (Harr, 2002).

Seguidamente será apresentada uma revisão da literatura de anatomia e fisiologia no rim e fígado, e identificadas algumas diferenças em relação aos mamíferos. Serão apenas objecto de estudo estes dois órgãos pois são os mais susceptíveis de provocar alterações nos parâmetros bioquímicos testados neste trabalho. Será também realizado um estudo acerca da importância de cada metabolito.

É importante ter em consideração que ainda não foram realizados estudos na área de análises bioquímicas, para toda a biodiversidade da classe das aves, e como tal, muitas doenças em que pode ocorrer aumento ou diminuição de determinado metabolito não estão ainda documentadas. Os valores de referência dos parâmetros bioquímicos em estudo, para a classe das aves, estão apresentados no Anexo IV (Tabela 18).

### **2.3.1 Avaliação renal**

#### **2.3.1.1 Anatomia e fisiologia**

O sistema urinário nas aves é composto por um par de rins metanéfricos localizados simetricamente na fossa renal do sinsacro, e por uréteres que transportam a urina até ao *urodeum* da cloaca. Ao contrário dos mamíferos as aves não possuem cavidade piélica, nem bexiga, sendo que os tubos colectores dos vários nefrónios se vão unindo para formar, na parte terminal do cone medular, um tubo colector comum que abre directamente para o

uretér. Algumas espécies de aves têm a capacidade de armazenamento de urina na cloaca (Goldstein & Skadhauge, 2000).

Cada rim é alongado e trilobado, com divisão cranial, média e caudal, e cada um destes lobos é composto por lóbulos com grandes áreas corticais e pequenas áreas medulares, cuja separação não é muito nítida. Existem dois tipos distintos de nefrónios: os superficiais corticais (nefrónio tipo réptil) e os nefrónios medulares (nefrónio tipo mamífero).

Os nefrónios corticais são classificados como uricotélicos pois são desprovidos de ansas de Henle possuem o glomérulo mais pequeno, e estão localizados apenas no córtex. Os nefrónios medulares (nefrónio tipo mamífero), estão envolvidos no mecanismo de contracorrente e no processo de gradiente osmótico para a formação da urina, possuindo sistema tubular mais desenvolvido, com ansa de Henle, estando presentes em menor quantidade, cerca de 10 a 30% (Lumeij, 1994b; Harr, 2002; Campbell, 2006b). Entre os dois tipos de nefrónios existe uma espécie de gradação contínua de nefrónios, chamados nefrónios de transição, que possuem características intermédias (Goldstein & Skadhauge, 2000). Alguns estudos sugerem que o padrão da estrutura renal, o tamanho dos rins e o espaço medular e cortical pode estar relacionado com o habitat (Casotti & Richardson, 1992).

Uma vez que nas aves, os nefrónios corticais estão presentes em maior número, a sua eficiência na excreção de electrólitos é inferior à dos mamíferos (Lumeij, 1994b). Em adição, cada nefrónio medular possui uma taxa de filtração glomerular (TFG) inferior a um nefrónio de mamífero. No entanto, as aves possuem mais nefrónios por rim, pelo que a taxa de filtração glomerular final média é semelhante nas duas classes de animais. Nas aves há ainda formação de shunts sanguíneos entre os dois tipos de nefrónios, aumentando a capacidade para concentrar a urina. Esta capacidade parece aumentar inversamente com o tamanho do animal (Lumeij, 1994b; Harr, 2002; Campbell, 2006b).

As aves possuem aparelho justaglomerular e uma mácula densa rudimentar. O aparelho justaglomerular consiste em uma arteríola aferente, células secretoras justaglomerulares que produzem a renina, e células mesangiais extra glomerulares (Campbell, 2006b).

A perfusão renal é realizada pelas artérias renais (anterior, média e posterior) e por um sistema porto-renal e a drenagem é concretizada por um fluxo venoso eferente que termina na veia cava caudal (Lumeij, 1994b; Campbell, 2006b). Relativamente ao sistema porto-renal, a veia porta renal, com origem nas veias ilíacas e isquiática, funciona como uma artéria ao fornecer aproximadamente dois terços do sangue para os túbulos renais. O seu significado funcional pode estar relacionado em parte com a regulação hemodinâmica sistémica particularmente em alturas de actividade dos membros posteriores, e também com a regulação hemodinâmica renal principalmente quando o fluxo ou pressão arterial estão reduzidos (Wideman, 1991; Goldstein & Skadhauge, 2000).

Tal como nos mamíferos, o rim apresenta uma função vital na osmorregulação e na eliminação de resíduos orgânicos. Para além dos rins, o tracto intestinal, glândulas do sal (quando presentes), pele e tracto respiratório controlam também a osmorregulação (Goldstein & Skadhauge, 2000).

Tal como nos mamíferos, a taxa de filtração glomerular e taxa de reabsorção são influenciadas pela hormona antidiurética, que no caso das aves, é a arginina vasotocina (AVT) (Goldstein & Skadhauge, 2000). A regulação da reabsorção de água ocorre no segmento distal do nefrónio e tal como os mamíferos, também as aves têm a capacidade de produzir urina mais concentrada que o plasma, através de um mecanismo de contracorrente múltiplo, que produz um gradiente de osmolaridade na medula renal, o tubo colector recebe urina diluída, e é aqui que ocorre a concentração final.

O produto final da filtração, reabsorção e secreção entra nos ureteres como urina. O volume de urina é dependente da quantidade de água ingerida pelo animal e do nível de stresse, mas geralmente varia entre 100 e 200 ml/kg/dia. Um animal desidratado pode apresentar um volume de urina de 25 ml/kg/dia (Lumeij, 1994b).

Alguma quantidade de urina excretada para a cloaca pode ainda ser impulsionada por um movimento anti-peristáltico do *urodeum* para o *coprodeum* da cloaca e daí para o recto, cólon e ceco, onde pode ocorrer reabsorção de água e trocas iónicas, o que vai afectar a gravidade específica, a concentração de electrólitos e a contaminação bacteriana da urina. Em animais desidratados 15% da água pode ser reabsorvida por este mecanismo (Lumeij, 1994b; Goldstein & Skadhauge, 2000; Harr, 2002).

Os excrementos das aves saudáveis são compostos por três porções: uma porção fecal com consistência semi-sólida e coloração variável de verde a castanho consoante a alimentação; uma porção de ácido úrico e uratos em suspensão floculenta e com coloração branca a creme e; uma terceira porção composta por água e muco ligeiramente viscosa e com coloração clara (Styles & Phalen, 1998).

### **2.3.1.2 Sinais clínicos e exames de diagnóstico na avaliação renal em aves.**

As doenças do tracto urinário em aves são relativamente comuns, quer sejam primárias ou secundárias a uma doença sistémica, porém, o diagnóstico continua a ser realizado maioritariamente no exame *post mortem*, dado que a confirmação de uma suspeita é dificultada pelos sinais clínicos não específicos e complicados pelas alterações secundárias que causam a disfunção renal (Lumeij, 1994b). As doenças renais são geralmente subclínicas até atingirem um estado grave (Fudge, 1997).

Apesar de não existirem sinais patognomónicos de doença renal, o aumento do volume e frequência de urina (poliúria e polaquiúria) podem ser o sinal primário. Contudo, este sinal pode também ser simplesmente uma resposta fisiológica ao stresse. Desta forma, em animais selvagens a quantidade de urina produzida enquanto estão internados pode não reflectir a realidade. A poliúria deve ser diferenciada da diarreia, pela presença de fezes



moldadas (Styles & Phalen, 1998). Alguns sinais de doença sistémica são a biliverdinúria, hemoglobínúria e hematúria (Styles & Phalen, 1998).

O diagnóstico clínico de doença renal é muito limitado em aves (Scope, 2011). A interpretação combinada da história do animal, exame clínico, parâmetros bioquímicos, urianálise, e outros testes de diagnóstico como radiografia, endoscopia e biópsia, fazem parte do painel utilizado para perceber o carácter da alteração renal (Lumeij, 1994b; Styles & Phalen, 1998).

### **2.3.1.3 Parâmetros bioquímicos na avaliação renal em aves**

Existem diferenças marcadas na anatomia, fisiologia, função renal e osmorregulação em mamíferos e aves, e deste modo o painel renal rotineiramente utilizado em mamíferos não apresenta vantagem em aves (Harr, 2002).

A utilização de parâmetros químicos plasmáticos para o diagnóstico de doença renal é limitada, devido à falta de valores de referência para a maioria das espécies, e devido a alterações plasmáticas ocorrerem apenas em estado avançado de lesão renal, não existindo testes sensíveis para avaliação da função renal (Lierz, 2003).

Neste tópico vão ser abordados a importância do (i) ácido úrico, (ii) ureia e rácio AU/U, (iii) creatinina, e (iv) cálcio e fósforo, como auxiliares no diagnóstico de doença renal. Um aumento na concentração plasmática de ácido úrico, creatinina e ureia ocorre apenas em caso da função renal estar reduzida a 30% da sua capacidade original (Scope, 2011).

#### **i) Ácido úrico (AU)**

As aves são animais uricotélicos, pois excretam entre 60-80% dos resíduos nitrogenados em forma de AU, sendo este o principal produto do catabolismo proteico. Este metabolito é sintetizado primariamente no fígado e estudos em pombos demonstram que pode também ser sintetizado nos rins (Styles & Phalen, 1998; Goldstein & Skadhauge, 2000; Scope, 2011).

Aproximadamente 90% do AU em circulação é excretado nos túbulos proximais dos nefrónios corticais, e apenas 10% é filtrado pelo glomérulo. Ocorrendo a excreção de uma forma quase independente ao volume de urina filtrada, a sua concentração não é afectada por alterações moderadas na TFG (Fudge, 1997; Campbell, 2006b). Uma vez na urina, o AU combina-se com secreções proteínáceas existentes nos túbulos e precipita na solução sob a forma de um condensado esbranquiçado (Scope, 2011).

A avaliação da concentração plasmática de AU é geralmente utilizada como indicador de doença renal, apresentando contudo uma sensibilidade reduzida, dado que para que ocorra hiperuricémia é necessária uma perda de aproximadamente 75% da função renal. Também não é indicador específico, uma vez que o aumento pode ocorrer após ingestão de alimento rico em proteínas, em períodos de jejum prolongado por mobilização de reservas proteicas (Alonso-Alvarez & Ferrer, 2001), ou apenas quando já ocorreu necrose grave dos tecidos.

Importa contudo referir, que a avaliação sequencial da concentração de ácido úrico tem bastante utilidade para monitorização do tratamento e avaliação da progressão da doença (Harr, 2002; Campbell, 2006b).

A hiperuricémia está descrita em variados processos incluindo nefrotoxicose por chumbo ou aminoglicosídeos, obstrução urinária, nefrite, gota visceral ou articular, nefrocalcinose (por hipervitaminose D3), e nefropatia associada com hipovitaminose A (lesão do epitélio e túbulos renais) (Campbell, 2006b; Krautwald-Junghanns, 2007).

A hipouricémia pode ocorrer em caso de insuficiência hepática, com possível redução da síntese de AU, e em animais com poliúria e polidipsia marcadas (mecanismo desconhecido) (Fudge, 1997).

## **ii) Ureia e rácio U/AU**

A ureia representa 20-40% dos produtos do catabolismo proteico, pelo que está presente no plasma em pequenas quantidades (Lumeij & Remple, 1991).

Este metabolito é sintetizado no fígado e excretado nos rins. É eliminado 100% por filtração glomerular e pode ser reabsorvido, pois a sua excreção depende do estado de hidratação do animal e da produção de urina, sendo que em animais desidratados é completamente reabsorvido nos túbulos distais e em animais hidratados só uma pequena porção é reabsorvida (Lumeij, 1987; Fudge, 1997; Campbell, 2006b).

Este metabolito não é um bom indicador de função renal, mas pode ser um teste sensível para a detecção de insuficiência pré-renal provocada por desidratação (Scope, 2011). Adicionalmente, o rácio U/AU pode também ser um bom indicador do estado de desidratação e da função renal em aves, pois em casos de insuficiência renal em que ocorre uma redução do fluxo urinário, o rácio U/AU aumenta, segundo Lumeij (1987). Naidoo, Diekmann, Walters e Swan (2008) consideram este parâmetro como o mais apropriado para avaliação de doença renal.

## **iii) Creatinina**

A creatinina é o resultado do catabolismo da creatina no tecido muscular. Ao contrário dos mamíferos em que o nível de creatinina está relacionado com a TFG, nas aves os níveis basais são muito reduzidos, estando perto do limite de quantificação do ensaio, pois a creatina é excretada pelo rim antes de ser convertida em creatinina (Scope, 2011).

A creatinina é filtrada, activamente secretada e reabsorvida nas aves saudáveis. Lumeij (1987) descreve um aumento de 30% na concentração de creatinina plasmática em pombos desidratados.

Na nefrologia aviária a utilização da creatinina plasmática não é considerado um indicador fidedigno de função renal (Krautwald-Junghanns, 2007). Assim, a creatina, mais do que a creatinina poderia detectar uma redução na TFG. No entanto, a maioria dos laboratórios não analisa rotineiramente este metabolito (Fudge, 1997; Campbell, 2006b).

#### **iv) Cálcio e fósforo**

O cálcio e o fósforo são indicadores de função renal e auxiliam na avaliação de problemas nutricionais em aves (Villegas *et al.*, 2004).

A quantidade de cálcio extracelular flutua bastante nas aves. Cerca de 20 a 60% do cálcio extracelular apresenta-se na forma de cálcio ionizado biologicamente activo, aproximadamente 40% forma complexos cálcio-proteína (especialmente albumina) e uma percentagem mais reduzida forma complexos com outros aniões como o lactato ou citrato. O cálcio que se encontra em complexos é biologicamente inactivo e pode estar reduzido sem causar efeitos clínicos, apesar de promover a redução na concentração plasmática de cálcio total (Johnston & Ivey, 2002).

O cálcio é essencial para uma grande variedade de processos metabólicos. Apresenta um papel vital nas estruturas de suporte como constituinte mais importante do osso e casca do ovo, tendo também importantes funções no metabolismo nervoso e das células musculares e na activação de sistemas enzimáticos (Campbell, 2006b).

As maiores necessidades em cálcio ocorrem durante o crescimento como maior constituinte do osso e durante a postura, para a formação da casca do ovo. Como tal, existe um conjunto de sistemas que interagem intimamente de modo a manter o nível de cálcio constante no plasma e nos tecidos, pois alterações na concentração deste metabolito resultam numa grande variedade de problemas clínicos em aves (Johnston & Ivey, 2002).

O controlo do metabolismo do cálcio biologicamente activo é mediado pela paratormona (PTH), calcitonina e vitamina D<sub>3</sub>, sendo também influenciado por outras hormonas (estrogénios, corticosteróides, tiroxina e glucagina). Quando a concentração plasmática de cálcio ionizado diminui, as glândulas paratiróides são estimuladas a libertar PTH que promove a mobilização de cálcio do osso, aumenta a absorção de cálcio na mucosa intestinal e a reabsorção pelos túbulos renais, ao mesmo tempo que aumenta a excreção de fósforo para manter o rácio Ca:P (Johnston & Ivey, 2002; Campbell, 2006b). As aves parecem responder à libertação da paratormona mais rapidamente que os mamíferos (Goldstein & Skadhauge, 2000).

A calcitonina é produzida pelas glândulas ultimobranquiais e em algumas espécies também pela paratiróide e tiróide, e libertada em caso de aumento na concentração de cálcio plasmático, para prevenir a excessiva reabsorção a partir do osso (Johnston & Ivey, 2002; Campbell, 2006b).

Os efeitos renais da paratormona estão interligados com o metabolismo da vitamina D. O calciferol estimula a absorção de cálcio e fósforo pela mucosa intestinal, aumenta a sensibilidade do osso à acção da PTH e possui um papel importante na mineralização óssea (Goldstein & Skadhauge, 2000; Campbell, 2006b).

A ocorrência de hipercalcémia está descrita fisiologicamente em fêmeas em ovulação, ocorrendo aumentos artefactuais em caso de hiperproteinémia (hiperalbuminémia), lipémia,

hemólise ou contaminação bacteriana da amostra e patologicamente em caso de hipervitaminose D<sub>3</sub> e em caso de lesões ósseas osteolíticas, não tendo sido ainda documentada em outras patologias em aves (Campbell, 2006b).

A hipocalcémia aparece artefactualmente em casos de hipoproteinémia (hipoalbuminémia), com a utilização de EDTA, citrato e oxalato que contêm quelantes do cálcio. Está também associada a deficiência em cálcio (hiperparatiroidismo nutricional secundário) e vitamina D<sub>3</sub> na dieta, excesso de fósforo na dieta, em caso de insuficiência renal em que não há reabsorção de cálcio nos túbulos renais (hiperparatiroidismo renal secundário), hipoparatiroidismo primário, malabsorção e rabdomiólise grave (Campbell, 2006b). No entanto mesmo em casos de deficiência grave de cálcio na dieta a PTH vai mobilizá-lo do osso mantendo as concentrações fisiológicas no plasma, revelando a história e o exame físico e radiográfico um desequilíbrio de cálcio (Johnston & Ivey, 2002; Campbell, 2006b).

O fósforo é um dos princípios constituintes do osso e um composto celular vital, tendo um papel importante no armazenamento, libertação e transporte de energia e no metabolismo ácido-base. Embora não numa base consistente, alterações na concentração podem ocorrer em diversas doenças, tendo deste modo um fraco valor diagnóstico (Fudge, 1997). O metabolismo do fósforo nas aves é semelhante ao dos mamíferos. O fósforo inorgânico é derivado da dieta e posteriormente regulado pela excreção renal, estimulada pela PTH (Campbell, 2006b).

O aumento plasmático não é geralmente observado em aves, mas pode ocorrer artefactualmente por excesso de fósforo na dieta ou por processamento impróprio da amostra (hemólise, utilização de citrato, oxalato ou EDTA como anticoagulantes). Ocorre patologicamente em caso hipoparadiroidismo, doença renal grave em que há uma redução da TFG, ou em hipervitaminose D<sub>3</sub> (aumento da absorção do fósforo intestinal).

A hipofosfatémia ocorre em caso de hipovitaminose D<sub>3</sub> (aumento concomitante do cálcio), malabsorção devido a quelantes de fosfato na dieta (cálcio normal), períodos prolongados de jejum e em caso de terapia prolongada com corticosteróides (Campbell, 2006b).

O rácio Ca:P é geralmente superior a um, em caso de ocorrer inversão do rácio, há uma forte indicação de presença de doença renal ou outro tipo de alteração (Scope, 2011).

## **2.3.2 Avaliação hepática**

### **2.3.2.1 Anatomia e fisiologia**

O fígado das aves é bilobado, sendo que o tamanho e simetria dos lobos varia com a espécie. Comunica ventralmente com a quilha, cranialmente com a base do coração e dorsalmente com as margens laterais do proventrículo (Lumeij, 1994a).

Os canalículos biliares drenam para os ductos interlobulares e, estes últimos convergem formando o ducto hepático esquerdo e direito. A bilis é transportada para a ansa ascendente do duodeno por dois ductos, o *ducto hepato-entérico comum*, formado pela convergência do ducto hepático esquerdo e direito, e pelo *ducto cístico-entérico* que tem origem no ducto hepático direito e drena a vesícula biliar. Em caso de a vesícula biliar estar ausente (pombo, papagaio, avestruz), o *ducto hepato-entérico direito* drena directamente o ducto hepático direito para o duodeno (Lumeij, 1994a; Denbow, 2000).

Outra diferença em relação aos mamíferos é a ausência de linfonodos mesentéricos (Lumeij, 1994a).

O fígado está envolvido numa grande diversidade de processos essenciais. Tem função de armazenamento, digestão (em especial de gorduras), absorção e em vários processos metabólicos de nutrientes e destoxificação da circulação sistémica e portal, está também envolvido na síntese de carboidratos, factores de coagulação e outras proteínas (Lumeij, 1994a; Jaensch, 2000; Campbell, 2006b).

### **2.3.2.2 Sinais clínicos e exames de diagnóstico na avaliação hepatobiliar em aves**

A apresentação clínica dos animais com doença hepática é bastante variável, sem sinais clínicos característicos ou consistentes, podendo variar de assintomática a morte súbita, o que a torna insuficiente por si só para estabelecer um diagnóstico clínico (Jaensch, 2000).

O sintoma mais sugestivo de envolvimento hepático é a presença de *biliverdinúria* (coloração verde da fracção de urina e uratos). Esta pode ser acompanhada de sinais clínicos gastrointestinais (anorexia, vômito, regurgitação, perda de peso, diarreia, melena), renais (poliúria e polidipsia), respiratórios (dispneia), neurológicos (fraqueza, alterações de comportamento, convulsões, parésia), sinais não específicos (anemia, ascite, aspecto doente, letargia, coagulopatia) e ainda de sinais dermatológicos (prurido por deposição de sais biliares, picar as penas, alteração da coloração, bico e unhas amolecidas, quebradiças e com sobrecrecimento) (Lumeij, 1994a; Jaensch, 2000).

O tecido hepático, tal como nos mamíferos, possui uma capacidade de regeneração superior a outros tecidos. A constante exposição dos hepatócitos à absorção de nutrientes, toxinas e flora do tracto intestinal resulta num ciclo contínuo de destruição e regeneração celular. Este facto, aliado à grande capacidade de reserva, torna difícil a elaboração de um diagnóstico prematuro, pois é necessário que esteja comprometido 80% da função hepática para que o processo se torne clinicamente aparente (Jaensch, 2000).

### **2.3.2.3 Parâmetros bioquímicos na avaliação hepatobiliar em aves**

Devido ao papel central que o fígado representa em variados processos no organismo, alterações patológicas deste órgão vão dar origem a alterações físicas e bioquímicas, e a realização sistemática de testes à função hepática, fornece informação valiosa para monitorizar o progresso da doença e determinar o prognóstico (Jaensch, 2000; Campbell, 2006b). A maioria dos testes utilizados em mamíferos para diagnóstico de doença hepática, são menos específicos ou não aplicáveis em aves, resultando em dificuldade em chegar a um diagnóstico etiológico (Jaensch, 2000).

Devido a todos estes aspectos da função hepática, é importante utilizar uma abordagem sistemática por forma a diagnosticar uma suspeita de doença hepática, o que minimiza o risco de má interpretação dos resultados e aumenta a probabilidade de determinação da causa da doença, permitindo, assim, a realização do tratamento adequado e estabelecimento de um prognóstico (Jaensch, 2000).

Tal como nos mamíferos, também nas aves existem parâmetros mais específicos de lesão hepática e de função e síntese hepática. A determinação das enzimas AST, LD e glutamato desidrogenase (GLD), em combinação com a CK, para exclusão de lesão muscular, correspondem ao perfil enzimático comum para avaliação de lesão hepatobiliar em aves (Scope, 2011). Para investigação de função hepática, a determinação da concentração plasmática de ácidos biliares (AB) é mais apropriada (Cray, Gautier, Harris, Arheart 2008; Scope, 2011).

É importante ter em conta que a concentração plasmática de AB aumenta em estadios mais avançados de doença e, pelo contrário, as enzimas aumentam em casos agudos e podem normalizar rapidamente. Devido ao desconhecimento temporal da evolução de uma doença, o ideal é a combinação da medição de enzimas, proteínas plasmáticas, AB, e ainda a elaboração de testes de síntese hepática, para maximizar a sensibilidade da análise (Cray *et al.*, 2008).

O painel hepático realizado neste trabalho inclui as (i) enzimas hepáticas (AST, LD, ALT, GGT, FA), (ii) creatina quinase, (iii) AB, (iv) TG, (v) PT e (vi) glucose. Seguidamente vai ser apresentada a importância de cada um dos metabolitos determinados no trabalho prático, e ainda da bilirrubina por ser determinado por rotina em mamíferos e, GLD pela sua importância em aves.

#### **i) Enzimas hepáticas**

As alterações enzimáticas estão geralmente associadas à perda de enzimas e isoenzimas para o plasma pelas células lesionadas, e são indicadores valiosos de lesão tecidual em várias doenças. O significado do aumento da concentração plasmática de determinada enzima é dependente de factores como a actividade da enzima nas células e, o seu grau de eliminação celular e remoção do plasma (Boyd, 1983; Lumeij, DeBruijne, Slob, Wolfswinkel & Rothuizen, 1988a; Villegas *et al.*, 2004).

O facto de uma enzima possuir pouca actividade em determinado órgão não invalida que seja sintetizada em grandes quantidades em caso de doença, como é o caso da FA e GGT na presença de colestase hepática. Pelo contrário há enzimas que se encontram em grande quantidade no rim, intestino ou cérebro e não estão proporcionalmente elevadas no plasma em caso de doença, devido a serem directamente excretadas na urina ou fezes, ou não passarem a barreira hemato-encefálica (Lumeij *et al.*, 1988a).

O tempo de semi-vida no plasma afecta a interpretação de um perfil enzimático não fisiológico, isto é, uma enzima que tem elevada actividade num órgão em particular, mas que tem tempo de semi vida curto, tem um valor clínico limitado (Lumeij *et al.*, 1988a).

O fígado está envolvido em várias doenças de aves, no entanto a correlação das variáveis plasmáticas com a doença hepática contínua incerta, devido a variações inter-específicas no grau de concentração nos tecidos e de remoção plasmática, das diferentes enzimas e isoenzimas, pelo que é importante o estabelecimento de valores de referência para as várias espécies (Lumeij *et al.*, 1988a; Lumeij, Meidam, Wolfswinkel, Van der Hage & Dorrestein, 1988b; Cray *et al.*, 2008).

#### *Aspartato amonitransferase (AST)*

Enzima intracelular, com localização na mitocôndria. Presente em grandes quantidades no fígado, músculo-esquelético, músculo cardíaco, rim, cérebro e muito pouco no intestino, no entanto, a sua distribuição nos tecidos é variável consoante a espécie (Lumeij *et al.*, 1988a; Campbell 2006b, Scope, 2011).

Apresenta juntamente com a LD actividade mais elevada no fígado, mas devido à sua elevada distribuição por outros tecidos não é hepato-específica. A sua concentração não está aumentada em caso de doença renal, intestinal ou no SNC (Lumeij *et al.*, 1988a).

A AST apresenta um tempo de semi-vida superior à LD e CK, sendo que o pico plasmático ocorre 24 a 48 horas após o incidente que provocou a lesão e só regressa a valores basais em aproximadamente 100 horas. Uma determinação seriada desta enzima é útil para controlo de recuperação da lesão, porém, valores normais não são indicativos de função normal do fígado (Fudge, 1997; Campbell, 2006b; Scope, 2011).

O aumento plasmático está descrito em caso de hepatopatias e lesão muscular ou cardíaca. Valores superiores a 800 IU/L, são sugestivos de lesão hepática grave, especialmente na presença de biliverdinúria ou biliverdinémia (Campbell, 2006b).

#### *Alanina aminotransferase (ALT)*

Enzima intracelular, localizada no citosol. Apresenta distribuição ampla pelos tecidos sendo encontrada em especial no fígado, músculo esquelético e rim (Lumeij *et al.*, 1988a).

A ALT é hepato-específica em mamíferos. Em aves, esta enzima, é mais específica de doença hepática que a AST e LD, no entanto, apresenta sensibilidade reduzida (elevação plasmática é rara), o que lhe confere baixo valor diagnóstico. A actividade aumenta na presença de lesão significativa no fígado ou músculo e, o seu tempo de semi-vida é superior

ao da LD e AST. Pelas razões descritas não apresenta vantagem em relação à AST (Lumeij *et al.*, 1988a; Campbell, 2006b; Scope, 2011).

#### *Lactato desidrogenase (LD)*

Enzima intracelular, com localização no citosol. Possui actividade no músculo-esquelético e cardíaco, fígado, rim, cérebro e eritrócitos (Lumeij *et al.*, 1988a; Scope, 2011).

Não é específica de lesão hepática devido à ampla distribuição tecidual que apresenta. A sua actividade aumenta sobretudo em casos de doença hepática, mas também, devido a lesão muscular e, a isoenzima libertada pelo rim é excretada directamente pela urina, não contribuindo para um aumento plasmático (Lumeij *et al.*, 1988a).

Lesão hepatocelular aguda, doença crónica e redução da função hepática podem ou não contribuir para um aumento plasmático, assim como lesão no músculo-esquelético provocada por trauma, cirurgia ou injeção de fármacos irritantes (Fudge, 1997; Campbell, 2006b). Em animais com doença hepática a concentração plasmática média é três vezes o limite superior do intervalo de referência (Cray *et al.*, 2008).

Pelo contrário, diminuições no valor plasmático são raras, estando descritas em caso de doença hepática terminal em que ocorre substituição do hepatócito por tecido fibroso ou adiposo (Fudge, 1997).

Esta enzima tem tendência a aumentar e diminuir muito rapidamente (em horas) após lesão aguda, devido ao curto tempo de semi-vida em circulação (inferior a CK e AST), o que a torna mais sensível que as restantes enzimas, mas também lhe confere um valor clínico limitado. A LD apresenta como desvantagem o elevado intervalo entre valores de referência (Fudge, 1997; Campbell, 2006b; Scope, 2011).

#### *Gama glutamiltransferase (GGT)*

Enzima com localização na membrana celular. Em mamíferos a GGT reflecte a integridade do sistema biliar. Em aves tem actividade máxima no rim, cérebro e intestino, contudo, lesões nestes tecidos não promovem um aumento plasmático (Lumeij *et al.*, 1988a).

Está descrito o seu aumento em pombos com doença hepática experimentalmente induzida (Lumeij, 1994a), no entanto, em estudos realizados em animais com necrose e colestase hepática a actividade da GGT não aumentou significativamente, o que poderá indicar que a actividade plasmática desta enzima pode aumentar em algumas espécies de aves, dependendo da natureza da lesão, o que lhe confere fraco valor diagnóstico enquanto não forem realizados mais estudos (Campbell 2006b). Não é um teste de rotina devido à sua reduzida sensibilidade para diagnóstico de doença hepática (Scope, 2011).



### *Fosfatase alcalina (FA)*

Enzima com localização na membrana celular. Esta enzima é sintetizada no epitélio intestinal (duodeno), epitélio renal e osteoblastos e, em menor grau no fígado, cérebro e músculo esquelético (Lumeij *et al.*, 1988a; Scope, 2011).

Em mamíferos esta enzima tem particular interesse na detecção de doenças biliares e actividade osteoblástica. A actividade da FA em aves está ainda pouco estudada, mas parece não ter valor na detecção de doenças hepatobiliares. Estudos realizados em várias espécies em que foi induzida necrose hepática e hiperplasia do ducto biliar não detectaram aumentos significativos na FA plasmática (Fudge, 1997; Campbell, 2006b).

A actividade da FA parece ser induzida principalmente por um aumento na actividade celular (síntese) e, em menor grau em caso de lesão celular (Campbell, 2006b). O seu aumento está descrito em casos de crescimento esquelético (actividade osteoblástica), em fêmeas em pre-ovulação, em casos de hiperparatiroidismo nutricional secundário (actividade osteoblástica) e em menor grau em problemas ósseos como fracturas, tumores, e infecções (Campbell, 2006b; Scope, 2011).

### *Glutamato desidrogenase (GLD)*

Enzima intracelular, com localização na mitocôndria. Não é hepato-específica, pois tem actividade no fígado, rim e cérebro (Lumeij *et al.*, 1988a), porém, as isoenzimas provenientes das células do rim e cérebro não são encontradas no plasma, o que a torna o indicador mais específico de lesão hepática. No entanto, como está intimamente ligada à mitocôndria é libertada apenas quando ocorre lesão celular grave, o que a torna pouco sensível (Scope, 2011).

O grau de aumento na actividade desta enzima reflecte proporcionalmente a gravidade da lesão hepatocelular. À semelhança da LD, parece ter um tempo de semi vida curto, o que apresenta vantagens na determinação da gravidade da lesão e sua duração (Fudge, 1997; Campbell, 2006b; Scope, 2011). A maioria dos laboratórios não analisa rotineiramente esta enzima, e não foi possível determiná-la neste estudo.

### **ii) Creatina quinase (CK)**

Enzima intracelular com localização no citoplasma. É considerada músculo-específica, sendo encontrada principalmente no músculo-esquelético e, em menor quantidade no músculo cardíaco e cérebro, não estando presente no fígado (Scope, 2011).

Tem tempo de semi-vida inferior à AST e ALT, mas superior à LD, voltando a sua actividade aos valores basais em 72 horas após lesão muscular (Lumeij *et al.* 1988b; Scope, 2011). A sua determinação em conjunto com as restantes enzimas tem elevada importância para distinção entre lesão muscular e hepática (Lumeij *et al.*, 1988a; Fudge 1997; Scope, 2011).

Verifica-se um aumento desta enzima em caso de lesão do músculo esquelético por trauma ou cirurgia, manipulação incorrecta ou prolongada, stresse, excitação, administração intra-

muscular de substâncias irritantes, excesso de exercício, miopatia de captura, miopatia nutricional ou após episódios convulsivos (Campbell, 2006b). O aumento em caso de cardiomiopatias é raro (Fudge, 1997; Scope, 2011).

### **iii) Ácidos biliares (AB)**

Os ácidos biliares são indicadores de função hepática e também, indicadores mais específicos e sensíveis de doença hepática nas aves do que as enzimas hepáticas (Lumeij *et al.*, 1988b). São também indicadores sensíveis da integridade da circulação entero-hepática, tracto biliar e intestino (Fudge, 1997).

Este metabolito é sintetizado no fígado a partir do colesterol e excretado como sal biliar, apresentando um papel importante na digestão e absorção de gorduras. Os ácidos biliares primários - ácido quenodesoxicólico, ácido cólico e ácido alocólico – encontram-se armazenados na vesícula biliar e são libertados após ingestão de alimento. A maioria dos ácidos biliares excretados (90%), são reabsorvidos no intestino delgado, transportados pela veia porta e removidos do sangue pelos hepatócitos para serem reciclados no fígado (circulação entero-hepática). Uma pequena quantidade permanece em circulação no sangue periférico de animais saudáveis (Campbell, 2006b; Scope, 2011).

Está descrito um aumento pós-prandial em algumas espécies (Lumeij & Wolfswinkel, 1988; Lumeij & Remple, 1992). O aumento pode também ser artefactual, por lipémia ou hemólise, e em animais em jejum é sugestivo de *uptake* hepático anormal, armazenamento de ácidos biliares, excreção, ou perfusão hepática anormais, isto é, qualquer factor que interfira com o processo de reciclagem leva a um aumento na concentração plasmática de AB. Casos com doença hepática confirmada apresentam um valor médio da concentração de ácidos biliares três vezes e meia superior ao valor superior do intervalo de referência (Campbell, 2006b; Cray *et al.*, 2008; Scope, 2011).

Está descrita uma diminuição em casos com doença hepática crónica, fibrose hepática e obstrução biliar ou colestase aguda (Fudge, 1997; Cray *et al.*, 2008).

A concentração pós-prandial de ácidos biliares não tem variações significativas entre animais com e sem vesícula biliar (Lumeij & Remple, 1992). É recomendado um jejum de 12 horas para determinação do valor de ácidos biliares, ou 24 horas em aves carnívoras (Lumeij & Remple, 1992). Ainda assim, o tempo de esvaziamento do papo é muito variável de espécie para espécie e com a dieta. Os animais debilitados podem apresentar estase do trânsito gastro-intestinal, e pelo contrário o aumento da motilidade gastro-intestinal pode interferir com a libertação de ácidos biliares do fígado e absorção a nível do intestino (Campbell, 2006b).

#### **iv) Triglicéridos (TG)**

A determinação de triglicéridos plasmáticos apresenta fraco valor diagnóstico, pois a sua concentração pode ser influenciada por vários factores (Fudge, 1997).

Os triglicéridos representam a principal forma de energia e de armazenamento dos lípidos. São obtidos directamente da dieta, ou sintetizados na mucosa intestinal e no fígado, através dos componentes da digestão das gorduras. A sua presença no plasma é indicativa de transporte de lípidos para os tecidos periféricos (Fudge, 1997).

A hipertrigliceridémia está relacionada com jejum prolongado em animais obesos, administração de estrogénios, peritonite provocada pela ovopostura, hiperadrenocorticismismo ou após algum evento que promova a libertação de glicerol. Pelo contrário, em animais sujeitos a um curto período de jejum são esperados geralmente valores plasmáticos mais baixos (Fudge, 1997; Jenni-Eiermann & Jenni, 1998; Villegas *et al.*, 2004).

#### **v) Proteínas totais (PT)**

A concentração fisiológica de proteínas plasmáticas em aves é aproximadamente metade do valor em mamíferos. A fracção proteica inclui albuminas (proteína reservatório e transportadora de outras moléculas -aniões, catiões, ácidos gordos e hormona da tiróide) e globulinas (proteínas inflamatórias, proteínas de coagulação e imunoglobulinas). A concentração de proteínas plasmáticas em circulação é essencial para a manutenção da pressão osmótica coloidal, o que preserva o volume sanguíneo (previne extravasão de sanguínea) e o pH (efeito tampão) (Campbell, 2006b).

A determinação plasmática de proteínas totais constitui um complemento importante no diagnóstico e avaliação da natureza, gravidade e progressão de doença gastrointestinal, hepática, renal ou infecciosa (Scope, 2011).

Hiperproteïnemia está descrita em caso de desidratação (hiperalbuminémia e hiperglobulinémia), inflamação aguda (normoalbuminémia e hiperglobulinémia) ou crónica (hipoalbuminémia e hiperglobulinémia), como é o caso de clamidiose, aspergilose, tuberculose ou peritonite provocada por ovopostura (Campbell, 2006b). Fisiologicamente ocorre em fêmeas imediatamente antes da ovulação (aumento de vitelogenina e lipoproteínas necessárias para a produção do vitelo) (Campbell, 2006b).

Hipoproteïnemia está relacionada com uma má nutrição, alterações na absorção e digestão a nível do tracto gastrointestinal, lesões hepáticas graves (redução da produção proteica), e com doenças que promovam perda de proteína, nomeadamente, hemorragias, doença renal com proteinúria ou enteropatias com perda de proteína. A hiperhidratação na fluidoterapia pode levar a hipoproteïnemia aparente (Campbell, 2006b).

## vi) Glucose

As aves mantêm uma concentração plasmática de glucose bastante mais elevada do que os mamíferos (cerca do dobro), pois as elevadas exigências metabólicas para o vôo, exigem disponibilidade contínua de glucose (Campbell, 2006b).

A glucose plasmática é filtrada do sangue através do glomérulo renal e totalmente reabsorvida nos túbulos (Campbell 2006b).

Durante períodos curtos de jejum, a concentração plasmática de glucose é mantida pela glucogenólise hepática, não ocorrendo uma redução plasmática da utilização de glucose por unidade de peso vivo, tal como ocorre em mamíferos. As maiores perdas de energia estão associadas a depleção de gorduras e mobilização proteica, resultando estas em perda de peso que se reflecte na redução da massa dos músculos peitorais. A concentração plasmática de glucose permanece estável em curtos períodos de jejum, sendo mais estável em aves carnívoras, quando comparando com as granívoras (Campbell 2006b).

Em mamíferos, a insulina apresenta um papel essencial na homeostase da concentração plasmática de glucose. Em aves esse papel é realizado pelo glucagina pancreático. Esta ideia é apoiada pela abundância relativa de células  $\alpha$  no pâncreas de aves granívoras e menor rácio insulina/glucagina quando comparado com os mamíferos (Campbell, 2006b).

Nas aves granívoras os níveis de glucagina plasmático aumentam de 100 a 200% durante períodos de jejum de 24h-48h, sendo este aumento acompanhado do aumento de ácidos gordos livres, insulina e colecistoquinina. O aumento de glucose diminui a libertação de glucagina pancreático e estimula a libertação de insulina (Campbell 2006b). A pancreatectomia induz hipoglicémia em granívoras e diabetes mellitus em carnívoras, o que sugere que enquanto o glucagina predomina em aves granívoras, a insulina pode predominar em aves carnívoras (Harr, 2006).

Hiperglicémia está descrita em casos de diabetes *mellitus* (elevação grave e persistente  $>700$  mg/dL), apesar de ainda não ser totalmente conhecida a patogénese da doença, há evidências de que quer a glucaginémia quer a hipoinsulinémia possam ser responsáveis (Scope, 2011). Está também descrito um aumento da glucose em casos de stresse, esforço, excitação e temperaturas elevadas ou administração de glucocorticóides (aumento leve a moderado e transitório  $\leq 600$  mg/dL) (Campbell, 2006b). Krautwald-Junghanns (2007) relata ainda a sua presença em casos de intoxicação por chumbo e em alguns casos de peritonite com pancreatite associada.

Estudos em pombos que estiveram expostos a 72 horas de jejum, demonstram que foi induzida hiperglicémia transitória e não hipoglicémia (Lumeij, 1987). Este estudo aponta para a possibilidade de que, à excepção de aves jovens e com peso inferior a 100 gramas, o jejum pré-cirúrgico poder ser realizado sem complicações (Krautwald-Junghanns, 2007).

A ocorrência de hipoglicémia em aves está descrita como consequência de períodos prolongados de jejum, em particular em animais jovens, sendo as consequências

dependentes do tamanho do animal. Está também descrito em doença hepática grave (p.ex. Doença de Pacheco), neoplasia, septicémia, enterotoxémia e doença endócrina (hipotireoidismo) (Campbell, 2006b). Valores abaixo de 150 mg/dL são geralmente indicadores de mau prognóstico (Krautwald-Junghanns, 2007).

Um atraso na separação da fracção celular da fracção plasmática não vai provocar a diminuição do nível de glucose na amostra por glicólise, pois ao contrário dos mamíferos, os eritrócitos das aves consomem muito pouca glucose e dependem primariamente do metabolismo dos ácidos gordos para obtenção de energia (Campbell, 2006b).

#### **vii) Biliverdina e bilirrubina**

Em aves o pigmento biliar primário é a biliverdina, uma vez que a enzima biliverdina reductase está ausente e a biliverdina não é transformada em bilirrubina. Assim, de uma forma geral a bilirrubina não é detectada no plasma e, quando presente é por redução não específica (por bactérias ou enzimas extra hepáticas) e em muito pouca quantidade, sendo por isso um indicador fraco de doença hepatobiliar nas aves (Campbell, 2006b).

A biliverdina não se conjuga e não se acumula nos tecidos. Um rim saudável é eficaz na excreção dos pigmentos biliares, sendo que, uma coloração esverdeada da urina e uratos, é sugestiva de biliverdinúria e de doença hepática. A presença de biliverdinémia é indicada pela coloração esverdeada do plasma ou soro, o que reflecte doença hepatobiliar grave, sendo indicativo de mau prognóstico (Fudge, 1997; Campbell, 2006b).

A determinação da biliverdina não é realizada na maioria dos laboratórios, pois este é um pigmento instável e sensível à degradação pela luz. No entanto, importa referir que este pigmento é difícil de detectar, possivelmente devido ao rápido uptake hepático (Scope, 2011). A cor amarela do plasma em várias espécies aviárias pode estar associado aos pigmentos carotenóides da dieta e não deve ser mal interpretado como bilirrubinemia (Campbell, 2006b).

#### **2.3.3 Influências fisiológicas nos parâmetros bioquímicos plasmáticos das aves**

Tal como a análise dos parâmetros hematológicos, também a análise dos parâmetros bioquímicos fornece informação valiosa acerca do estado de saúde do animal, através de um método pouco invasivo. Porém, como referido anteriormente, para além da variação intra e inter-específica, experiência do operador, método e tipo de teste utilizado, existem ainda alterações (i) artefactuais, (ii) fisiológicas e (iii) patológicas que vão influenciar o resultado final, e é importante o conhecimento dessas alterações (Andreassen *et al.*, 1996; Fudge, 1997; Wernery *et al.*, 2004).

**i)** Os factores que mais frequentemente provocam alterações artefactuais são a hemólise, a lipémia, a contaminação da amostra e a adição imprópria de anticoagulante. Harr (2006) descreve que a presença de hemólise pode aumentar falsamente o valor de ALT, AST, LD,

CK, creatinina e cálcio e, reduzir o valor plasmático de TG. O valor de glucose, fósforo, FA e ácidos biliares podem variar consoante o processamento.

A interferência da lipémia está descrita na amostragem pós-prandial e em alguns tipos de doenças, devido a provocar a refração da luz, provocando erros na análise espectrofotométrica. A presença de lipémia aumenta falsamente as enzimas hepáticas, ácidos biliares, glucose, cálcio e fósforo e a medição de proteínas totais por refractometria (Harr, 2006).

A contaminação bacteriana da amostra interfere com a determinação do cálcio e da glucose e, a adição imprópria de anticoagulante pode estar relacionada com a diluição da amostra que promove um aumento da glucose, ou com a adição do anticoagulante inapropriado, como é o caso do EDTA que vai provocar um aumento artefactual do cálcio (Fudge, 1997).

ii) Tendo em conta que os parâmetros variam consoante o indivíduo, neste tópico importa inferir acerca da influência de factores fisiológicos como a idade, sexo, estação do ano, ritmo circadiano, efeito da migração e localização geográfica, que podem afectar a concentração em que estão presentes os metabolitos plasmáticos.

Existem vários estudos realizados em diversas espécies que descrevem a flutuação da actividade de determinado metabolito com a idade. Relativamente aos parâmetros associados ao crescimento está descrito uma diminuição do fósforo e da FA com a idade, pois os jovens apresentam uma maior actividade osteoblástica (Alonso-Alvarez, 2005; Lanzarot *et al.*, 2005; Hernandez & Margalida, 2010; Scope, 2011), pelo contrário o cálcio plasmático encontra-se mais elevado em adultos (Viñuela *et al.*, 1991; citado por Villegas, Sánchez, Cotillo & Corbacho, 2002; Balley *et al.*, 1999; Krautwald-Junghanns, 2007). No entanto, Hernández e Margalida (2010) não encontram alteração no valor de cálcio com o crescimento e Lanzarot *et al.* (2005) obtêm valores mais baixos de cálcio em jovens.

Balley *et al.* (1999) descreve também uma diminuição da glucose e LD com a idade e um aumento nas PT, CK, AST e ALT, não ocorrendo alterações no AU. Lanzarot *et al.* (2005) descreve ainda um aumento da creatinina com a idade. Hochleithner (1994) justifica o aumento das PT com a idade, pela influência do desenvolvimento do organismo neste parâmetro.

Hernandez & Margalida, (2010) obtêm ainda no seu estudo uma redução no valor de TG com a idade, e ao contrário do estudo anterior uma diminuição do ácido úrico e na CK, mantendo-se o valor de glucose e creatinina constantes. Afirmando ainda que no caso do AU, ureia e TG essas alterações deverão ter como causa a variação nos períodos de jejum.

Prinzinger e Misovic (2010) realizaram um estudo em pombos para avaliar a alteração de parâmetros em pacientes geriátricos. Dos parâmetros estudados, os parâmetros que se alteraram com a idade nestes pacientes foram a glucose e a LD, sendo que a glucose demonstrou um aumento contínuo até aos 9 anos e a partir dos 10 anos ocorre uma

diminuição até aos 14 anos, e a LD diminui até aos 4 anos de idade e mantendo-se posteriormente constante até aos 14 anos.

Em relação à influência do sexo e estado reprodutivo nos parâmetros bioquímicos existem menos estudos realizados, devido a existirem muitas espécies que não apresentam dimorfismo sexual e a sua diferenciação na natureza ser impossível. Lanzasote *et al.* (2005) obtêm no seu estudo um valor de PT, TG e FA mais elevado em fêmeas quando comparando com os machos. Pelo contrário Dutton *et al.*, (2002) obtêm um valor de FA superior em machos e Alonso-Alvarez (2005) obtêm um valor de PT superior em machos.

Krautwald-Junghanns (2007) descreve um aumento de FA em fêmeas em ovulação, coincidindo também com um aumento do fósforo e do cálcio em complexos com proteínas vitelogénicas, induzido pelo estrogénio, para a formação da casca do ovo, mantendo-se constante o cálcio ionizado (Scope, 2011). Em algumas espécies está descrito a presença de valores mais elevados deste metabolito em fêmeas em relação aos machos.

O tipo de dieta também influencia determinados factores, nomeadamente o ácido úrico e ureia, cujas espécies granívoras apresentam em geral valores 50% mais baixos que as espécies carnívoras, pelo contrário, o fósforo apresenta valores mais elevados em granívoras (Krautwald-Junghanns, 2007). Está descrito um aumento pós-prandial dos AB, AU, ureia e TG, sendo aconselhado um jejum de 12 horas ou 24 horas no caso de animais carnívoros para evitar a influência deste factor nos resultados (Spagnolo *et al.*, 2008).

Em relação ao ritmo circadiano, está descrita a sua influência no valor de glucose, que se encontra reduzida durante o dia e aumentada durante a noite em aves diurnas e o contrário em aves nocturnas, no entanto, esta variação é insignificante em animais saudáveis (Campbell, 2006b).

Estão também descritas as variações sazonais de ALT, AST, FA e LD (Hochleithner, 1994; Krautwald-Junghanns, 2007; Scope, 2011).

O stresse influencia em especial o valor de glucose, produzindo um aumento neste parâmetro (Campbell, 2006b; Krautwald-Junghanns, 2007). O stresse da temperatura (hipotermia ou hipertermia) está associado a perdas de nitrogénio, aumentando a actividade adrenal e a mobilização proteica, resultando em diminuição no valor de PT (Hochleithner, 1994).

iii) Assumindo que não há alterações na qualidade do plasma (hemólise, lipémia, contaminação bacteriana) e que não há influência dos parâmetros fisiológicos, pode ser realizada uma interpretação dos parâmetros do perfil hepático de modo a auxiliar no diagnóstico clínico, como está apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Interpretação clínica da combinação dos parâmetros do perfil hepático.

(Adaptado de Fudge, 1997; Lumeij *et al.*, 1988a; Wernery *et al.*, 2004; Cray *et al.*, 2008).

<b>Perfil hepático</b>	<b>Possível diagnóstico clínico</b>
Normal: <b>CK, LD, AST, GLD</b>	<b>Sem evidência de lesão muscular ou hepática.</b> Não permite tirar conclusões acerca da função hepática, apenas que não há lesão em curso.
Normal: <b>GLD</b> ; Elevado: <b>CK, LD, AST</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão do músculo esquelético ou cardíaco.</b>
Normal: <b>AST, CK, GLD</b> ; Elevado: <b>LD</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão hepática ou muscular aguda.</b> Não é possível determinar a causa da elevação da LD, é necessário repetir análises.
Normal: <b>AST, GLD</b> ; Moderadamente elevado: <b>CK</b> ; Elevado: <b>LD</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão do músculo esquelético ou cardíaco,</b> com início em menos de 24 horas da altura da colheita da amostra.
Normal: <b>LD, GLD</b> ; Moderadamente elevado: <b>AST</b> ; Elevado: <b>CK</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão do músculo esquelético ou cardíaco,</b> após 48 a 72 horas após causa.
Normal: <b>LD, CK, GLD</b> ; Elevado: <b>AST</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão do músculo esquelético ou cardíaco,</b> que ocorreu e cessou há 2 a 4 dias, ou; <b>Muito provavelmente lesão hepática.</b>
Normal: <b>CK, GLD</b> ; Elevado: <b>LD, AST</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão hepatocelular ligeira a moderada.</b>
Normal: <b>CK</b> ; Elevado: <b>LD, AST, GLD</b> ;	<b>Perfil sugestivo de lesão hepatocelular grave.</b>



# DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

## 1. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho foi obter valores hematológicos (Ht, TRBC, TTC, TWBC, contagem diferencial de leucócitos) e bioquímicos sanguíneos (AB, PT, glucose, TG, ALT, AST, LD, GGT, FA, CK, AU, creatinina, cálcio e fósforo) em indivíduos jovens e em estado selvagem, da espécie *Ciconia ciconia*, com idade compreendida entre 20 e 70 dias. Tendo também como objectivo estudar a influência do factor idade e período de jejum nos resultados obtidos.

Este trabalho teve ainda como objectivo o estudar a morfologia celular sanguínea desta espécie a pesquisar hemoparasitas, com o intuito de determinar a prevalência destes em cegonha-branca.

Adicionalmente pretendeu-se efectuar uma comparação entre o método do refractómetro e do biureto para a determinação de proteínas totais e entre a determinação da contagem total de leucocitos pelo método directo e estimativo.

Por fim foi realizada uma comparação com estudos encontrados na literatura, com o objectivo de reforçar ou contrariar os valores obtidos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Amostra

No presente estudo foram analisadas 77 amostras sanguíneas de jovens da espécie cegonha-branca (*Ciconia ciconia*). Os indivíduos, pertencentes a colónias nidificantes na Comunidade de Madrid, ingressaram no hospital de fauna selvagem do GREFA (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O, Madrid, Espanha) na Primavera de 2011, entre Maio e Junho, devido a uma campanha de destruição de ninhos instalados em postes de electricidade, no *Parque do Sureste* (n=60), ou por captura por parte de particulares após tentativas para iniciar o vôo, sendo a grande maioria destas da colónia de *Alcalá de Henares* (n=17).

#### 2.1.1 Critérios de inclusão

Os animais incluídos neste estudo, foram considerados aparentemente saudáveis após terem sido sujeitos a um exame físico. O sexo de cada indivíduo é desconhecido devido a não haver dimorfismo sexual nesta espécie e, não foi realizada sexagem.

A idade expectável dos indivíduos encontrava-se entre os 20 e os 70 dias. Os animais foram distribuídos por três grupos, consoante o seu peso, e foi realizada uma associação com a idade, uma vez que só foram incluídos no estudo indivíduos que apresentaram uma boa condição corporal ao exame físico.

Os animais incluídos no grupo A são os mais jovens e pesam entre 1000 e 2000 gramas, no

grupo B estão incluídos os indivíduos com peso compreendido entre 2000 e 3000 gramas, e no grupo C estão incluídos os indivíduos mais velhos com peso superior a 3000 gramas, bastante aproximado do peso de um adulto.

Dentro do grupo A, foram considerados dois subgrupos: A1 (n=9) e A2 (n=9). No A1 estão incluídos os animais aos quais foi realizada a colheita de sangue assim que ingressaram no centro, não havendo conhecimento do horário da última refeição. No A2 estão incluídos animais que foram excluídos do estudo à altura do exame físico, tendo permanecido uns dias em cativeiro.

O grupo B foi também subdividido em B1 (n=29) e B2 (n=13). No subgrupo B1 estão incluídos indivíduos aos quais foi realizada a colheita de sangue assim que ingressaram no centro, não havendo conhecimento do horário da última refeição. No subgrupo B2 estão incluídos animais com as mesmas características de A2, mas à data da pesagem e colheita de sangue apresentavam um peso superior.

Os animais do grupo A2 e B2 foram alimentados com pintos congelados, durante o período de cativeiro. Antes de serem libertados foram pesados e foi realizada a colheita de sangue no período da manhã, apresentando estes indivíduos um jejum de cerca de 12 horas.

Os animais incluídos no grupo C foram considerados saudáveis após exame físico realizado no dia de entrada, tendo permanecido numa instalação do hospital em observação, até ao período da manhã do dia seguinte, altura em que foi realizada a colheita de sangue, apresentando estes animais um período de jejum de cerca de 12-24 horas. A caracterização da amostra encontra-se sintetizada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização da amostra

Grupos	Subgrupos	n=77	Peso (gr)	Período de Jejum	Permanência em Cativeiro
A	A1	9	1000 - 2000	?	0 dias
	A2	9	1000 - 2000	≈12h	Dias a Semanas
B	B1	29	2000 - 3000	?	0 dias
	B2	13	2000 - 3000	≈12h	Dias a Semanas
C	C	17	>3000	≈12-24h	12-24 horas

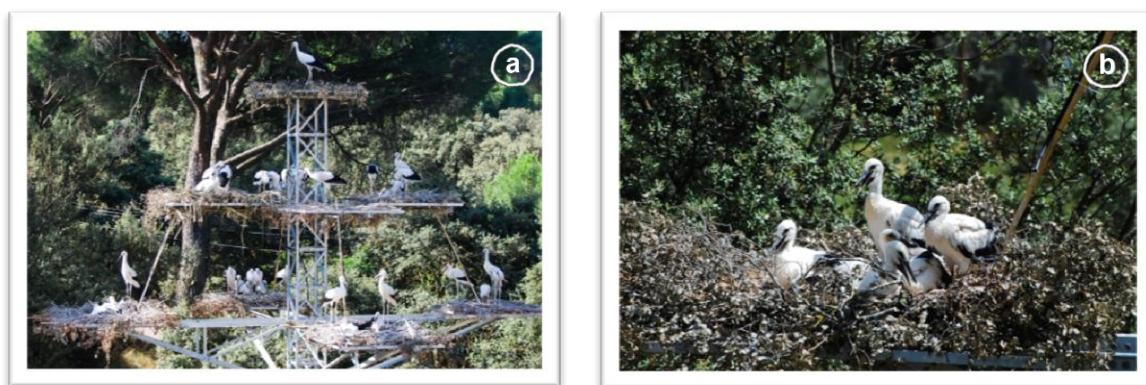
Todos os animais foram libertados posteriormente em Sistema de *Hacking*, este é um método de libertação bastante utilizado, em especial em aves de rapina. Este método consiste na construção de ninhos artificiais, semelhantes aos utilizados na natureza pela espécie e em locais adequados à espécie. As crias são anilhadas, colocadas nos ninhos e o alimento é providenciado, por um método que não seja possível de ser associado ao Homem, até que estejam aptas a voar. Nesta altura a quantidade de alimento é reduzida para estimular a caça do próprio alimento (Raptor Rescue, 2010). Neste caso a Companhia Rede Eléctrica financiou a construção de uma estrutura nas instalações do GREFA (Fig.2).

### 2.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos que deram entrada no hospital desidratados, com fracturas patológicas ou com impactação gastrointestinal, tendo estes permanecido nas instalações da enfermaria para serem submetidos ao tratamento adequado. Estes indivíduos foram sujeitos a colheita de sangue quando a sua condição o permitiu.

Foram ainda excluídos do estudo indivíduos muito jovens (<20 dias), que permaneceram alguns dias nas instalações do departamento dos orfãos ou de reabilitação até atingirem uma idade em que poderiam ser colocados em ninhos artificiais, altura em que foi realizada a colheita de sangue.

**Figura 2.** Sistema de *Hacking* (fotografias originais).  
(a) estrutura e (b) plataforma.



### 2.2 Exame físico

Os animais foram capturados e transportados para o Hospital do centro de recuperação pela equipa de resgate, em caixas de transporte. Antes de serem retirados da caixa o seu comportamento foi observado, facto pouco relevante em crias de cegonha, devido à sua fraca responsividade aos estímulos (Figura 3) (Blas *et al.*, 2006).

Foram também observadas as fezes nas caixas transportadoras. A sua aparência era normal, no entanto, não se procedeu à colheita para realização de análises coprológicas.

**Figura 3.** Postura das crias após captura (fotografia original).



Os animais foram retirados da transportadora com o auxílio de uma toalha e a cabeça foi tapada para limitar a visão e diminuir o stresse. Todo o proceso foi realizado em silêncio, a contenção foi manual e o tempo de contenção foi reduzido ao mínimo.

Todos os individuos foram sujeitos a um procedimento sistemático. O animal foi pesado e posteriormente colocado em decúbito ventral. Foi medida a temperatura e realizada a colheita de sangue para minimizar a influência do factor stresse nos resultados. A cabeça foi o primeiro órgão a ser examinado, prestando especial atenção, ao bico, coanas, olhos e ouvidos, seguido do pescoço e papo, asas, corpo, cauda e membros posteriores. O exame físico foi realizado tendo em conta os problemas mais comuns aos jovens de cegonha-branca, nomeadamente problemas nutricionais que levam a fracturas patológicas, impactação gastrointestinal, desidratação, sendo que a amostra sanguínea dos animais que não foram considerados saudáveis ao exame físico foram excluídas.

### **2.3 Colheita das amostras de sangue**

O sangue foi colhido da veia ulnar superficial ou da veia metatarsal medial, consoante o operador, com uma agulha (Pic indolor®, Artsana) de 23 *gauge* acoplada a uma seringa (Pic indolor®, Artsana) de 2,5 ml. Após colheita foi colocada uma gota de sangue numa lâmina para realização de um esfregaço por esgotamento, foram preenchidos  $\frac{3}{4}$  (aproximadamente 70µl) de um tubo de microhematócrito heparinizado (code 7301, Deltalab S.L., Barcelona, Spain) e 1 ml de sangue foi colocado num tubo com heparina lítio (K3E 1 mL microtubo, Tapval Aquisel®, Barcelona, Spain) para posteriores análises bioquímicas. Em 7 indivíduos foi retirada uma menor porção de sangue, não sendo possível a realização de todos os parâmetros bioquímicos. Em alguns indivíduos (n=20) em que foi retirada uma maior quantidade de sangue essa foi colocada em tubos com EDTA (K3E 0,5 mL microtubo, Tapval Aquisel®, Barcelona, Spain) para contagem total de eritrócitos e leucócitos.

O esfregaço foi realizado imediatamente após colheita de sangue e colocado em local protegido para secar ao ar. O hematócrito foi também processado imediatamente, o sangue em EDTA foi conservado a 4°C e processado em 24-48h e o sangue em heparina lítio foi imediatamente centrifugado, separado o plasma, e este último foi congelado a -20°C.

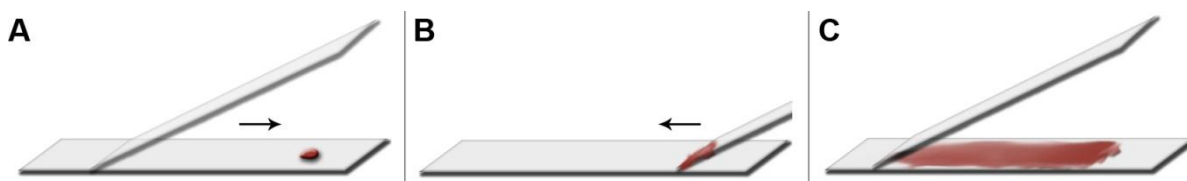
### **2.4 Análises laboratoriais hematológicas**

As técnicas utilizadas para realização do hemograma estão descritas por vários autores (Campbell, 1995a; Pendl & Samour, 2009; Pendl, 2011b). Não foi possível a determinação de todos os parâmetros na totalidade dos indivíduos, devido à amostra sanguínea insuficiente. As análises hematológicas realizadas incluem hematócrito (n=77), contagem total de eritrócitos (n=20), contagem total de leucócitos pelo método directo (n=20), e pelo método estimativo (n=51), contagem diferencial de leucócitos (n=51) e contagem total de trombócitos (n=51).

#### 2.4.1 Preparação, fixação e coloração do esfregaço sanguíneo

O esfregaço sanguíneo foi realizado a partir de sangue total, sem adição de anticoagulante. Foi utilizada a técnica por esgotamento ou técnica do esfregaço em cunha (Figura 4) e para o efeito foram utilizadas duas lâminas de bordos em bisel (Starfrost®, Microscope slides, Waldermar Knittel Glasbearbeitungs - GmbH, Braunschweig, D-38114, Germany) para minimizar a ruptura celular, e sem irregularidades. Foi colocada uma pequena gota de sangue em uma das extremidades de uma lâmina bem limpa, e com uma segunda lâmina foi efectuada a extensão do esfregaço. Esta última foi colocada num ângulo de 45° e desliza inicialmente para trás, para que ocorra distribuição do sangue por todo o bordo da lâmina, e depois gentilmente para a frente num movimento lento, firme e contínuo, de modo a criar um esfregaço homogêneo (Samour, 2006). Este foi posteriormente seco ao ar e colocado em local protegido até realização da coloração. A coloração utilizada foi a de Wright Giemsa modificada por Samour (2002), segundo Pendl (2011b) (Tabela 19 – Anexo V) e, foi efectuada uma montagem definitiva entre lâmina e lamela, quando totalmente seco.

**Figura 4.** Sequência exemplificativa da técnica de esfregaço por esgotamento (original).

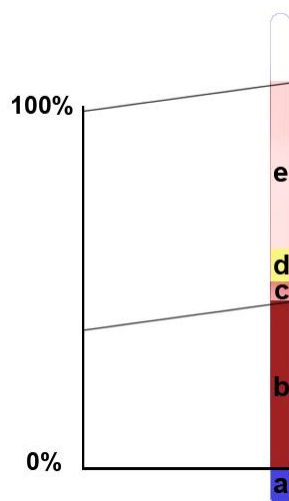


#### 2.4.2 Hematócrito

Os tubos capilares de microhematócrito foram imediatamente centrifugados numa microcentrífuga (Modelo Biocen 20, Ortoalresa®, Ajalvir, Espanhaa) a 12,000G durante 5 minutos, para obtenção da diferenciação celular descrita no Capítulo 2. Após centrifugação foi realizada a leitura do hematócrito, recorrendo a uma escala em que se fez coincidir a linha de separação entre o material vedante e o início da camada eritróide com o zero da escala e o final da camada plasmática com o 100 da escala, obtendo assim a percentagem de eritrócitos (Figura 5). Após a leitura do hematócrito, os tubos foram partidos pela separação entre a camada celular e plasmática e foi determinada a concentração de proteínas totais através de um refractómetro portátil (Schuco, 5711-2020, Clinical Refractometer, Japan).

**Figura 5.** Tubo de microhematócrito e escala de leitura (original).

(a) substância vedante; (b) camada eritróide; (c) camada flogística; (d) fibrinogénio; (e) camada plasmática; (b)+(c)=PCV.



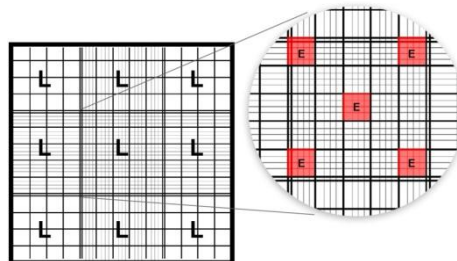
### 2.4.3 Métodos de contagem celular

A contagem total de eritrócitos e de leucócitos foi realizada em 20 animais num hemocítometro - câmara de *Neubauer Improved* (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG, refª 717820), segundo Pendl e Samour (2009). Foram diluídas (1:200) alíquotas da amostra sanguínea com a solução de Natt and Herrick's (Anexo VI) numa pipeta hematológica de *Thoma* (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG), utilizando um auxiliar de micropipetagem (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG, Postfach 1155, D-97861 Wertheim, Cat. NO 25 800). Após homogeneizar a mistura, foram colocadas umas gotas no hemocítometro e realizada a contagem num microscópio óptico binocular (BM-100B Ventix®, S/N 120624) a uma ampliação de 400x (objectiva seca de 40x), e desta preparação foram realizadas ambas as contagens.

A contagem total de eritrócitos foi efectuada nos cinco quadrados vermelhos apresentados na Figura 6, pertencentes ao quadrado central grande da câmara e, aplicando a “Regra do L”. O valor obtido foi multiplicado por 10000, de modo a obter o número de eritrócitos por microlitro de sangue (Pendl & Samour, 2009). A contagem total de leucócitos foi efectuada nos nove quadrados grandes (Figura 6), aplicando também a “Regra do L”, e o valor final foi obtido utilizando a seguinte fórmula, em que 1,1 corresponde a um factor de correcção e 200 à diluição:

$$\text{TWBC (Leucócitos}/\mu\text{L)} = \text{Número de leucócitos nos 9 quadrados} \times 1.1 \times 200$$

**Figura 6.** Contagem manual total de eritrócitos e leucócitos em câmara de *Neubauer*, aplicando a “Regra do L” (original).



“Regra do L” – Sistema de contagem das células, no qual, as células que tocam a linha superior ou esquerda do quadrado são contadas. As células que tocam a linha inferior ou a linha direita não são contadas. O objectivo desta técnica é evitar a dupla contagem das células.

Todos os esfregaços foram sujeitos a uma pré-visualização, realizando um varrimento bordo-centro-bordo, para avaliação da técnica e observação da morfologia celular. Nesta fase foram excluídos 26 esfregaços, pela presença de agregados trombocitários e leucocitários que tornaram inviável a contagem destas células (Pendl & Samour, 2009).

Foram então observados 51 esfregaços e realizada a contagem estimativa total e diferencial de leucócitos, a contagem estimativa total de trombócitos e a pesquisa de hemoparasitas. Não foi realizada a contagem de eritrócitos imaturos ou a diferenciação entre linfócitos grande e pequenos, e caracterização da toxicidade celular. Todos os esfregaços foram analisados ao microscópio óptico binocular, seguindo o procedimento:

i) Varrimento a uma ampliação de 40x (objectiva seca de 4x), para observação da distribuição celular e possível existência de hemoparasitas;

ii) Contagem estimativa total de leucócitos a uma ampliação de 400x (objectiva seca de 40x), contando o número total de leucócitos em 10 campos em monocamada seguindo o método bordo-centro-bordo e aplicando a seguinte fórmula (Doneley, 2010):

$$\text{TWBC (Leucócitos}/\mu\text{L)} = \frac{\text{Número de leucócitos em 10 campos}}{10} \times 2\,000$$

iii) Contagem estimativa total de trombócitos a uma ampliação de 1000x (objectiva de imersão de 100x), em 5 campos em monocamada, seguindo o método bordo-centro-bordo e aplicando a fórmula descrita. Em que 1000 corresponde à média do número de eritrócitos em cinco campos de monocamada com a objectiva de imersão e 3.500.000 corresponde ao número médio de eritrócitos por microlitro em aves com Ht normal (Campbell, 1995):

$$\text{TTC (Trombócitos}/\mu\text{L)} = \frac{\text{Número de trombócitos em 5 campos} \div 5}{1\,000} \times 3\,500\,000$$

iv) Contagem estimativa diferencial de leucócitos a uma ampliação de 1000x (objectiva de imersão de 100x), utilizando um contador de células manual (Meteor, model CLM-2, ca.NO 91003). Foi realizada a contagem de 100 células, sendo estas classificadas de acordo com a sua morfologia, como detalhado no Capítulo 2, em heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (Pendl, 2011). Uma vez estabelecida a percentagem de cada tipo celular, foi calculada a sua frequência relativa utilizando a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células do grupo celular Y (Células}/\mu\text{l}) = \frac{\% \text{ de células do grupo celular Y} \times \text{TWBC(esfregaço)}}{100}$$

v) Varrimento do esfregaço a uma ampliação de 1000x (objectiva de imersão de 100x) a partir do centro até ao último terço para pesquisa da presença de hemoparasitas.

## 2.5 Análise laboratorial bioquímica

As amostras sanguíneas foram centrifugadas (Modelo Unicen, Ortoalresa ®, Ajalvir, Espanha) num período máximo de 12 horas, para evitar alterações artefactuais, a 3000 rpm durante 10 minutos. O plasma foi retirado com uma micropipeta (Eppendorf Reference ®, 100µL) para um eppendorf e devidamente identificado e congelado a -20°C, até a realização da análise, por um período máximo de dois meses.

À data de realização da análise as amostras foram colocadas a 4°C e quando no estado líquido foram homogeneizadas e colocadas em eppendorfs com o auxílio de uma micropipeta. Diariamente era realizada uma calibração com calibrador humano (Spinreact®, Spintrol H CAL, refª 1002011, Sant Esteve de Bas, Spain) e uma análise com soro controle bovino (Spinreact®, Spintrol Normal, refª 1002100, Sant Esteve de Bas, Spain).

As análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria, através do aparelho Cobas Mira (Roche Diagnostics®, Serie Nr.22-1392, Switzerland). Todos os testes foram conduzidos a uma temperatura constante de 37°C. Os parâmetros medidos foram o ácido úrico (n=77), creatinina (n=77), cálcio (n=77), fósforo (n=77) fosfatase alcalina (n=77), AST (n=73), ALT (n=76), LD (n=74), GGT (n=73), CK (n=76), ácidos biliares (n=75), glucose (n=77), proteínas totais (n=77) e triglicéridos (n=76), sendo os primeiros cinco essencialmente para análise renal e os restantes para análise hepática. A escolha dos parâmetros foi realizada tendo por base a literatura e também questões económicas. Na Anexo VII (Tabela 20) estão identificados os testes utilizados para cada parâmetro.



## 2.6 Análise estatística

A análise dos dados obtidos no presente estudo foi realizada por meio de estatística descritiva e indutiva. A estatística descritiva foi utilizada para descrever dados quantitativos, quanto aos seus indicadores estatísticos – média ou mediana e desvio padrão, valor mínimo e máximo. A estatística indutiva permitiu tirar conclusões através da aplicação de testes paramétricos e não paramétricos.

A análise estatística foi conduzida utilizando o programa R 2.13.1 (R Development Core Team, 2011). Em todos os testes foi considerado um intervalo de confiança de 95% e conseqüentemente, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0.05$ .

Foram comparadas as médias de cada parâmetro dentro dos três grupos A, B e C, para determinar a relação da sua variação com a idade da amostra, recorrendo-se a uma análise de variância, de acordo com o teste ANOVA univariada e teste à *posteriori* de Tukey. Para avaliar a influência do jejum nos parâmetros bioquímicos, foram comparadas as medianas de A1 e A2, e de B1 e B2 de cada parâmetro bioquímico, com o teste de Wilcoxon, escolhido pela pequena dimensão da amostra.

Foi realizado um teste t de Student emparelhado para comparar os valores obtidos na determinação de proteínas totais pelo método do biureto e por refractometria, com intuito de perceber se há de facto diferenças significativas entre os dois métodos.

Para determinar a relação entre os valores obtidos na contagem total de leucócitos (TWBC) pelo método directo e pelo método estimativo, foi utilizado o teste Wilcoxon emparelhado, devido ao reduzido número da amostra.

Por último, recorreu-se à correlação de Pearson para determinar a existência de interligação entre os valores obtidos pelos dois testes, para cada indivíduo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nestes Capítulos irão ser apresentados e discutidos simultaneamente os resultados obtidos no trabalho experimental, de modo a facilitar a compreensão dos mesmos.

Os resultados obtidos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em estudo foram comparados com valores obtidos nos quatro artigos de cegonha-branca encontrados na literatura (Puerta *et al.*, 1989; Alonso *et al.*, 1991; Montesinos *et al.*, 1997; Jerzak *et al.*, 2010), e com os dados descritos no ISIS (2002) (Tabela 21 e 22- Anexo VIII). Foram também comparados com outras espécies pertencentes à ordem Ciconiformes e com outras espécies pertencentes a outras ordens. Todos os resultados estão apresentados na Unidade Convencional.

### 1. Parâmetros e características hematológicas

Os valores de hematócrito, TRBC, TTC, TWBC e contagem diferencial de leucócitos obtidos para a totalidade da amostra, encontram-se apresentados na Tabela 3, de acordo com a sua média, desvio padrão, valor mínimo e máximo. Os valores obtidos para os mesmos parâmetros nos grupos A, B e C encontram-se na Tabela 4, juntamente com o valor de p para ANOVA univariada.

**Tabela 3.** Valores hematológicos obtidos para a totalidade da amostra.

Parâmetros Hematológicos	Unidades	n	Amostra Total	
			$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo
Hematócrito	%	77	31.64 $\pm$ 4.29	24.00 - 45.00
TRBC	$\times 10^6$ células/ $\mu$ l	20	1.77 $\pm$ 0.37	1.28 - 2.37
TTC	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	23.53 $\pm$ 5.06	11.90 - 37.80
TWBC – Método Directo	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	20	13.15 $\pm$ 4.97	7.70 - 30.36
TWBC – Esfregaço	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	17.68 $\pm$ 6.40	9.40 - 35.80
Heterófilos	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	9.32 $\pm$ 4.51	3.25 - 22.45
Eosinófilos	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	1.09 $\pm$ 0.81	0.09 - 4.65
Basófilos	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	0.11 $\pm$ 0.18	0.00 - 0.82
Linfócitos	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	6.83 $\pm$ 2.75	3.36 - 15.05
Monócitos	$\times 10^3$ células/ $\mu$ l	51	0.36 $\pm$ 0.27	0.00 - 1.34

**Tabela 4.** Valores hematológicos obtidos para a os Grupos A, B e C.

Parâmetros Hematológicos	Unidades	Grupo A			Grupo B			Grupo C			p
		n	$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	n	$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	n	$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	
<b>Hematócrito</b>	%	18	30.89 ± 2.08	26.00 – 34.00	2	29.70 ± 3.16	24.00 – 38.00	17	37.22 ± 3.70	29.50 - 45.00	<0.01*
<b>TRBC</b>	x10 <sup>6</sup> células/μl	1	(2.37)	-	9	1.66 ± 0.30	1.34 - 2.36	10	1.82 ± 0.39	1.28 - 2.34	0.17
<b>TTC</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	23.86 ± 6.43	11.90 – 37.80	24	24.20 ± 4.94	13.30 – 32.20	15	22.21 ± 4.00	16.10 – 31.50	0.49
<b>TWBC – Método Directo</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	1	(19.01)	-	9	14.13 ± 6.76	7.70 – 30.36	10	11.68 ± 2.11	7.70 - 13.42	0.28
<b>TWBC – Esfregaço</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	20.03 ± 4.40	13.60 – 26.00	24	18.18 ± 6.13	10.80 – 33.50	15	14.99 ± 7.50	9.40 – 35.80	0.11
<b>Heterófilos</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	9.38 ± 3.25	5.71 - 15.86	24	10.38 ± 4.84	3.25 – 22.45	15	7.57 ± 4.40	3.42 – 21.12	0.167
<b>Eosinófilos</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	1.27 ± 0.82	0.19 - 2.79	24	1.14 ± 0.58	0.14 - 2.39	15	0.87 ± 1.09	0.10 - 4.65	0.43
<b>Basófilos</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	0.13 ± 0.20	0.00 – 0.54	24	0.09 ± 0.18	0.00 – 0.82	15	0.15 ± 0.15	0.00 – 0.54	0.53
<b>Linfócitos</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	8.82 ± 3.01	4.67 - 15.05	24	6.35 ± 2.40	3.36 - 14.30	15	6.01 ± 2.44	3.53 – 12.04	<0.05**
<b>Monócitos</b>	x10 <sup>3</sup> células/μl	12	0.41 ± 0.35	0.00 – 1.12	24	0.33 ± 0.19	0.00 – 0.81	15	0.39 ± 0.32	0.10 -1.34	0.65

\*- Indica diferença estatisticamente significativa em p<0.01, de acordo com o teste ANOVA univariada.

\*\* - Indica diferença estatisticamente significativa em p<0.05, de acordo com o teste ANOVA univariada.

## 1.1 Hematócrito

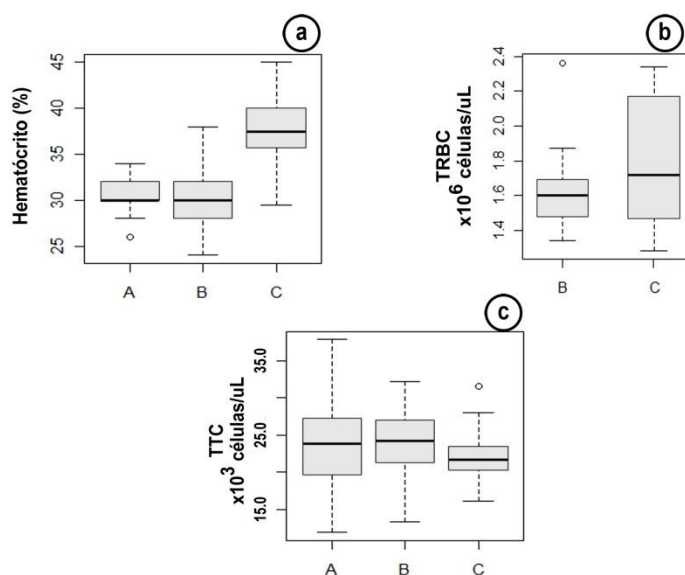
O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de 24.00-45.00% (Tabela 3), sendo o limite inferior do intervalo mais baixo do que o mencionado por Pendl (2011b) para a classe das aves em geral (35.00-55.00%).

Quando comparando o intervalo médio de valores obtido nos diferentes grupos, o valor do hematócrito é significativamente mais elevado ( $p < 0.01$ ) nos indivíduos do grupo C ( $37.22 \pm 3.70\%$ ), em relação os indivíduos do grupo A e B ( $30.89 \pm 2.08$  e  $29.70 \pm 3.16\%$ , respectivamente) (Tabela 4). No Gráfico 5(a) é possível observar a distribuição ordenada dos valores por grupos, sendo o valor aberrante observado num indivíduo do grupo A, pertencente provavelmente a um animal mais jovem.

Este aumento de hematócrito em função da idade é justificado por um aumento da taxa de eritropoiese ao longo do crescimento (Fair *et al.*, 2007) devido a uma maior necessidade em oxigênio da parte das aves do grupo C, que estão a iniciar a adaptação ao vôo, o que exige um elevado esforço físico (Dujowich *et al.*, 2005). Os valores de hematócrito dos animais do grupo C encontram-se mais próximos dos valores observados em animais adultos ( $44.1 \pm 1.3\%$ ) desta espécie por Alonso *et al.*, (1991), sendo este valor atingido por volta dos 80 a 90 dias (Montesinos *et al.*, 1997).

Este aumento do hematócrito com a idade foi já observado em trabalhos realizados em cegonha-branca, sendo os valores obtidos bastante aproximados (Puerta *et al.*, 1989; Montesinos *et al.*, 1997; Jerzak *et al.*, 2010) em cegonha-preta (Lanzarot *et al.*, 2005) e em outras espécies, nomeadamente abutre preto e quebra-ossos (Villegas *et al.*, 2002; Hernández & Margalida, 2010).

**Gráfico 5.** Distribuição ordenada dos valores de (a) hematócrito, (b) TRBC, (c) TTC, nos grupos A, B e C.



## 1.2 Contagem total de eritrócitos (TRBC)

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $1.28-2.37 \times 10^6$  células/ $\mu\text{l}$  (Tabela 3), sendo este aproximado do limite inferior mencionado por Pendl (2011b) para a classe das aves em geral ( $2.00 - 4.00 \times 10^6$  células/ $\mu\text{l}$ ), visto tratarem-se de animais jovens.

O grupo A foi excluído da comparação entre grupos, por ser constituído apenas por um indivíduo. Quando comparando o intervalo médio de valores obtido nos diferentes grupos, o valor de TRBC não se mostrou significativamente ( $p=0.17$ ) diferente no grupo B e C ( $1.66\pm 0.30$  e  $1.82\pm 0.39 \times 10^6$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente) (Tabela 4). No entanto é possível observar uma tendência para um aumento na contagem total de eritrócitos, em função da idade. Esta diferença pode não ter sido estatisticamente significativa devido ao reduzido número da amostra ( $n=20$ ), ou por, em aves ocorrer um aumento da eritropoiese com o crescimento acompanhada de um aumento do tamanho dos eritrócitos, contendo estes mais hemoglobina. Deste modo, as elevadas necessidades em oxigénio são providenciadas, sem aumentar a viscosidade sanguínea (Smith, West & Jones, 2000).

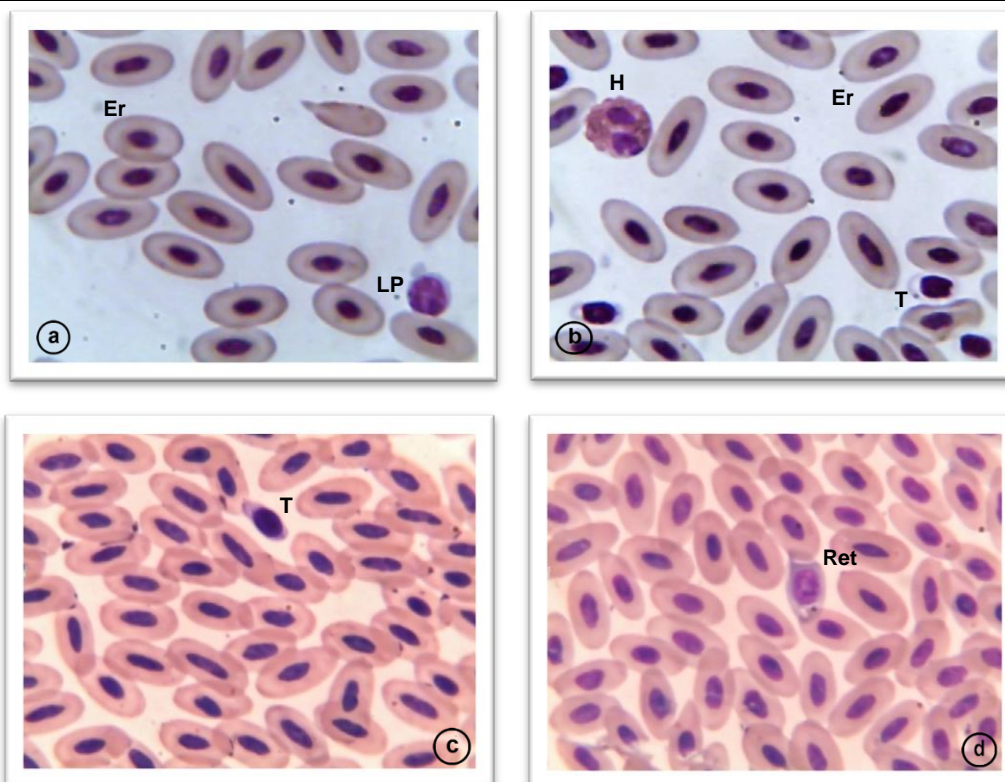
No Gráfico 5(b) é possível observar a distribuição ordenada dos valores por grupo, sendo o valor aberrante observado num indivíduo do grupo B, pertencente provavelmente a um animal com idade mais avançada, pois é importante ter em conta a diferença de idades em animais pertencentes ao mesmo grupo.

Os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com os valores obtidos por outros autores em jovens de cegonha-branca (Puerta *et al.*, 1989; Montesinos *et al.*, 1997), e são inferiores aos obtidos por Alonso *et al.* (1991) para adultos. Os animais jovens são caracterizados por apresentarem anemia fisiológica, sendo o valor da contagem total de eritrócitos inferior em jovens e aumentando em função da idade (Howlett *et al.*, 2002; Dujowich *et al.*, 2005). Facto semelhante ocorre em indivíduos em cativeiro, que apresentam menor actividade física, não tendo exigências tão elevadas em oxigénio. A eritropoiese aumenta com a idade, facto que explica a menor concentração de eritrócitos em jovens (Fair *et al.*, 2007). Esta correlação entre idade e contagem total de eritrócitos foi também obtida para outras espécies (Hernández & Margalida, 2010).

Em relação às características morfológicas, não foi encontrado na literatura nenhuma descrição para esta espécie, no entanto os eritrócitos parecem assemelhar-se aos eritrócitos de outras aves, nomeadamente aos da cegonha-asiática (Aengwanich, Tanomtong, Pattanarungson & Simaraks, 2002), pertencente também à família *Ciconiidae*. Foi possível observar alguns eritrócitos imaturos, ainda que não tenha sido realizada a contagem, e os eritrócitos maduros observados apresentam tamanho, forma e cor homogénea. A forma é tipicamente oval com núcleo oval posicionado centralmente contendo aglomerados densos de cromatina intensamente corada e citoplasma eosinofílico (Figura 7).

**Figura 7.** Células hemáticas de cegonha-branca – Parte I (fotografias originais).

Legenda: (a) eritrócitos e linfócito pequeno, (b) heterófilo, eritrócitos e trombócitos (c) eritrócitos e trombócito (d) reticulócitos e eritrócitos (Ampliação 1000x).



Er – eritrócito; T – trombócito; Ret – reticulócito; H – heterófilo; LP – linfócito pequeno.

### 1.3 Contagem estimativa total de trombócitos (TTC)

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $23.53 \pm 5.06 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$  (Tabela 3), estando incluído no intervalo mencionado por Pendl (2011b) para a classe das aves em geral ( $20.00\text{--}40.00 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ).

Neste estudo não foram obtidos diferenças estatisticamente significativas ( $p=0.49$ ) na comparação entre os grupos A, B e C ( $23.86 \pm 6.43$ ,  $24.20 \pm 4.94$  e  $22.21 \pm 4.00 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente) (Tabela 4). No Gráfico 5 (c) é possível observar a distribuição ordenada dos valores por grupo, sendo o valor aberrante observado num indivíduo do grupo C, provavelmente causado pela variação inter-operador que pode ter influenciado a contagem.

A contagem total de trombócitos é difícil de determinar, pois estes tendem a formar grandes agregados, facto que justifica os valores discrepantes encontrados na bibliografia consultada, referente à contagem deste parâmetro. Montesinos *et al.* (1997) obtiveram, em cegonha-branca, valores superiores e decrescentes com a idade, Puerta *et al.* (1989) obtiveram os valores mais elevados, cerca do triplo do valor obtido neste trabalho, e Alonso *et al.* (1991) em adultos de cegonha-branca obtiveram valores mais baixos. Esta elevada variação demonstra a dificuldade na contagem total de trombócitos. Em relação à morfologia (Figura 7), os trombócitos encontrados nos esfregaços sanguíneos são células pequenas, com cerca de  $\frac{1}{3}$  do tamanho dos eritrócitos, forma oval a redonda, núcleo picnótico e citoplasma incolor e homogéneo.

#### 1.4 Contagem total de leucócitos (TWBC)

A contagem total de leucócitos foi realizada por dois métodos, o método directo e contagem estimativa por esfregaço, sendo o intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra de  $13.15 \pm 4.97$  e  $17.68 \pm 6.40 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente (Tabela 3) e, encontrando-se este dentro do intervalo de valores mencionado por Pendl (2011b) para a classe das aves em geral, para espécies linfocíticas ( $15.00\text{--}25.00 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ) e acima do limite para espécies granulocíticas ( $5.00\text{--}11.00 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ).

As médias de valores obtidas pela contagem estimativa são, em todos os grupos ligeiramente superiores à contagem obtida pelo método directo, apesar de não ser estatisticamente significativa ( $p=0.95$ , para Wilcoxon emparelhado). Esta diferença pode ser justificada por a diferenciação celular pelo método directo ser pouco clara e necessitar experiência por parte do operador para a realização das contagens e, por outro lado os esfregaços necessitem estar tecnicamente perfeitos para a realização de uma contagem fidedigna (Pendl, 2011a).

Importa referir que para os dois métodos não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ( $p>0.05$ , para ambos os métodos) na comparação entre grupos, no entanto os resultados revelam uma tendência para ocorrer uma redução nos valores em função da idade quer para o método estimativo (A -  $20.03 \pm 4.40$ , B -  $18.18 \pm 6.13$  e C -  $14.99 \pm 7.50 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ) quer para o método directo (B -  $14.13 \pm 6.76$  e C -  $11.68 \pm 2.11 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ) (Tabela 4).

No Gráfico 6(a), é possível observar a distribuição ordenada dos valores por grupo em relação ao método estimativo por esfregaço, sendo os valores aberrantes observados nos grupos B e C, provavelmente causa da variação inter-operador que pode ter influenciado a contagem.

Para os restantes estudos realizados em cegonha-branca foi utilizado o método directo e os resultados obtidos são bastante superiores aos obtidos neste estudo (Puerta *et al.*, 1989; Montesinos *et al.*, 1997) e os resultados obtidos por Alonso *et al.* (1991) em adultos são também superiores. Montesinos *et al.* (1997) observaram também uma diminuição na contagem total de leucócitos em função da idade, em cegonha-branca, e o mesmo é observado em outras espécies (Howlett *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Hernández & Margalida, 2010). Alonso *et al.* (1991) sugerem como responsável por esta variação, a diferente expressão da resposta imunitária em jovens e adultos. Isto é, a maturação e proliferação do sistema imunitário durante o primeiro mês de vida reflecte-se em contagens totais de leucócitos mais elevadas em jovens, quando comparando com adultos da mesma espécie (Joyner *et al.*, 1990; citado por Pendl, 2011a).

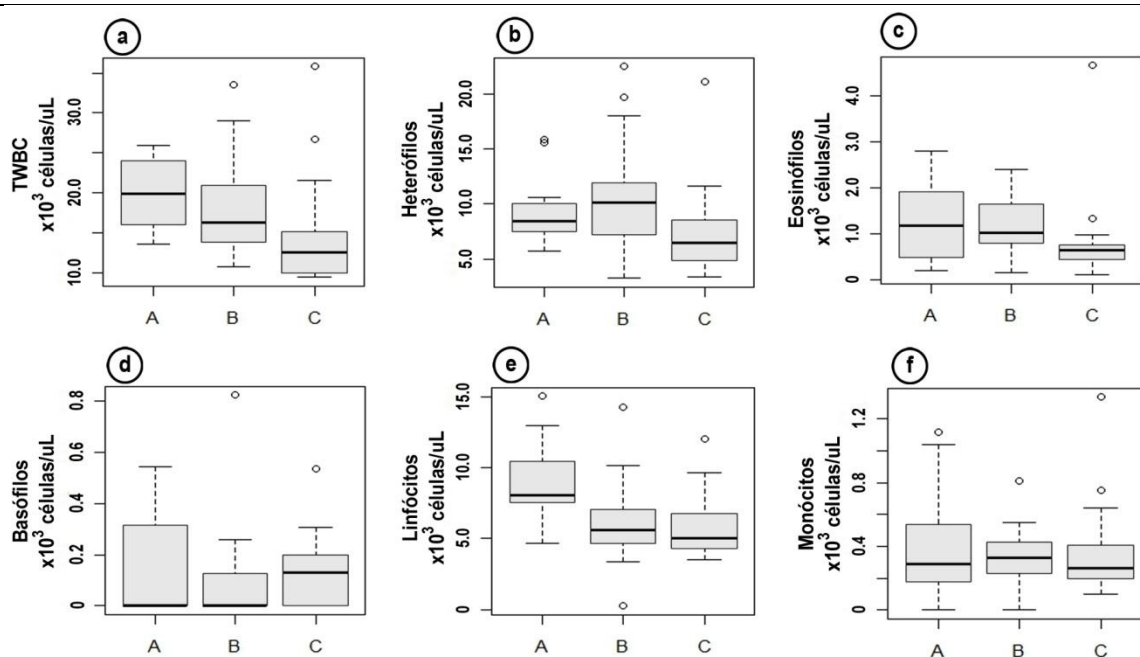
Existe uma elevada variação individual no valor fisiológico de leucócitos, em indivíduos expostos a factores stressantes, como é o caso dos animais da amostra, que foram sujeitos ao stresse de captura, manipulação, confinamento, interações sociais, entre outros

(Campbell, 1994). Neste caso é importante ter em conta que qualquer alteração pode também representar uma resposta ao stresse, uma vez que são animais selvagens. De acordo com este facto estão os valores aberrantes encontrados no grupo C, grupo este, que inclui indivíduos mais velhos e com uma reacção mais exacerbada face à manipulação (Blas *et al.*, 2006).

A cegonha-branca é considerada uma espécie semi-altricial (Nice, 1962; citado por Blas *et al.*, 2006), uma vez que as crias são incapazes de realizar termoregulação e locomoção, e estão completamente dependentes dos progenitores no que diz respeito à alimentação e protecção durante os primeiros 60-90 dias de vida em que permanecem no ninho, no entanto nascem com alguma plumagem e com os olhos abertos. Devido a este elevado grau de dependência, nestes indivíduos é esperado encontrar uma resposta reduzida ao stresse durante o desenvolvimento (período hiporesponsivo). Em suma, os autores concluíram que o desenvolvimento ontogénico do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) é um processo gradual na cegonha-branca (Blas *et al.*, 2006).

Este facto reflecte-se também no comportamento manifestado pelos animais incluídos no presente estudo face à manipulação, sendo que indivíduos mais jovens (<30 dias) demonstraram um comportamento pouco responsivo a estímulos, permanecendo no solo de pescoço esticado, ao contrário de animais com idade mais avançada que reagem com inquietação até adquirirem o comportamento de ataque dos adultos.

**Gráfico 6.** Distribuição ordenada dos valores de (a) TWBC, (b) heterófilos, (c) eosinófilos, (d) basófilos, (e) linfócitos e (f) monócitos nos grupos A, B e C.





## 1.5 Contagem estimativa diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos revelou a presença de uma maior proporção de heterófilos na amostra e em cada grupo (Tabela 5). As proporções observadas para cada linha celular são bastante aproximadas das obtidas por Montesinos *et al.*, (1997).

**Tabela 5.** Proporção de cada linha celular na totalidade da amostra e em cada grupo.

Contagem Diferencial	Und	Amostra		Grupo A		Grupo B		Grupo C	
		n	$\bar{x} \pm \sigma$	n	$\bar{x} \pm \sigma$	n	$\bar{x} \pm \sigma$	n	$\bar{x} \pm \sigma$
Heterófilos	%	51	51.29 ± 10.73	12	46.50 ± 9.10	24	54.92 ± 11.63	15	49.33 ± 8.80
Eosinófilos	%	51	6.31 ± 3.94	12	7.00 ± 5.06	24	6.63 ± 3.77	15	5.27 ± 3.2
Basófilos	%	51	0.73 ± 1.02	12	0.75 ± 1.29	24	0.46 ± 0.88	15	1.13 ± 0.92
Linfócito	%	51	39.41 ± 9.76	12	43.83 ± 9.92	24	35.83 ± 9.74	15	41.60 ± 7.94
Monócitos	%	51	2.18 ± 1.48	12	1.83 ± 1.40	24	2.04 ± 1.23	15	2.67 ± 1.84

### 1.5.1 Heterófilos

A contagem de heterófilos encontra-se então de acordo com o obtido por Montesinos *et al.* (1997), no entanto no ISIS (2002) estão descritas proporções mais elevadas de heterófilos na amostra e Puerta *et al.* (1989) obtêm uma proporção mais baixa. Analisando os valores absolutos (Tabela 4), não foi encontrada uma diferença significativa ( $p=0.17$ ) entre o grupos A, B e C ( $9.38 \pm 3.25$ ,  $10.38 \pm 4.84$  e  $7.57 \pm 4.40 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente), porém, há uma tendência para os indivíduos do grupo C apresentarem valores mais reduzidos, o que pode estar relacionado com a diminuição da contagem total de leucócitos, nos indivíduos deste grupo. No Gráfico 6 (b) estão representados os dados ordenados, sendo possível observar alguns valores aberrantes que podem ser justificados pela variação inter-operador ou pela variação individual da resposta ao stresse.

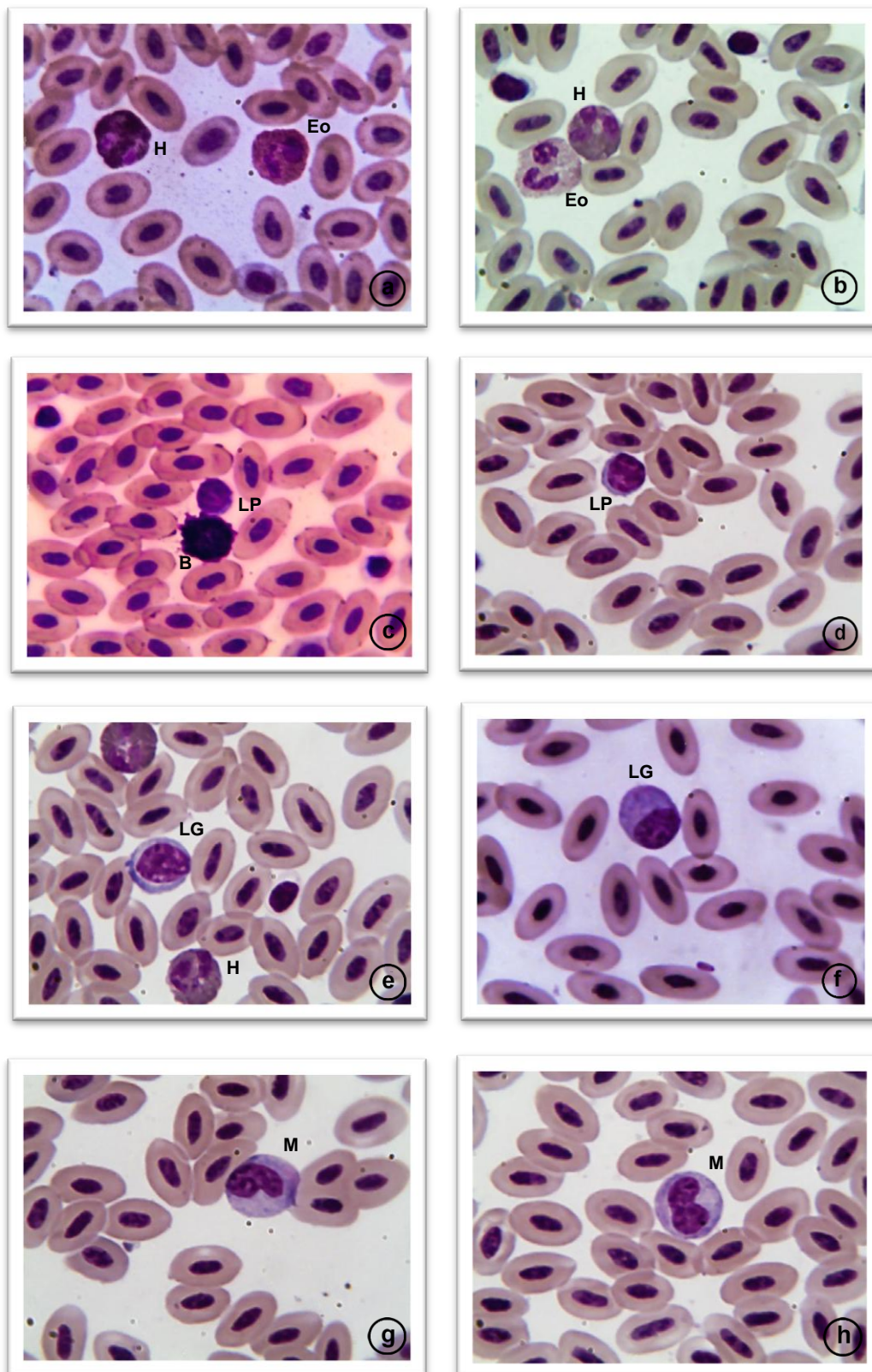
Em relação à morfologia, os heterófilos encontrados podem observar-se na Figura 8(a) (b) e (e). São células tipicamente redondas, possuem grânulos citoplasmáticos proeminentes em forma de bastonete e em elevada densidade, núcleo bi- ou trilobado com aglomerados densos de cromatina, semelhantes aos descritos por Aengwanich *et al.*, (2002) em relação à cegonha-asiática e por Clark *et al.* (2009) para a ordem Ciconiformes.

### 1.5.2 Eosinófilos

A contagem diferencial de leucócitos revelou a presença de 6.31% ( $\pm 3.94\%$ ) de eosinófilos na totalidade da amostra, sendo a sua proporção bastante próxima do obtido por Montesinos *et al.* (1997), por Alonso *et al.* (1991) e do que está descrito no ISIS (2002). Os intervalos médios de valores obtidos para o grupo A, B e C ( $1.27 \pm 0.82$ ,  $1.14 \pm 0.58$  e  $0.87 \pm 1.09 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente) apresentam-se sem alterações ( $p=0.43$ ) (Tabela 4). No Gráfico 6 (c) estão representados os dados ordenados, sendo possível observar alguns valores aberrantes que podem ser justificados pela variação inter-operador.

**Figura 8.** Células hemáticas de cegonha-branca – Parte II (fotografias originais).

Legenda: (a) heterófilo e eosinófilo, (b) heterófilo e eosinófilo, (c) basófilo e linfócito pequeno, (d) linfócito pequeno, (e) heterófilos e linfócito grande, (f) linfócito grande, (g) monócito, (h) monócito (Ampliação 1000x).



B – basófilo; Eo – eosinófilo; H – heterófilo; LP – linfócito pequeno; LG – linfócito grande; M – monócito.

Estas células são encontradas nos esfregaços de aves em maior número que em mamíferos, não estando associadas à presença de parasitas e sendo este valor elevado considerado fisiológico (Pendl, 2011b).

Relativamente à morfologia, foram encontradas células com formas variadas, o que vai ao encontro do descrito por Aengwanich *et al.*, (2002) para a cegonha-asiática. As células são grandes (Figura 8 (a) e (b)) com bordos irregulares, os grânulos citoplasmáticos são pequenos, redondos e brilhantes e estão presentes em quantidades elevadas e o núcleo apresenta-se geralmente bilobado (Clark *et al.*, 2009).

### 1.5.3 Basófilos

A contagem diferencial de leucócitos revelou a presença de 0.73% ( $\pm 1.02\%$ ) de *basófilos* na totalidade da amostra. Krautwald-Junghanns, (2007) admite uma percentagem maior de basófilos na circulação periférica (2.5-6.0%), no entanto, Puerta *et al.*, (1989), Alonso *et al.*, (1991) e Montesinos *et al.* (1997) obtiveram valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. A comparação entre os grupos A, B e C ( $0.13 \pm 0.20$ ,  $0.09 \pm 0.18$  e  $0.15 \pm 0.15 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente) mostrou-se sem alterações estatisticamente significativas ( $p=0.53$ ) (Tabela 4). No Gráfico 6 (d) estão representados os dados ordenados, sendo possível observar dois valores aberrantes no grupo B e C que estão provavelmente relacionados com diferenças inter-operador.

Os basófilos foram facilmente encontrados nos esfregaços sanguíneos devido à sua morfologia característica. Apresentam tamanho inferior aos restantes granulócitos, encontram-se providos da presença de numerosos grânulos citoplasmáticos arredondados e intensamente basofílicos, tornando difícil a identificação do núcleo (Figura 8 (c)).

### 1.5.4 Linfócitos

A contagem diferencial de leucócitos revelou a presença de 39.41% ( $\pm 9.76\%$ ) de *linfócitos* na totalidade da amostra, tendo sido o segundo tipo celular mais numeroso encontrado no sangue periférico, estando os valores absolutos (Tabela 4) de acordo com o encontrado por Montesinos *et al.* (1997). O intervalo médio de valores obtidos para o grupo A ( $8.82 \pm 3.01 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ ) é significativamente superior ( $p < 0.05$ ) ao obtido nos grupos B e C ( $6.35 \pm 2.40$  e  $6.01 \pm 2.44 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente). No Gráfico 6 (e) estão representados os dados ordenados, sendo possível observar alguns valores aberrantes que podem ser justificados pela variação inter-operador ou pela variação individual da resposta ao stress.

Relativamente à morfologia, foi encontrado um maior número de linfócitos pequenos (Figura 8 (c) e (d)), sendo também possível de observar alguns linfócitos grandes (Figura 8 (e) e (f)), podendo estes últimos ser confundidos com os monócitos. O núcleo das células observadas apresentava-se arredondado e colocado centralmente, o citoplasma eosinofílico e o rácio N/C variou de reduzido nos linfócitos pequenos a equilibrado nos linfócitos grandes.

### 1.5.5 Monócitos

A contagem diferencial de leucócitos revelou a presença de 2.18% ( $\pm 1.48\%$ ) de *monócitos* na totalidade da amostra, estando os valores relativos de acordo com o obtido por Montesinos *et al.* (1997). Os intervalos médios de valores obtidos nos grupos A, B e C ( $0.41 \pm 0.35$ ,  $0.33 \pm 0.19$  e  $0.39 \pm 0.32 \times 10^3$  células/ $\mu\text{l}$ , respectivamente) (Tabela 4), não apresentam diferenças significativas ( $p=0.65$ ). No Gráfico 6 (f), estão representados os dados ordenados, sendo possível observar alguns valores aberrantes que podem ser justificados pela variação inter-operador.

Relativamente à morfologia, os monócitos foram as maiores células encontradas na circulação periférica, tal como descrito por Clark *et al.* (2009), apresentando uma forma arredondada, núcleo em forma de rim e um citoplasma azulado e com granulação fina (Figura 8 (g) e (h)).

### 1.5.6 Rácio H/L

O rácio H/L é uma boa medida para classificar a espécie em linfocítica ou granulocítica. Neste estudo, os valores obtidos quer para a totalidade da amostra ( $1.48 \pm 0.74$ ), quer para cada grupo (A -  $1.15 \pm 0.48$ , B -  $1.75 \pm 0.90$  e C -  $1.33 \pm 0.48$ ) são sempre superiores a 1, o que sugere que estamos perante uma espécie granulocítica.

O valor do rácio é significativamente mais elevado ( $p < 0.05$ ) no grupo B e C (Tabela 4), pois é nestes grupos que há uma diminuição no valor de TWBC e simultaneamente no valor de linfócitos, mantendo-se constante a contagem de heterófilos. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Montesinos *et al.* (1997) em jovens, e por Alonso *et al.* (1991) em adultos de cegonha-branca, no entanto, Puerta *et al.* (1989) referem no seu estudo que os linfócitos são o tipo celular mais abundante. Quando observados estudos de outras espécies da Ordem Ciconiformes os resultados obtidos são também variáveis, sendo que Lanzarot *et al.* (2005) encontraram no seu estudo em cegonha-preta uma maior proporção de heterófilos e Coke, West e Hoover (2004) encontraram no seu estudo em íbis uma proporção mais elevada de linfócitos.

**Tabela 6.** Valores do rácio H/L por grupo e para a amostra.

Amostra	n	Rácio H/L	
		$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo
Grupo A	12	$1.15 \pm 0.48$	0.57 - 1.97
Grupo B	24	$1.75 \pm 0.90$	0.58 - 2.02
Grupo C	15	$1.33 \pm 0.48$	0.51 - 2.18
Amostra Total	51	$1.48 \pm 0.74$	0.51 - 4.53

Por outro lado, o rácio H/L, tal como o nível de corticosterona, é um bom indicador do nível de stresse experienciado (Vleck *et al.*, 2000), podendo este aumento do rácio H/L nos grupos B e C estar relacionado com um maior desenvolvimento do eixo HPA nestes animais, permitindo uma maior percepção e conseqüentemente respostas mais exacerbadas ao stresse (Blas *et al.*, 2006).

Pendl (2011a) descreve ainda em espécies granulocíticas uma redução do rácio H/L de 2.00 para 1.00 durante os primeiros 6 meses de vida. Este facto é devido à proliferação da granulopoiese nos primeiros meses de vida e ao atingir a massa corporal de um adulto, ocorre uma redução desta, e em simultâneo um aumento da contagem de linfócitos. Facto que pode ser observado, numa pequena proporção, na Tabela 5.

## 1.6 Hemoparasitas

No presente estudo não foram encontrados hemoparasitas, tendo sido considerados artefactos todos os achados que suscitassem dúvidas.

Este resultado pode estar relacionado com a ausência de hemoparasitas, a experiência do operador ou com a técnica e processamento do esfregaço, uma vez que determinados parasitas são difíceis de detectar em esfregaço sanguíneo se presentes em baixa intensidade. No entanto, a amostragem foi realizada na época reprodutiva, altura do pico de infecção por hemoparasitas e como tal seria de esperar uma infecção intensa e fácil detecção dos parasitas sanguíneos (Blanco *et al.*, 1998).

É de realçar que nos restantes estudos hematológicos realizados em cegonha-branca na Europa, não foram encontrados parasitas sanguíneos (Forrester, Greiner, Bennett & Kigaye 1977; Peirce, 1981; Puerta *et al.*, 1989; Alonso *et al.*, 1991; Montesinos *et al.*, 1997; Jovani *et al.*, 2002; Martinho & Melo 2002) ou foram encontrados com uma prevalência e intensidade muito reduzidas (Bennett *et al.*, 1982; citado por Jovani *et al.*, 2002; Costa Anza & Brandão, 2011), tendo sido detectados representantes de espécies dos géneros *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* e uma espécie de microfilária.

A hipótese proposta por Martínez-Abraín *et al.* (2004) de exclusão competitiva de vectores de hemoparasitas mediante a presença de ectoparasitas, pode ser enquadrada neste estudo, uma vez que os animais ingressados apresentavam uma elevada carga infestante de malófagos (Ordem *Phthiraptera*).

A ausência (Jovani *et al.*, 2002) ou incidência reduzida (Costa *et al.*, 2011) de hemoparasitas em cegonha-branca é considerada uma contradição, uma vez que esta espécie habita em locais abertos perto de cursos de água, onde os vectores aparecem tipicamente em abundância, seria portanto de esperar, a presença de parasitas nestes indivíduos. No entanto, esta prevalência reduzida já foi documentada em espécies presentes no habitat da cegonha-branca (Tella *et al.*, 1999; citado por Jovani *et al.*, 2002).

Por outro lado, não existe informação do período pré-patente de nenhum dos parasitas sanguíneos encontrados em cegonha-branca ou em outra espécie da Família *Ciconiidae*, no entanto a idade dos jovens da amostra excede o período reportado para parasitas sanguíneos em outras espécies de aves (Jovani *et al.*, 2002).

O facto dos adultos debilitados admitidos em centros de recuperação não apresentarem hemoparasitas, reforça os resultados obtidos para os animais jovens (Jovani *et al.*, 2002).

## 2. Parâmetros bioquímicos

Os resultados bioquímicos de AB, glucose, PT, TG, ALT, AST, FA, GGT, LD, CK, AU, creatinina, cálcio e fósforo obtidos para a totalidade da amostra, encontram-se descritos na Tabela 7, de acordo com a sua média, desvio padrão, valor mínimo e máximo. Os resultados obtidos para os mesmos parâmetros nos grupos A, B e C encontram-se na Tabela 8, juntamente com o valor de p para ANOVA univariada.

Alguns parâmetros que foram testados neste estudo não foram encontrados descritos na bibliografia consultada para a espécie cegonha-branca, nomeadamente os AB. Em relação a creatinina, cálcio, fósforo, e as enzimas LD e GGT, foram encontrados valores no ISIS (2002), não havendo conhecimento das características dos indivíduos ou testes analíticos utilizados.

A Tabela 9 e 10 ilustram a distribuição dos dados estatísticos (média, desvio padrão, valor mínimo e máximo) dos subgrupos estudados, A1 e A2 e, B1 e B2, respectivamente, juntamente com o valor de p, para o teste de Wilcoxon.

**Tabela 7.** Valores bioquímicos obtidos para a totalidade da amostra.

Parâmetros Bioquímicos	Unidade	n	Amostra Total	
			$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo
Ácidos biliares	µmol/L	75	4.51 ± 1.32	3.19 - 12.83
Glucose	mg/dL	77	208.81 ± 19.22	164.00 - 259.00
Proteínas totais (#)	g/dL	77	3.45 ± 0.54	2.20 - 5.80
Proteínas totais (##)	g/dL	77	4.97 ± 0.47	4.00-6.00
Triglicéridos	mg/dL	76	94.59 ± 41.74	40.00 - 214.00
ALT	U/L	76	51.46 ± 19.58	26.00 - 148.20
AST	U/L	73	179.30 ± 32.02	97.70 - 235.90
LD	U/L	74	967.36 ± 609.99	501.00 - 4 205.00
GGT	U/L	73	27.16 ± 34.78	0.20 - 128.20
FA	U/L	77	1 314.64 ± 577.32	267.00 - 2 837.00
CK	U/L	76	702.43 ± 398.09	241.20 - 2 593.00
Ácido úrico	mg/dL	77	10.80 ± 7.01	2.80 - 38.60
Creatinina	mg/dL	77	0.22 ± 0.09	0.10 - 0.60
Cálcio	mg/dL	77	9.81 ± 1.26	5.50 - 12.80
Fósforo	mg/dL	77	5.61 ± 1.04	3.60 - 7.60

# - Método do biureto

## - Refractometria

**Tabela 8.** Valores bioquímicos obtidos para os grupos A, B e C.

Parâmetros Bioquímicos	Unidades	Grupo A			Grupo B			Grupo C			p
		n	$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	n	$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	n	$\bar{X} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	
Ácidos biliares	µmol/L	18	4.49 ± 0.77	4.00 - 6.89	40	4.68 ± 1.70	4.05 - 2.83	17	4.14 ± 0.27	3.19 - 4.35	0.37
Glucose	mg/dL	18	202.00 ± 11.60	179.00 - 228.00	42	203.14 ± 17.62	164.00 - 244.00	17	230.00 ± 14.25	209.00 - 259.00	<0.01*
Proteínas totais (#)	g/ dL	18	3.34 ± 0.52	2.30 - 4.20	42	3.48 ± 0.53	2.70 - 5.80	17	3.51 ± 0.60	2.20 - 4.50	0.59
Proteínas totais (##)	g/dL	18	4.74 ± 0.41	4.00 - 5.60	42	5.03 ± 0.46	4.00 - 6.00	17	5.09 ± 0.50	4.30 - 6.00	0.05
Triglicéridos	mg/dL	18	107.50 ± 37.35	62.00 - 180.00	42	95.62 ± 47.63	47.00 - 214.00	16	77.38 ± 20.26	40.00 - 105.00	0.11
ALT	U/L	17	46.38 ± 9.90	33.10 - 65.90	42	49.08 ± 16.85	26.00 - 138.70	17	62.42 ± 28.31	30.90 - 148.20	<0.05**
AST	U/L	17	198.65 ± 22.36	167.70 - 235.90	41	185.71 ± 20.03	148.10 - 225.20	15	139.87 ± 36.24	97.70 - 223.90	<0.01*
LD	U/	17	908.76 ± 173.42	591.00 - 1 259.00	41	766.51 ± 253.95	501.00 - 1 575.00	16	1 544.31 ± 1 066.55	897.00 - 4 205.00	<0.01*
GGT	U/L	17	20.58 ± 30.63	0.20 - 121.40	40	30.66 ± 34.88	0.50 - 123.40	16	25.41 ± 39.48	0.30 - 128.20	0.60
FA	U/L	18	1 432.78 ± 383.85	585.00 - 2 138.00	42	1 482.29 ± 564.16	440.00 - 2 837.00	17	775.35 ± 461.00	267.00 - 1 948.00	<0.01*
CK	U/L	18	696.20 ± 308.14	279.00 - 1 198.70	41	673.23 ± 333.94	241.20 - 1 984.00	17	779.44 ± 595.53	261.60 - 2 593.00	0.66
Ácido úrico	mg/dL	18	11.39 ± 8.01	5.70 - 38.60	42	12.37 ± 7.09	6.00 - 30.70	17	6.29 ± 2.85	2.80 - 14.20	<0.01*
Creatinina	mg/dL	18	0.21 ± 0.06	0.10 - 0.30	42	0.21 ± 0.10	0.10 - 0.60	17	0.27 ± 0.09	0.10 - 0.50	0.05
Cálcio	mg/dL	18	8.89 ± 1.84	5.50 - 12.80	42	10.20 ± 0.95	7.40 - 11.90	17	9.80 ± 0.51	8.60 - 10.90	<0.01*
Fósforo	mg/dL	18	5.79 ± 1.27	3.90 - 7.60	42	5.84 ± 0.87	4.20 - 7.60	17	4.85 ± 0.80	3.60 - 5.90	<0.01*

\*- Indica diferença estatisticamente significativa em p<0.01, de acordo com o teste ANOVA univariada.

\*\* - Indica diferença estatisticamente significativa em p<0.05, de acordo com o teste ANOVA univariada.

# - Método do biureto

## - Refractometria

**Tabela 9.** Valores bioquímicos para os Subgrupos A1 e A2.

Parâmetros Bioquímicos	Unidades	Grupo A						p
		Subgrupo A1			Subgrupo A2			
		n	$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	n	$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	
Ácidos biliares	μmol/L	9	4.83 ± 0.98	4.16 - 6.89	9	4.16 ± 0.20	4.00 - 4.66	<0.01*
Glucose	mg/dL	9	200.56 ± 14.45	179.00 - 228.00	9	203.44 ± 8.50	195.00 - 222.00	0.63
Proteínas totais	g/dL	9	3.09 ± 0.57	2.30 - 4.00	9	3.59 ± 0.32	3.20 - 4.20	0.05
Triglicéridos	mg/dL	9	92.33 ± 36.13	62.00 - 179.00	9	122.67 ± 33.78	82.00 - 180.00	<0.05**
ALT	U/L	8	45.33 ± 7.61	33.10 - 59.00	9	47.31 ± 11.97	34.50 - 65.90	0.89
AST	U/L	8	195.33 ± 21.82	167.70 - 235.90	9	201.61 ± 23.72	168.00 - 232.40	0.54
LD	U/L	8	825.75 ± 176.05	591.00 - 1 111.00	9	982.56 ± 141.48	833.00 - 1 259.00	0.19
GGT	U/L	8	25.04 ± 44.68	0.20 - 121.40	9	16.61 ± 9.60	2.30 - 26.70	0.17
FA	U/L	9	1 346.78 ± 465.58	585.00 - 2 138.00	9	1 518.78 ± 282.31	1 131.00 - 1 982.00	0.49
CK	U/L	9	638.07 ± 339.47	279.00 - 1 198.70	9	754.33 ± 280.94	299.60 - 1 115.50	0.49
Ácido úrico	mg/dL	9	12.17 ± 10.10	6.00 - 38.60	9	10.61 ± 5.74	5.70 - 20.50	0.63
Creatinina	mg/dL	9	0.20 ± 0.07	0.10 - 0.30	9	0.22 ± 0.04	0.20 - 0.30	0.49
Cálcio	mg/dL	9	9.33 ± 2.03	6.50 - 12.80	9	8.44 ± 1.63	5.50 - 10.80	0.40
Fósforo	mg/dL	9	5.13 ± 1.21	3.90 - 7.40	9	6.46 ± 0.99	4.70 - 7.60	<0.05**

\*- Indica diferença estatisticamente significativa em  $p < 0.01$ , de acordo com o teste de Wilcoxon.

\*\* - Indica diferença estatisticamente significativa em  $p < 0.05$ , de acordo com o teste de Wilcoxon.

**Tabela 10.** Valores bioquímicos para os Subgrupos B1 e B2.

Parâmetros Bioquímicos	Unidades	Grupo B						p
		Subgrupo B1			Subgrupo B2			
		n	$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	n	$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo	
Ácidos biliares	μmol/L	27	4.93 ± 2.04	4.08 - 12.83	13	4.17 ± 0.10	4.05-4.39	<0.01*
Glucose	mg/dL	29	205.79 ± 18.79	177.00 - 244.00	13	197.23 ± 13.50	164.00 - 222.00	0.24
Proteínas totais	g/dL	29	3.37 ± 0.39	2.70 - 3.90	13	3.73 ± 0.70	3.10 - 5.80	0.16
Triglicéridos	mg/dL	29	108.52 ± 51.64	50.00 - 214.00	13	66.85 ± 15.13	47.00 - 100.00	<0.01*
ALT	U/L	29	50.46 ± 19.71	26.00 - 138.70	13	45.99 ± 6.93	34.40 - 57.40	0.67
AST	U/L	28	182.56 ± 21.37	148.10 - 225.20	13	192.48 ± 15.38	169.50 - 216.30	0.17
LD	U/L	28	818.68 ± 275.81	519.00 - 1 575.00	13	654.15 ± 154.20	501.00 - 963.00	<0.05**
GGT	U/L	27	33.12 ± 36.68	0.50 - 123.40	13	25.56 ± 31.57	2.40 - 102.60	0.77
FA	U/L	29	1 397.86 ± 467.12	489.00 - 2 099.00	13	1 670.62 ± 722.97	440.00 - 2 837.00	0.15
CK	U/L	28	716.83 ± 346.12	293.10 - 1 984.0	13	579.32 ± 296.96	241.20 - 1 080.70	0.18
Ácido úrico	mg/dL	29	14.53 ± 7.60	6.00 - 30.70	13	7.54 ± 0.59	6.60 - 8.70	<0.01*
Creatinina	mg/dL	29	0.21 ± 0.08	0.10 - 0.40	13	0.20 ± 0.14	0.10 - 0.60	0.22
Cálcio	mg/dL	29	10.06 ± 1.01	7.40 - 11.90	13	10.52 ± 0.76	8.60 - 11.60	0.13
Fósforo	mg/dL	29	5.96 ± 0.92	4.20 - 7.60	13	5.59 ± 0.73	4.40 - 7.20	0.22

\*- Indica diferença estatisticamente significativa em  $p < 0.01$ , de acordo com o teste de Wilcoxon.

\*\* - Indica diferença estatisticamente significativa em  $p < 0.05$ , de acordo com o teste de Wilcoxon.



## 2.1 Ácidos biliares

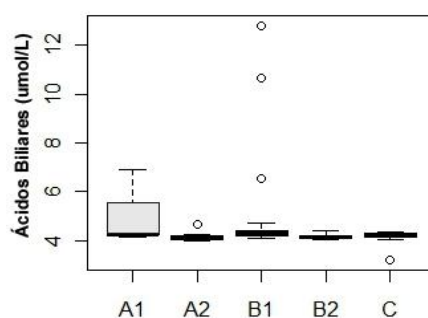
O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $4.51 \pm 1.32 \mu\text{mol/L}$ , (Tabela 7) sendo inferior ao referido por Campbell (2006b) para outras espécies, enquanto Fudge (1997) apenas refere a normalidade para valores inferiores a  $100 \mu\text{mol/L}$ .

Neste estudo não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0.37$ ) na comparação entre os grupos A, B e C ( $4.49 \pm 0.77 \mu\text{mol/L}$ ;  $4.68 \pm 1.70 \mu\text{mol/L}$ ;  $4.14 \pm 0.27 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente) (Tabela 8). Pelo contrário, foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.01$ ) na comparação entre subgrupos (Tabela 9 e 10), sendo que os indivíduos cujo período de jejum é desconhecido (A1 -  $4.83 \pm 0.98$  e B1 -  $4.93 \pm 2.04 \mu\text{mol/L}$ ) apresentam valores plasmáticos superiores aos indivíduos que foram sujeitos a um período de jejum de 12 horas (A2 -  $4.16 \pm 0.20$  e B2 -  $4.17 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$ ), sendo estas diferenças compatíveis com o aumento pós-prandial deste metabolito.

No Gráfico 7 estão representados os valores ordenados para cada grupo e subgrupos. O valor aberrante apresentado num indivíduo do subgrupo A2 poderá ser devido simplesmente a uma variação individual.

Como foi referido no Capítulo 2, a determinação dos ácidos biliares é um teste específico e sensível na determinação de doença hepática, para algumas espécies de aves (Lumeij & Wolfswinkel, 1988) e regra geral, a alteração fisiológica dos ácidos biliares está relacionada com a ingestão de alimento, ocorrendo um aumento pós-prandial (Lumeij & Wolfswinkel, 1988; Lumeij & Remple, 1992). Não estão disponíveis na literatura valores plasmáticos de ácidos biliares em cegonha-branca. Lanzarot *et al.* (2005) apresenta para cegonha-preta, um valor mais elevado e um intervalo mais amplo ( $11.94 \pm 6.62 \mu\text{mol/L}$ ).

**Gráfico 7.** Distribuição ordenada dos valores de ácidos biliares para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.



## 2.2 Glucose

O intervalo médio de valores de glucose plasmática obtido para a totalidade da amostra foi de  $208.81 \pm 19.22 \text{ mg/dL}$  (Tabela 7), estando de acordo com o intervalo mencionado por Campbell (2006b) para a classe das aves em geral ( $200.00-500.00 \text{ mg/dL}$ ). Quando comparando o intervalo médio de valores obtido nos diferentes grupos, as diferenças mostraram-se estatisticamente significativas ( $p < 0.01$ ), uma vez que indivíduos pertencentes

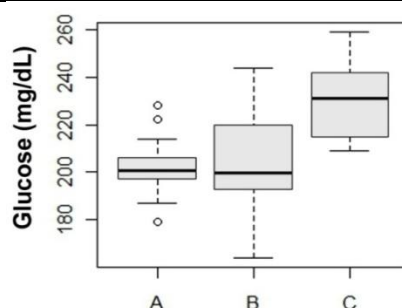
aos grupo C ( $230.00 \pm 14.25$  mg/dL) apresentaram valores de glucose mais elevados, em relação ao grupo A e B ( $202.00 \pm 11.60$  e  $203.14 \pm 17.62$  mg/dL, respectivamente) (Tabela 8), já descrito (Wolf, 1984; citado por Balley *et al.*, 1999) como um aumento do valor em animais jovens que estão prestes a iniciar o voo em relação às crias que ainda estão na fase de crescimento da pena. A justificação para este facto é desconhecida, podendo estar simplesmente relacionado com o temperamento e maior excitação dos animais do grupo C face à manipulação (Balley *et al.*, 1999; Blas *et al.*, 2006), ou com um maior *input* de glucose para o sangue nos animais mais velhos, devido a uma maior capacidade para a realização da gluconeogenese (Villegas *et al.*, 2002) ou ainda ser uma consequência do ganho de peso (Dobado-Berrios *et al.*, 1998; citado por Villegas *et al.*, 2002). No Gráfico 8, está representada a distribuição ordenada dos valores de glucose plasmática.

A concentração plasmática de glucose é bastante mais elevada em aves quando comparada com mamíferos com a mesma massa corporal, devido às elevadas exigências metabólicas que os primeiros têm para a realização do vôo. Regra geral os valores de glucose plasmática são superiores em animais jovens quando comparando com adultos (Balley *et al.*, 1999), devido às maiores necessidades em energia que os últimos apresentam para a realização do vôo.

Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos obtidos por Montesinos *et al.* (1997) em cegonhas-brancas jovens e por Lanzarot *et al.* (2005) em cegonha-preta, assemelhando-se estes últimos aos descritos no ISIS (2002).

Villegas *et al.* (2002) obtêm níveis de glucose significativamente mais elevados em jovens de abutre preto em relação a sub-adultos e destes em relação a adultos, da mesma espécie, diminuindo o valor de glucose em função da idade. Prinzing e Misovic (2010) descrevem, em pombos, o aumento dos valores de glucose até aos 9 anos, seguido do decréscimo até aos 14 anos.

**Gráfico 8.** Distribuição ordenada dos valores de glucose nos grupos A, B e C.



### 2.3 Proteínas totais

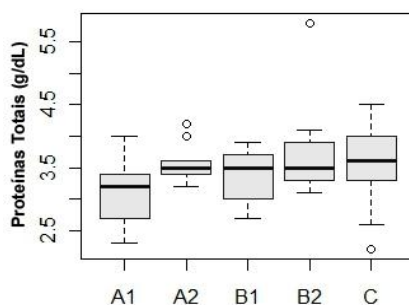
O intervalo de valores médio obtido na amostra total foi de  $3.45 \pm 0.54$  g/dL (Tabela 7), encontrando-se dentro do intervalo de valores referido por Campbell (2006b) para a classe das aves em geral (2.50-4.50g/dL).

Ao analisar os resultados obtidos é possível observar que não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0.59$ ) na comparação entre grupos de estudo, no entanto, os resultados sugerem uma tendência para ocorrer um ligeiro aumento em função da idade (grupo A –  $3.34\pm 0.52$  g/dL; Grupo B –  $3.48\pm 0.53$  g/dL; Grupo C –  $3.51\pm 0.60$  g/dL) (Tabela 8), possivelmente justificada por um aumento da concentração de anticorpos (desenvolvimento do seu sistema imunitário) (Lanzarot *et al.*, 2005) e, aumento da exigência tecidual em proteínas e aminoácidos, durante o crescimento (Villegas *et al.*, 2002).

Comparando ainda os valores obtidos dentro dos subgrupos A1 e A2 ( $3.09\pm 0.57$  e  $3.59\pm 0.32$ g/dL, respectivamente) (Tabela 9), o valor obtido em A2, é superior ( $p=0.05$ ) a A1, e o mesmo ocorre ( $p=0.16$ ) entre B1 e B2 ( $3.37\pm 0.39$  e  $3.73\pm 0.70$  g/dL, respectivamente) (Tabela 10). Apesar de não serem estatisticamente significativas as diferenças entre os subgrupos, há uma tendência para os animais que permaneceram alguns dias em cativeiro e apresentavam uma alimentação controlada e rica em proteínas (pintos congelados) apresentarem valores de PT superiores (Dobado-Berríos *et al.*, 1991; citado por Villegas *et al.*, 2002). No Gráfico 9 está representada a distribuição ordenada dos valores de PT.

Os valores obtidos neste estudo aproximam-se dos obtidos por Jerzak *et al.* (2010), que utilizam o mesmo método bioquímico e são ligeiramente superiores aos valores obtidos por Montesinos *et al.* (1997) que utilizam o método de química seca.

**Gráfico 9.** Distribuição ordenada dos valores de PT (método do biureto) para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.

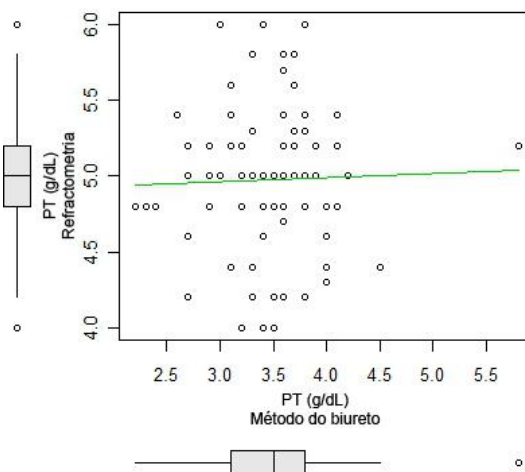


O intervalo médio de valores determinado por refractometria e obtido para a totalidade da amostra foi de  $4.97 \pm 0.47$  g/dL (Tabela 7) e para cada grupo A, B e C foi de  $4.74 \pm 0.41$ ,  $5.03 \pm 0.46$  e  $5.09 \pm 0.50$  g/dL, respectivamente (Tabela 8).

Quando comparando os valores obtidos pelo método do refractómetro com os valores obtidos pelo método do biureto obtemos uma diferença estatisticamente significativa ( $p<0.01$ , para teste t de Student emparelhado), Sendo possível observar que para a amostra e em cada grupo os valores de PT obtidos pelo método do refractómetro são superiores, o que vem reforçar o já sugerido em trabalhos anteriores que a utilização do Refractómetro portátil deve ser considerado um método rápido para estimativa da concentração de proteínas plasmáticas e não um método exacto, não devendo ser utilizado isoladamente

como critério de diagnóstico em aves, pois o valor obtido pode estar sobre-estimado, sem relação com uma hiperproteinémia. A explicação para esta inconsistência é que um aumento na fracção sólida não proteica aumenta também facciosamente a medição refractométrica da fracção proteica (Lumeij & Bruijne, 1985; Fudge, 2000). Idealmente a determinação das proteínas totais deve ser realizada pelo método do biureto ou por electroforese (Fudge, 1997; Guzman et al., 2008).

**Gráfico 10.** Distribuição gráfica dos valores de PT determinado por refractometria e método do biureto.



Como é possível observar no Gráfico 10 a distribuição dos valores é assimétrica, não há uma relação linear entre os dois parâmetros, e estes não se correlacionam ( $cor=0.03$ ;  $p=0.77$ , para teste de Pearson), devido à influência de vários compostos para o valor determinado por refractometria, nomeadamente aqueles encontrados em maior quantidade no plasma das aves como é o caso da glucose, colesterol, ureia e lipoproteínas (George, 2001).

McSherry & Al-Baker (1976) mostraram através de testes *in vitro* que a hiperglicémia e urémia aumentavam falsamente a concentração de proteínas plasmáticas medidas por Refractometria. Dubin e Hunt (1978) realizaram outro estudo em que comprovaram que a adição de dextrose a um cão, em concentrações de 500 a 1000 mg/dL fazia aumentar falsamente a concentração de proteínas plasmáticas pelo método do refractómetro. Sutton (1976) determinou que nem a hiperbilirrubinémia, nem a hemólise são responsáveis por este aumento.

## 2.4 Triglicéridos

O intervalo de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $94.59 \pm 41.74$  mg/dL (Tabela 7). Não está descrita uma diminuição fisiológica com a idade e as diferenças obtidas na comparação entre os grupos (Tabela 8) também não são estatisticamente significativas

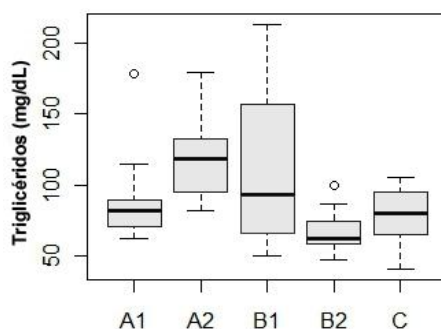
( $p=0.11$ ), no entanto, a média de valores obtidos no grupo A ( $107.50\pm 37.35$  mg/dL) são superiores aos do grupo B e C, e os do grupo B ( $95.62\pm 47.63$  mg/dL) superiores aos do grupo C ( $77.38\pm 20.26$  mg/dL), tal como observam Montesinos *et al.* (1997) no grupo de cegonha-branca selvagem e também Hernandez e Margalida (2010) num estudo realizado em quebra-ossos (*Gypaetus barbatus*). No entanto neste último estudo referem a probabilidade desta alteração estar correlacionada com o tempo de jejum e tipo de alimentação e não com a idade.

A importância de um período de 12-24 horas de jejum antes da realização da amostragem para a determinação de triglicéridos está descrita na literatura e, comparando (Tabela 10) os valores de B1 ( $108.52\pm 51.64$  mg/dL) e B2 ( $66.85\pm 15.13$  mg/dL) é possível observar que os indivíduos do subgrupo B1 apresentaram em média valores significativamente superiores, ( $p<0.01$ ), o que é justificado pelo facto de serem animais selvagens e não haver conhecimento do horário da última refeição antes da colheita de sangue (Montesinos *et al.*, 1997).

Por outro lado no grupo A (Tabela 9) foram os animais com permanência no GREFA (A2 -  $122.67\pm 33.78$  mg/dL) que apresentaram valores significativamente mais elevados ( $p<0.05$ ) em relação a A1 ( $92.33\pm 36.13$  mg/dL). Esta diferença revela a influência do tipo de alimentação, neste parâmetro. Assim, animais cuja dieta é pobre em gordura vão apresentar valores plasmáticos mais baixos de triglicéridos (Polo, 1995; citado por Villegas *et al.*, 2002). Este facto pode explicar o elevado grau de variabilidade em animais selvagens, uma vez que pode haver instabilidade na disponibilidade de alimento, devido a alterações na natureza, temporais e espaciais (Villegas *et al.*, 2002). A cegonha-branca em especial, apresenta uma alimentação diversificada, adaptando-se facilmente ao alimento disponível (Severo, 2009; Instinto animal, 2011), o que pode provocar alterações neste parâmetro.

Os valores obtidos são inferiores a qualquer dos estudos realizados em cegonha-branca por Puerta *et al.* (1989), Alonso *et al.* (1991), Montesinos *et al.* (1997) e Jerzak *et al.* (2010). No Gráfico 11 está representada a distribuição ordenada dos valores de triglicéridos.

**Gráfico 11.** Distribuição ordenada dos valores de TG para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.



## 2.5 Alanina aminotransferase (ALT)

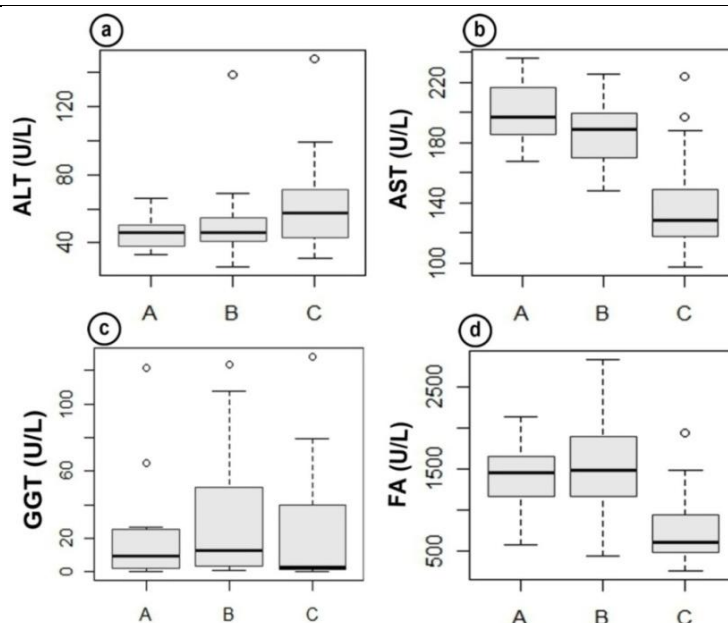
O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $51.46 \pm 19.58$  U/L, (Tabela 7), encontrando-se ligeiramente acima do intervalo de valores indicado por Campbell (2006b) para a classe das aves (19.00–50.00 U/L).

Os valores obtidos são significativamente mais elevados ( $p < 0.05$ ) nos indivíduos do grupo C ( $62.42 \pm 28.31$  U/L), em relação aos indivíduos do grupo A e B ( $46.38 \pm 9.90$  e  $49.08 \pm 16.85$  U/L, respectivamente) que apresentaram valores muito aproximados (Tabela 8).

Os valores obtidos neste estudo são bastante superiores aos obtidos por Puerta *et al.* (1989), Montesinos *et al.* (1997) e por Jerzak *et al.* (2010) em cegonha-branca. E também aos obtidos por Puerta *et al.* (1989) em cegonha-preta, não sendo em nenhum destes trabalhos estudada a influência da idade. Não foram encontradas justificações para o aumento do valor plasmático em função da idade, este facto deve ser mais estudado, uma vez que existe uma elevada variação na actividade e distribuição enzimática em função da espécie.

Este aumento no valor da ALT em função da idade está descrito também em outras espécies, nomeadamente em abetardas (Bailey *et al.*, 1999). No Gráfico 12(a) está representada a distribuição ordenada dos valores de ALT.

**Gráfico 12.** Distribuição ordenada dos valores de (a) ALT, (b) AST, (c) GGT e (d) FA nos grupos A, B e C.



## 2.6 Aspartato aminotransferase (AST)

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $179.30 \pm 32.02$  U/L (Tabela 7), encontrando-se abaixo do limite máximo indicado por Campbell (2006b) para a classe das aves ( $< 275.00$  U/L).

Neste trabalho foram obtidos valores significativamente mais baixos ( $p < 0.01$ ) nos indivíduos do grupo C ( $139.87 \pm 36.24$  U/L), quando comparando com os indivíduos do grupo A e B ( $198.65 \pm 22.36$  e  $185.71 \pm 20.03$  U/L, respectivamente) (Tabela 8). No Gráfico 12(b) está representada a distribuição ordenada dos valores de AST, sendo possível destacar dois valores aberrantes no grupo C, que podem estar relacionados com a lesão muscular, mais detalhadamente descrita adiante no tópico referente à creatina quinase.

Puerta *et al.* (1989) apresenta valores inferiores ( $98.14 \pm 7.38$  U/L) aos obtidos neste estudo e os restantes estudos em cegonha-branca apresentam valores superiores (Montesinos *et al.*, 1997; Jerzak *et al.*, 2010). A média total da amostra obtida é semelhante ao obtido para cegonha-preta por Lanzarot *et al.* (2005), no entanto, eles demonstram a presença de valores mais baixos em animais mais jovens. Villegas *et al.* (2002) e Hernandez e Margalida (2011), demonstram também que o valor de AST é mais baixo em jovens quando comparado com subadultos ( $>1$  ano) e adultos, sendo que nestas duas últimas classes não há variação.

Pelo contrário, Montesinos *et al.* (1997) e Balley *et al.*, (1999) demonstram, tal como neste estudo, uma diminuição do valor de AST com a idade, não tendo sido encontradas justificações na bibliografia consultada, importa referir a elevada variabilidade da actividade enzimática.

## **2.7 Gama glutamiltransferase (GGT)**

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $27.16 \pm 34.78$  U/L (Tabela 7). Não estão disponíveis na literatura valores de GGT em cegonha-branca nem cegonha-preta, e os valores observados nos indivíduos do grupo A, B e C ( $20.58 \pm 30.63$ ,  $30.66 \pm 34.88$  e  $25.41 \pm 39.48$  U/L, respectivamente) não demonstram a presença de alterações estatisticamente significativas ( $p = 0.60$ ) na comparação entre grupos (Tabela 8), em função da idade. No Gráfico 12(c) está representada a distribuição ordenada, sendo possível observar a presença de um intervalo grande de valores nos três grupos e também de valores aberrantes, possivelmente por variações individuais.

## **2.8 Fosfatase alcalina (FA)**

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $1\,314.64 \pm 577.32$  U/L (Tabela 7), sendo bastante mais elevado que os valores indicados por Krautwald-Junghanns, (2007) para a classe das aves (42.00-479.00 U/L).

Neste trabalho foram obtidos valores bastante aproximados nos grupos A e B ( $1432.78 \pm 383.85$  e  $1482.29 \pm 564.16$  U/L, respectivamente), ocorrendo uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) dos valores plasmáticos nos indivíduos do grupo C ( $775.35 \pm 461.00$  U/L) (Tabela 8). Este facto pode estar associado ao rápido crescimento esquelético das cegonhas, em especial nas primeiras semanas de vida, (pois os animais do

grupo C já apresentam um peso muito aproximado do adulto) em que ocorre um aumento da actividade osteoblástica, causando um aumento plasmático da FA (Scope, 2011). No Gráfico 12(d) estão representados os valores ordenados de FA e é possível observar um valor aberrante no grupo C que pode estar associado a um indivíduo mais jovem.

Um valor mais baixo e com um intervalo mais reduzido ( $947.74 \pm 57.04$  U/L) foi obtido por Puerta *et al.* (1989) em jovens de cegonha-branca. A relação entre os grupos obtida no presente trabalho, foi também descrita para outras espécies (Balley *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2002; Lanzarot *et al.*, 2005; Hernandez & Margalida, 2011), demonstrando que animais adultos apresentam valores mais baixos.

## 2.9 Lactato desidrogenase (LD)

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $967.36 \pm 609.99$  U/L, (Tabela 7), encontrando-se ligeiramente acima do limite máximo referido por Campbell (2006b) para a Classe das aves ( $< 1\ 000.00$  U/L).

Os valores obtidos neste trabalho estão incluídos num intervalo de referência muito amplo. Observando a Tabela 8, os indivíduos do grupo C ( $1544.31 \pm 1066.55$  U/L) apresentam o valor máximo de LD da amostra e valores significativamente mais elevados ( $p < 0.01$ ) que os indivíduos do grupo A e B ( $908.76 \pm 173.42$  e  $766.51 \pm 253.95$  U/L, respectivamente), facto que pode ser justificado pela libertação da isoenzima muscular na circulação, pois os indivíduos do grupo C deram entrada no centro após queda do ninho recente (Balley *et al.*, 1999). Importa referir os valores mais elevados de creatina quinase apresentados concomitantemente pelos indivíduos do grupo C e que, provavelmente não ocorreu ainda um aumento na AST devido a ser um evento agudo e esta enzima não apresentar um aumento plasmático tão rápido como a LD e CK (Fudge, 1997; Campbell, 2006b).

O mesmo fenómeno ocorre nos indivíduos do subgrupo B (Tabela 10), existindo uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) nos valores de B1 em relação a B2, sendo os primeiros mais elevados, o que pode ser devido a estes animais terem sofrido alguma espécie de lesão muscular durante a captura e manipulação, coincidindo também um aumento de CK neste subgrupo.

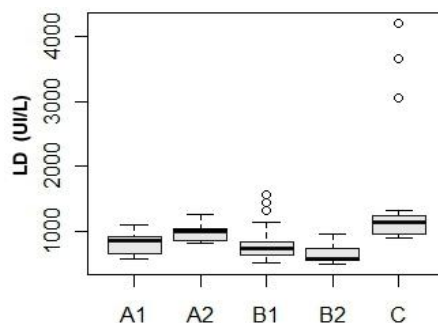
Pelo contrário, no grupo A (Tabela 9) são os indivíduos pertencentes ao subgrupo A2, ou seja, os que permaneceram durante uns dias em cativeiro, que apresentam valores medianos mais elevados ( $p = 0.19$ ), existindo também um aumento coincidente de CK nestes indivíduos, o que sugere novamente a presença de lesão muscular. A distribuição ordenada de valores está representada no Gráfico 13.

Não estão disponíveis na literatura valores de LD em cegonha-branca, no entanto a média geral da amostra aproxima-se da média obtida por Lanzarot *et al.* (2005) em cegonha-preta ( $1062.94 \pm 317.37$  U/L) e dos valores obtidos em outras espécies (Balley *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2002), cuja metodologia seguida foi a de manipulação e colheita da amostra no



próprio ninho, e foi utilizado um aparelho bioquímico automático. Hernandez e Margalida (2010) comentam no seu estudo que o aumento da actividade de LD e CK pode estar relacionado com o aumento do metabolismo basal e com a regeneração celular.

**Gráfico 13.** Distribuição ordenada dos valores de LD para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.



## 2.10 Creatina quinase (CK)

Tal como descrito para a LD e FA, também este parâmetro apresenta um intervalo médio de valores para a amostra total muito amplo variando entre  $702.43 \pm 398.09$  U/L (Tabela 7), e sendo superior ao referido por Campbell (2006b) para a classe das aves (100 – 500 U/L).

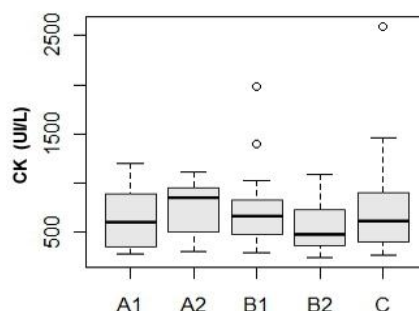
Não há diferenças estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0.66$ ), no entanto, os valores no grupo C ( $779.44 \pm 595.53$  U/L) são superiores aos obtidos nos animais do grupo A e B ( $696.20 \pm 308.14$  e  $673.23 \pm 333.94$  U/L, respectivamente) e o valor máximo da amostra foi obtido por um animal do grupo C (Tabela 8). No Gráfico 14 está representada a distribuição ordenada dos valores de CK.

Como referido no Capítulo 2, a CK é utilizada para o diagnóstico de lesões do músculo-esquelético (Fudge, 1997; Scope, 2011). No caso de animais selvagens, excluindo os factores patológicos ou terapêutica, este valor está intimamente ligado com o tempo e modo de captura, trauma, maneo e o temperamento do animal (Balley *et al.*, 1999; Lanzarot *et al.*, 2005). Como referido anteriormente os juvenis são facilmente manipulados, devido ao seu temperamento tímido, não se debatendo durante o exame físico e colheita da amostra, sendo que este factor não vai influenciar o valor de CK neste estudo. Por outro lado, os animais foram transportados para o centro em caixas transportadoras, tendo sido o tempo de captura e maneo prolongados. No grupo C, em especial, a maioria dos animais caiu do ninho durante os primeiro vôos o que pode ter causado lesão muscular e consequente aumento na CK.

Os resultados neste estudo são bastante mais elevados do que os obtidos por Montesinos *et al.* (1997) ( $229 \pm 65.3$ ;  $304 \pm 61.1$ ;  $259 \pm 80.4$  U/L), em que os animais foram manipulados e foi realizada a colheita da amostra no próprio ninho, devendo os resultados obtidos de CK estar próximos do valor fisiológico, no entanto o método bioquímico é diferente do utilizado

neste trabalho. Os valores obtidos, no grupo A e B são mais próximos do estudo realizado por Lanzarot *et al.* (2005) em cegonha-preta ( $828.72 \pm 456.42$  U/L), no entanto são inferiores aos obtidos por Hernandez e Margalida (2010) em quebra-ossos (*Gypaetus barbatus*).

**Gráfico 14.** Distribuição ordenada dos valores de CK para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.

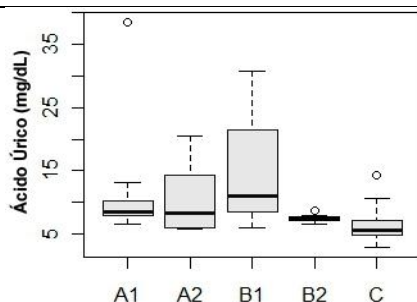


### 2.11 Ácido úrico (AU)

O intervalo médio de valores de ácido úrico obtidos para a totalidade da amostra foi de  $10.80 \pm 7.01$  mg/dL (Tabela 7), encontrando-se estes dentro do intervalo de valores indicado por Campbell (2006b) para a classe das aves ( $< 15.00$  mg/dL).

Neste estudo, quando comparando os valores obtidos nos indivíduos dos diferentes grupos (Tabela 8), os indivíduos do grupo C ( $6.29 \pm 2.85$  mg/dL) apresentam um valor significativamente inferior ( $p < 0.01$ ) aos indivíduos do grupo A e B ( $11.39 \pm 8.01$  e  $12.37 \pm 7.09$  mg/dL, respectivamente), ao contrário do que seria de esperar, uma vez que animais jovens tendem a ter valores plasmáticos de ácido úrico mais baixos (Campbell, 2006b), no entanto, ao observar as Tabelas 9 e 10 é possível encontrar uma diferença entre A1 e A2 ( $12.17 \pm 10.10$  e  $10.61 \pm 5.74$  mg/dL, respectivamente) e entre B1 e B2 ( $14.53 \pm 7.60$  e  $7.54 \pm 0.59$  mg/dL, respectivamente), sendo os valores superiores em A1 e B1, apesar de só estatisticamente significativo em B1 ( $p < 0.01$ ), que correspondem ao grupo de animais dos quais não há conhecimento do horário da última refeição e são estes valores que aumentam a média geral do grupo A e B. No Gráfico 15 está representada a distribuição ordenada dos valores de ácido úrico.

**Gráfico 15.** Distribuição ordenada dos valores de ácido úrico para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.



A média obtida do total da amostra é ligeiramente inferior aos restantes estudos realizados em jovens de cegonha-branca no estado selvagem (Puerta *et al.*, 1989; Montesinos *et al.*, 1997), aproximando-se mais do valor obtido por Jerzak *et al.* (2010) que utiliza o mesmo método bioquímico. O valor obtido em cegonha-preta por Lanzarot *et al.*, (2005) é também semelhante. Balley *et al.*, (1999) num estudo em abetardas obtiveram valores bastante mais baixos e crescentes com a idade, pois é uma espécie cuja alimentação é essencialmente de origem vegetal. Esta correlação crescente de valores com a idade foi observada em outros estudos (Villegas *et al.*, 2002).

A variação da concentração de ácido úrico pode ser justificada por factores como a quantidade de proteínas ingeridas na dieta, o estado nutricional no momento da amostragem e diferenças metabólicas (Villegas *et al.*, 2002).

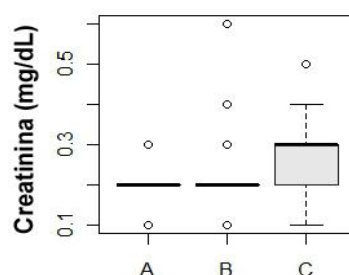
## 2.12 Creatinina

Como referido no Capítulo 2, em aves os níveis basais de creatinina são muito reduzidos. Em concordância estão os valores obtidos para a totalidade da amostra de  $0.22 \pm 0.09$  mg/dL (Tabela 7), que estão de acordo com os valores indicados por Krautwald-Junghanns (2007) e Hochleithner (1994), para a classe das aves (0.20–0.50 e 0.10–0.40, respectivamente).

Os resultados obtidos nos grupos A, B e C ( $0.21 \pm 0.06$ ,  $0.21 \pm 0.10$  e  $0.27 \pm 0.09$  mg/dL, respectivamente) (Tabela 8), não diferem significativamente ( $p=0.05$ ), apesar de haver uma tendência aos indivíduos do grupo C apresentarem valores mais elevados. No Gráfico 16 está representada a distribuição ordenada dos valores de creatinina, e é possível observar uma grande quantidade de valores aberrantes, estando este possivelmente relacionados com a variedade de alimento dos indivíduos.

Não existem na literatura valores de creatinina em cegonha-branca. Num estudo em cegonha-preta Lanzarot *et al.* (2005) obtiveram valores mais elevados e um aumento significativo, em função da idade. Mais elevados ainda foram os valores obtidos por Aengwanich *et al.* (2002) em adultos em cegonha-asiática ( $6.19 \pm 1.70$  mg/dL). Hernandez e Margalida (2010) obtêm em quebra-ossos (*Gypaetus barbatus*) valores semelhantes aos obtidos neste estudo, e sem variações em função da idade.

**Gráfico 16.** Distribuição ordenada dos valores de creatinina nos grupos A, B e C.



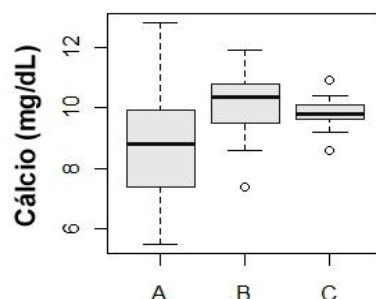
### 2.13 Cálcio

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $9.81 \pm 1.26$  mg/dL (Tabela 7), encontrando-se dentro do intervalo de valores mencionado por Campbell (2006b) para a classe das aves (8.0–11.0 mg/dL).

A média concentração plasmática de cálcio obtida nos indivíduos do grupo A ( $8.89 \pm 1.84$  mg/dL) foi significativamente inferior ( $p < 0.01$ ) à encontrada no grupo B e C ( $10.20 \pm 0.95$  e  $9.80 \pm 0.51$  mg/dL, respectivamente), (Tabela 8), facto que é justificado por os indivíduos mais jovens necessitarem do cálcio para a formação do esqueleto, reduzindo a concentração de cálcio plasmática (Balley *et al.*, 1999; Campbell, 2006b). No Gráfico 17 está representada a distribuição ordenada dos valores de cálcio plasmático.

Não estão disponíveis na literatura valores de cálcio plasmático em cegonha-branca. No estudo realizado por Lanzarot *et al.*, (2005) em cegonha-preta os valores são ligeiramente superiores e não é possível fazer a correlação com a idade, mas estudos realizados em outras espécies relatam também estes valores mais baixos em indivíduos mais jovens (Balley *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2002).

**Gráfico 17.** Distribuição ordenada dos valores de cálcio nos grupos A, B e C.



### 2.14 Fósforo

O intervalo médio de valores obtido para a totalidade da amostra foi de  $5.61 \pm 1.04$  mg/dL (Tabela 7), encontrando-se dentro do intervalo de valores mencionado por Campbell (2006b) para a classe das aves (5.0–7.0 mg/dL).

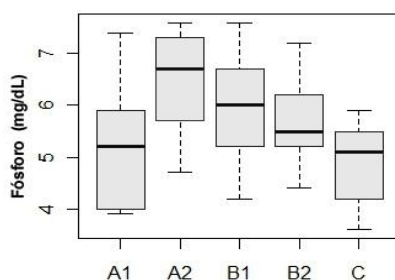
Ao contrário do que sucede com o cálcio, animais jovens e em crescimento tendem a ter concentrações plasmáticas de fósforo mais elevadas do que os adultos, e não foram encontradas alterações consoante o género (Campbell, 2006b). Os valores obtidos nos grupos A e B ( $5.79 \pm 1.27$  e  $5.84 \pm 0.87$  mg/dL, respectivamente) são significativamente mais elevados ( $p < 0.01$ ) que no grupo C ( $4.85 \pm 0.80$  mg/dL) (Tabela 8).

Observando ainda os valores obtidos nos indivíduos de cada subgrupo é possível encontrar diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) no grupo A (Tabela 9), e comparando as médias dos subgrupos A1 e A2 ( $5.13 \pm 1.21$  e  $6.46 \pm 0.99$  mg/dL, respectivamente), os valores são sugestivos da influência do tipo de dieta no valor do fósforo plasmático. No entanto, esta diferença inverte-se no grupo B (Tabela 10), sendo os indivíduos do subgrupo B1 os que apresentam valores mais elevados de fósforo, apesar de não ser estatisticamente significativo ( $p = 0.22$ ). No Gráfico 18 está representada a distribuição ordenada dos valores de fósforo plasmático.

Tal como para o cálcio, também não estão disponíveis na literatura valores de fósforo plasmático em cegonha-branca, e os valores obtidos em cegonha-preta por Lanzarot *et al.*, (2005) são bastante semelhantes aos obtidos neste trabalho ( $6.29 - 0.87$  mg/dL), sendo também notório a redução do valor com o crescimento.

Estudos realizados em outras espécies demonstram que indivíduos jovens apresentam valores significativamente mais elevados que adultos, diminuído a concentração deste metabolito com a idade (Villegas *et al.*, 2002; Hernandez & Margalida, 2010).

**Gráfico 18.** Distribuição ordenada dos valores de fósforo para os grupos A, B e C, separando os indivíduos do grupo A em A1 e A2 e os indivíduos do grupo B em B1 e B2.



Observando ainda na Tabela 11, o rácio Ca/P, é possível observar que todos os indivíduos da amostra obtiveram valor superior a 1, o que está de acordo com a literatura (Scope, 2011).

**Tabela 11.** Valores do rácio Ca/P por grupo e para a amostra

Amostra	n	Rácio Ca/P	
		$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo - Máximo
Grupo A	18	1.59 ± 0.42	1.12 – 2.46
Grupo B	42	1.78 ± 0.30	1.30 – 2.36
Grupo C	17	2.08 ± 0.40	1.51 – 2.81
Amostra Total	77	1.80 ± 0.39	1.12 – 2.81

É possível ainda observar que animais mais jovens apresentam um rácio significativamente mais baixo ( $p < 0.01$ ) sendo a quantidade de cálcio plasmática cerca de 1,5x a quantidade de fósforo, sendo que nestes indivíduos foram observadas maiores concentrações de fósforo e menores concentrações de cálcio, quando comparando com indivíduos do grupo B e C, em que a quantidade de cálcio é 2x a quantidade de fósforo.

### 3. Discussão final

Após apresentação dos resultados e discussão dos mesmos, este tópico aparece pela necessidade de sintetizar os dados reportados anteriormente.

Ao realizar um estudo preliminar para definir intervalos e limites de referência em animais saudáveis, é necessário descrever o que é considerado “saudável” na população de referência, sendo que neste estudo foi considerada a definição “Livre de doença física ou dor” (Merriam Webster’s Collegiate dictionary, 2011). No entanto este facto pode interferir nos resultados, uma vez que os indivíduos foram considerados saudáveis tendo por base apenas o exame físico.

Na análise de um painel hematológico ou bioquímico é importante considerar a presença de uma variação considerável que pode ser encontrada em animais saudáveis, provocada por alterações fisiológicas (idade, género, estado reprodutivo, ritmo circadiano, localização geográfica) e por diferenças analíticas inter e intra-laboratório (Clark et al., 2009).

Com o intuito de excluir a influência dos factores artefactuais todas as amostras foram processadas o mais rápido possível.

Em relação à influência dos factores fisiológicos, é importante ter em conta que a amostra foi dividida em 3 grupos, por intervalos de peso e como tal há indivíduos incluídos num grupo com peso aproximado do limite inferior ou superior, o que pode levar a variações dentro dos grupos. A excitabilidade dos indivíduos pode também ter influenciado os resultados, no entanto esta vai sempre estar presente em qualquer colheita realizada em animais selvagens.

O método analítico de processamento foi igual para todas as amostras, no entanto o método de colheita foi sujeito a uma variação consoante o operador, sendo que a variação do operador e o tamanho da amostra podem ter tido influência nos resultados.

Deste modo, para simplificar, o ideal seria a harmonização dos métodos, sendo o mesmo adoptado por todos os laboratórios, e a subcategorização da população em estudo, de modo a reduzir significativamente a variação dentro do grupo e produzir intervalos de referência mais rigorosos, pois quanto mais padronizadas as condições de testagem e mais específicas as características da população de referência, mais preciso será o diagnóstico realizado pelo clínico (Klee, 2004).

A escassez de valores de referência no campo da hematologia e bioquímica sanguínea, em animais selvagens, é provavelmente devida a dificuldades que envolvem a colheita de dados desses animais, e em alguns casos, pelo facto de a medicina dos animais selvagens apresentar pouco interesse económico. Além disso, a realização de exames laboratoriais de rotina em centros de recuperação de fauna selvagem também é complicada, pelo que nem sempre é fácil realizar trabalhos desta índole (Gelli et al., 2009).

## CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

No presente estudo são reportados dados sobre as características hematológicas e bioquímicas sanguíneas de indivíduos jovens de cegonha-branca no estado selvagem, ingressados no GREFA, um Centro de Recuperação localizado em Madrid, Espanha (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O).

O principal grande objectivo deste trabalho foi a obtenção de valores hematológicos e bioquímicos em jovens de cegonha-branca no estado selvagem, com idade compreendida entre 20 e 70 dias. Tendo sido estes valores revelados ao longo da apresentação de resultados.

Foi também realizado um estudo da influência da idade nos parâmetros hematológicos, sendo os resultados sugestivos de um aumento do hematócrito e contagem total de eritrócitos e, de uma redução da contagem total de leucócitos com o crescimento. Não tendo sido encontradas alterações no valor da contagem total de trombócitos com o crescimento.

Em relação à influência da idade nos parâmetros bioquímicos, os resultados foram sugestivos de um aumento nos valores plasmáticos de cálcio, glucose, proteínas totais e ALT e, uma redução no valor plasmático de fósforo, fosfatase alcalina e AST em função da idade. Não tendo sido encontradas alterações no valor plasmáticos de LD, CK, GGT, ácidos biliares, triglicéridos, ácido úrico e creatinina com o crescimento.

Em relação à influência do período de jejum nos parâmetros bioquímicos em estudo, os resultados foram sugestivos de um aumento pós-prandial nos valores plasmáticos de ácidos biliares, ácido úrico e triglicéridos.

No que toca à morfologia celular. Não foram encontradas diferenças significativas em relação às descrições celulares encontradas na bibliografia consultada. Importa ainda referir a classificação da espécie cegonha-branca como graculocítica.

Em relação à pesquisa de hemoparasitas, estes não foram detectados em nenhum indivíduo da amostra. Na pesquisa realizada procurou-se não só detectar situações patogénicas para o indivíduo, mas também ter uma amostra das parasitoses que afectam esta espécie no estado selvagem. Existem ainda poucos estudos realizados a nível das espécies de parasitas que infestam a avifauna autóctone, qual a sua prevalência e efeitos a nível individual e da população. Devido à elevada variabilidade inter-específica da presença de hemoparasitas, a existência de estudos que revelam a ausência e presença de hemoparasitas, são de extrema importância, pois existe a necessidade de comparar espécies ou populações infectadas e não infectadas, para determinar a distribuição dos hemoparasitas consoante as características das espécies ou habitats.

Em relação à determinação das proteínas plasmáticas podemos concluir que com o método do refractómetro é obtida uma sobrestimação do valor plasmático, devendo este ser



utilizado apenas como método auxiliar. Como tal será aconselhada a determinação deste parâmetro pelo método do biureto ou por electroforese.

Os valores obtidos na contagem total de leucócitos foram em todos os grupos superiores quando esta foi realizada pelo método estimativo. No entanto, este facto não nos permite tirar conclusões devido ao número reduzido de indivíduos a que foi realizada contagem pelo método directo. De futuro é aconselhada a realização dos dois métodos no mesmo indivíduo para ser possível a comparação.

O presente estudo pode apresentar algumas limitações, na incidência da amostra, na abrangência dos factores fisiológicos testados, e no método utilizado. Como tal, neste capítulo serão efectuadas algumas recomendações para estudos futuros, tendo sempre em conta que qualquer estudo deve ser partilhado, quer apresente resultados positivos ou negativos.

Deste modo, o ideal seria contar com uma amostra grande, de modo a permitir a subcategorização, sem diminuir a fiabilidade dos resultados. O sexo, a idade e localização geográfica de cada indivíduo devem ser conhecidos de modo a excluir a influência destes factores dos resultados obtidos. A colheita deve ser realizada diariamente, sempre a uma hora constante, de modo a excluir a influência do ritmo circadiano. E se possível o estudo deve ser prolongado no tempo, realizando várias colheitas em estações diferentes de modo a permitir inferir acerca da influência sazonal. Seria também interessante um estudo nesta espécie comparando os parâmetros de indivíduos de primeiro ano, com os indivíduos que já foram sujeitos às intempéries da migração. Por último, todos os testes deveriam ser realizados em duplicado, o que implicaria um maior financiamento, nem sempre viável.

Em suma, apesar de todas as limitações, os valores de hematologia e bioquímica sanguínea obtidos neste estudo para jovens de cegonha-branca selvagens, deverão ter utilidade de futuro, na interpretação de análises laboratoriais e estudo de casos clínicos de indivíduos que ingressem em centros de recuperação. No entanto, mais estudos deverão ser realizados.

Embora na última década tenha havido grande evolução no conhecimento da medicina de aves, como foi possível concluir pela bibliografia consultada, uma grande parte desse avanço foi devido a um progresso na clínica de aves exóticas e na indústria das aves de capoeira, faltando ainda aprofundar o conhecimento na área da fauna selvagem, para que no futuro seja possível a realização do diagnóstico em vida de doenças em aves selvagens, para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para cada animal, população ou zona de intervenção do Médico Veterinário especializado em Clínica de Fauna Silvestre.

## Bibliografía

---

- Aengwanich W., Tanomtong A., Pattanarungson R. & Simaraks S. (2002). Blood cell characteristic, hematological and serum biochemistry values of painted stork (*Mycteria leucocephala*). *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 24, 473-479.
- Alonso J.C., Huecas V., Alonso J.A., Abelenda M., Muñoz-Pulido R. & Puerta M.L. (1991). Hematology and blood chemistry of adult white storks (*Ciconia ciconia*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 98, 395–397.
- Alonso-Alvarez C. & Ferrer M. (2001). A biochemical study about fasting, subfeeding and recovery processes in yellow-legged gulls. *Physiological and biochemical zoology*, 74, 703–713.
- Alonso-Alvarez C. (2005). Age-dependent changes in plasma biochemistry of yellow-legged gulls (*Larus cachinnans*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 140, 512-518.
- Andreansen J.R., Andreansen C.B., Sonn A.B. & Robeson D.C. (1996). The effects of haemolysis on serum chemistry measurements in poultry. *Avian Pathology*, 25, 519-536.
- Balley T.A., Wernery U., Howlett J., Naldo J. & Samour J.H. (1999). Age-related plasma chemistry changes in houbara and kori bustards in the United Arab Emirates. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 31-37.
- BirdLife International (2004). Birds in Europe: Population Estimates, Trends and Conservation Status. BirdLife Conservation Series nº 10, BirdLife International, Cambridge.
- Blanco G., Gajón A., Doval G. & Martínez F. (1998). Absence of blood parasites in griffon vultures from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(3), 640-643.
- Blas, J., Baos, R., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A. & Hiraldo, F. (2006). Age-related variation in the adrenocortical response to stress in nestling white storks (*Ciconia ciconia*) supports the developmental hypothesis. *General and Comparative Endocrinology*, 148, 172–180.
- Boyd, J.W. (1983). The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals [Abstract]. *Veterinary Clinical Pathology*, 12, 9-24.
- Briscoe J. A., Rosenthal K.L. & Shofer F.S. (2010). Selected complete blood cell count and plasma protein electrophoresis parameters in pet psittacine birds evaluated for illness. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 24(2), 131-137.
- Campbell, T.W. (1994). Hematology. In B.W.Ritchie, G.J. Harrison & L.R. Harrison (Eds.), *Avian medicine: Principles and Application*. (pp.176-198). Florida: Wingers Publishing.

- Campbell, T. W. (1995a). Avian hematology. In T. W. Campbell (Ed.) *Avian hematology and cytology*. (2nd Ed.). (pp. 3–19). Iowa: Iowa State University Press, Ames.
- Campbell, T. W. (1995b). Cytological Evaluation of Normal Avian Bone Marrow and Ectopic Hematopoietic tissue. In T. W. Campbell (Ed.) *Avian hematology and cytology*. (2nd Ed.). (pp. 20–29). Iowa: Iowa State University Press, Ames.
- Campbell T.W. (2006a). Hematology of birds. In M.A. Thrall, D.C. Baker, T.W. Campbell, D. DeNicola, M.J. Fettman, E.D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (pp. 225-258). Iowa: Blackwell Publishing.
- Campbell T.W. (2006b). Clinical chemistry of birds. In M.A. Thrall, D.C. Baker, T.W. Campbell, D. DeNicola, M.J. Fettman, E.D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds), *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (pp. 479-492). Iowa: Blackwell Publishing.
- Casotti G., Richardson K.C. (1992) A stereological analysis of kidney structure of honeyeater birds (*Meliphagidae*) inhabiting either arid or wet environments [Abstract]. *Journal of Anatomy*, 180, 281-288.
- Clark, P., Boardman, W. & Raidal, S. (2009). *Atlas of clinical avian hematology*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Coke R.L., West G.D. & Hoover J.P. (2004). Hematology and Plasma Biochemistry of captive Puna Ibis (*Plegadis ridgwayi*). *Journal of Wildlife Diseases*, 40(1), 141-144.
- Costa D., Anza I. & Brandão R. (2011) Distribuição e prevalência de hematozoários de aves selvagens na região centro e interior norte de Portugal. Poster apresentado na VII Congresso de Ornitologia da SPEA & I Jornadas Macaronésicas de Ornitologia, Machico, Madeira, 29 a 31 de Outubro de 2011.
- Cray C., Gautier D., Harris D.J. & Arheart K.L. (2008). Changes in clinical enzymes activity and bile acid levels in psittacine birds with altered liver function and disease. *Journal of avian medicine and surgery*, 22(1), 17-24.
- Decreto-Lei n.º 103/80 de 11 de Outubro. Diário da República nº 236 – Série I. Ministério dos Negócios Estrangeiros, Direcção Geral dos Negócios Económicos. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 140/99, de 12 de Abril. Diário da República nº 96 – Série I-A. Ministério do Ambiente. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 316/89 de 22 de Setembro. Diário da República nº 219 – Série I. Ministério do Planeamento e da Administração do Território. Lisboa.
- Denbow M. (2000). Gastrointestinal anatomy and physiology. In: In G.C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology*. (5th ed.). (pp. 299–326). California: Academic Press.
- Dhabhar F.S. & McEwen B.S. (1997). Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking. *Brain, Behavior and Immunity*, 11, 286–306

- Doneley, B. (2010). Interpreting diagnostic tests. In B. Doneley (Ed.), *Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds*. (pp. 69-91). London: Manson Publishing.
- Donovan, T.A., Schrenzel, M., Tucker, T.A., Pessier, A.P. & Stalis, I.H. (2008). Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 304-313.
- Dubin S. & Hunt P. (1978). Effect of anticoagulants and glucose on refractometric estimation of protein in canine and rabbit plasma. *Laboratory Animal Science*, 28, 541-544.
- Dujowich M., Mazet J.K. & Zuba J.R. (2005). Hematologic and biochemical reference ranges for captive California Condors (*Gymnogyps californianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36, 590–597.
- Dutton, C.J., Allchurch, A.F. & Cooper, J.E. (2002). Comparison of hematologic and biochemical reference ranges between captive populations of northern bald ibises (*Geronticus eremita*). *Journal of Wildlife Diseases*, 38, 583–588.
- Fair J., Whitaker S. & Pearson B. (2007). Sources of variation in haematocrit in birds [Abstract]. *Ibis*, 149(3), 535-552.
- Forrester D. J., Greiner E.C., Bennett G.F. & Kigaye, M.K. (1977). Avian Haemoproteidae. 7. A review of the haemoproteids of the family *Ciconiidae* (storks) and descriptions of *Haemoproteus brodkorbi* sp. nov. and *H. peircei* sp. nov. [Abstract]. *Canadian Journal of Zoology*, 55, 1268-1274.
- Fudge, A.M. (1997). Avian clinical pathology-hematology and chemistry. In R.B. Altman, K. Quesenberry, G. Dorrestein & S. Clubb (Eds.), *Avian Medicine and Surgery*. (pp. 142-157). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Fudge, A.M.(2000). Avian complete blood count. In A.M. Fudge (Ed.), *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. (pp.9-18). Philadelphia: W.B. Saunders Company.\*\*
- Gasper P.W. (2000) The Hematopoietic System. In B.F. Feldman, J.G. Zinkl, N.C. Jain (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (5<sup>th</sup> Ed.). (pp. 63-68). Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Williams.
- Gelli D., Ferrari V., Franceschini F., Lai O., Laricchiuta P., Zanella A., Bernardini D. & Romagnoli S. (2009). Serum Biochemistry and Electrophoretic Patterns in the Eurasian Buzzard (*Buteo buteo*): Reference Values. *Journal of Wildlife Diseases*, 45 (3), 828-833
- George J.W. (2001). The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. *Veterinary Clinical Pathology*, 30, 201-210.

- Goldstein D.L. & Skadhauge E. (2000). Renal and extrarenal regulation of body fluid composition. In: In G.C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology*. (5<sup>th</sup> Ed.). (pp. 265–298). San Diego, California: Academic Press.
- Guzman D.S.M., Mitchell M.A., Gaunt S.D., Beaufrère H., & Tully T.N. (2008). Comparison of hematologic values in blood samples with lithium heparin or dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid coagulants in hispaniolan amazon parrots (*Amazona ventralis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22(2), 108-113.
- Haefele, H.J., Sidor, I., Evers, D.C., Hoyt, D.E. & Pokras, M.A. (2005). Hematologic and physiologic reference ranges for freeranging adult and young common loons (*Gavia immer*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36, 385–390.
- Harr K.E. (2002). Clinical Chemistry of companion avian species: A review. *Veterinary Clinical Pathology*, 31(3), 140-151
- Harr K.E. (2006) Diagnostic value of biochemistry. In: G.J. Harrison & T.L. Lightfoot (Eds.): *Clinical avian medicine*, Volume II. (pp. 611-629). Palm Beach, Florida: Spix Publishing.
- Harris D.J. (2009). Clinical tests. In T.N. Tully, G.M. Dorrestein & S.K. Jones (Eds.), *Handbook of Avian Medicine*. (2<sup>nd</sup> Ed.). (pp. 43-51). Oxford: Saunders Elsevier.
- Hawkey C. M., Hart M. C. & Samour H.J. (1984). Age-related haematological changes and haemopathological responses in Chilean flamingos (*Phoenicopterus chilensis*). *Avian Pathology*, 13, 223-228.
- Hernández, M. & Margalida, A. (2010). Hematology and Blood Chemistry Reference Values and Age-related Changes in Wild Bearded Vultures (*Gypaetus barbatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 390-400.
- Hochleithner M. (1994). Biochemistries. In B.W. Ritchie, G.J. Harrison & L. R. Harrison (Eds.): *Avian medicine: principles and application*. (pp. 223-245). Florida: Wingers Publishing.
- Howlett J.C., Bailey T.A., Samour J.H., Naldo J.L. & D'Aloia M.A. (2002). Age-related hematologic changes in captive-reared houbara, white-bellied, and rufous-crested bustards. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4), 804-816.
- ICNB (2004). V Censo nacional de cegonha-branca (*Ciconia ciconia*) – integrado no VI censo mundial de cegonha-branca. Acedido em Set. 12, 2011, disponível em: <http://portal.icnb.pt/NR/rdonlyres/8825E19A-1841-4AD3-BEB5-4B8A2D4F86D1/0/RELATÓRIOVCensonacionaldeCegonhabranca.pdf>
- ICNB (2006) Plano sectorial da rede natura 2000. Acedido em Set. 13, 2011, disponível em: [http://www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao\\_valores\\_naturais/FAUNA/aves/Ciconia%20ciconia.pdf](http://www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/FAUNA/aves/Ciconia%20ciconia.pdf)
- ICNB (2008). *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal*. (3<sup>rd</sup> Ed.) (pp. 549). Lisboa: Assírio & Alvim.

- Instinto animal. (prod). (Junho, 24, 2011). *Cigüeñas*: vídeo [In: <http://www.youtube.com/user/jpd691234#p/u/20/Zlsr8l8ESGs>]. Espanha, Comunidade de Madrid: TeleMadrid.
- ISIS (2002). Reference for physiological values in captive wildlife, CD-ROM. *International Species Inventory System*. Minnesota: Apple Valley.
- IUCN (2004). The IUCN red list of threatened species. Acedido em Set. 13, 2011, disponível em: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>
- Jaensch S. (2000). Diagnosis of avian hepatic diseases. *Seminars in avian and exotic pet medicine*, 9(3), 126-135
- Jenni-Eiermann S. & Jenni L. (1998). What can plasma metabolites tell us about the metabolism, physiological state and condition of individual birds? An overview. *Biol Cons Fauna*, 102, 312–319
- Jenni, L., Müller, S., Spina, F., Kvist, A. & Linström, Å. (2006). Effect of endurance flight on haematocrit in migrating birds. *Journal of Ornithology*, 147, 531–542.
- Jerzak L., Sparks T.H., Kasprzak M., Bochenski M., Kaminski P., Wisniewska E., Mroczkowski S. & Tryjanowski P. (2010). Blood chemistry in white storks (*Ciconia ciconia*) chicks varies by sex and age. *Comparative biochemistry and physiology, Part B*, 156, 144-147
- Johnston M.S. & Ivey E.S. (2002). Parathyroid and Ultimobranchial Glands: Calcium Metabolism in Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11(2), 84-93. Acedido em Set. 26, 2011, disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=273128&\\_user=2459750&\\_pii=S1055937X0680006X&\\_check=y&\\_origin=&\\_coverDate=30-Apr-2002&view=c&wchp=dGLbVIV-zSkzS&md5=b187f371a238dbb601caa0a7f5073075/1-s2.0-S1055937X0680006X-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=273128&_user=2459750&_pii=S1055937X0680006X&_check=y&_origin=&_coverDate=30-Apr-2002&view=c&wchp=dGLbVIV-zSkzS&md5=b187f371a238dbb601caa0a7f5073075/1-s2.0-S1055937X0680006X-main.pdf)
- Jovani R., Tella J. L., Blanco G. & Bertellotti M. (2002). Absence of haematozoa on colonial White Storks *Ciconia ciconia* throughout their distribution range in Spain. *Ornis Fennica*, 79, 41-44.
- Kalmbach, E., Griffiths, R., Crane, J.E. & Furness, R.W. (2004). Effects of experimentally increased egg production on female body condition and laying dates in the great skua (*Stercorarius skua*). *Journal of Avian Biology*, 35(6), 501–514.
- Klee G.G. (2004) Clinical interpretation of reference intervals and reference limits. A plea for assay harmonization. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 42(7), 752–757.
- Krautwald-Junghanns, M. (2007). Aids to Diagnosis. In B.H. Coles (Eds.), *Essentials of avian medicine and surgery*. (3rd Ed). (pp. 56-102). Oxford, Iowa, Victoria: Blackwell Publishing.

- Lanzarot M.P., Barahona M.V., SanAndres M.I., Fernández-Garcia M. & Rodríguez C. (2005). Hematologic, Protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). *Journal of Wildlife Diseases*, 41(2), 379-386.
- Landys-Cianelli, M.M., Jukema, J. & Piersma, T. (2002). Blood parameter changes during stopover in a long-distance migratory shorebird, the bar-tailed godwit (*Limosa lapponica taymyrensis*). *Journal of Avian Biology*, 33(4), 451–455.
- Lierz M. (2003). Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Veterinary Clinics of Exotic Animal*, 6, 29–55.
- Limiñana, R., López-Olvera, J.R., Gallardo, M., Fordham, M. & Urios, V. (2009). Blood chemistry and hematologic values in freeliving nestlings of Montagu's harriers (*Circus pygargus*) in a natural habitat. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(4), 687–695.
- Lumeij J.T. & DeBruijne, J.J. (1985). Evaluation of refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. *Avian Pathology*, 14, 441-444.
- Lumeij J.T. (1987). Plasma urea, creatinine and uric acid concentrations in response to dehydration in racing pigeons (*Columba livia domestica*), *Avian Pathology*, 16(3), 377-382.
- Lumeij J.T. & Wolfswinkel J. (1988). Blood chemistry reference values for use in columbine hepatology. *Avian Pathology*, 17, 515-517.
- Lumeij J.T., DeBruijne J.J., Slob A., Wolfswinkel J. & Rothuizen J. (1988a). Enzyme activities in tissues and elimination half-lives of homologous muscle and liver enzymes in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology*, 17, 851-864.
- Lumeij J.T., Meidam M., Wolfswinkel J., Van der Hage M.H. & Dorrestein G.M. (1988b). Changes in plasma chemistry after drug-induced liver disease or muscle necrosis in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology*, 17, 865-874.
- Lumeij, J.T. & Remple, J.D. (1991). Plasma urea, creatinine and uric acid concentrations in relation to feeding in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Avian Pathology*, 20, 79-83.
- Lumeij J.T., Remple J.D. (1992). Plasma bile acid concentration in response to feeding in peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Avian Diseases*, 36, 1060-1062.
- Lumeij J.T. (1994a). Hepatology. In B.W. Ritchie, G.J. Harrison & L. R. Harrison (Eds), *Avian medicine: principles and application*. (pp. 522-537). Florida: Wingers Publishing.
- Lumeij J.T. (1994b) Nephrology. In B.W. Ritchie, G.J. Harrison & L. R. Harrison (Eds.), *Avian medicine: principles and application*. (pp. 538-555). Florida: Wingers Publishing.

- Madroño A., González C. & Atienza J. C. (2004). Libro Rojo de las aves de España. España, Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Ministerio del Medio Ambiente, Sociedad Española de Ornitología, BirdLife. Acedido em Novembro 11, 2011, disponível em: <http://www.seo.org/media/docs/LR%20completo%20para%20web.pdf>
- Martín J.P. (2003). *Naturaleza en Alcalá 3: Las cigüeñas de Alcalá*. Instituto de Planificación y Gestión Ambiental, Concejalía de Ciudad Sostenible, Ayuntamiento de Alcalá de Henares, (2<sup>nd</sup> Ed).
- Martínez-Abraín A., Esparza B. & Oro D. (2004) Lack of blood parasites in bird species: does absence of blood parasite vectors explain it all?. *Ardeola*, 51(1), 225-232.
- Martinho F. & Melo P. (2002) Prevalência de Hematozoários em Aves Silvestres Admitidas no Centro de Recuperação de Animais Selvagens do Parque Florestal de Monsanto (C.R.A.S.P.F.M.). Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002], SPCV, Oeiras, 10-12 Out.
- Martinsen, E.S., Blumberg, B.J., Eisen, R.J. & Schall, J.J. (2008). Avian Hemosporidian Parasites from Northern California Oak Woodland and Chaparral. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(2), 260–268.
- Marzal A., Lope F., Navarro C. & Moller A. (2005). Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*, 142, 541-545.
- McSherry B.J. & Al-Baker J. (1976). Comparison of total serum protein determined by T/S meter and biuret technique. *Bull Amer Soc Vet Clin Path*, 3(4)-12.
- Merriam Webster's Collegiate dictionary (2011). Merriam-Webster, Incorporated. Acedido em Nov. 15, 2011, disponível em: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/health>.
- Mohri M., Rezapoor H. (2009). Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: comparison with serum. *Research in Veterinary Science*, 86, 111-114.
- Molina B., delMoral J.C. (2004). La cigüeña blanca en España: VI Censo Internacional. Acedido em Set. 22, 2011, disponível em: [http://www.seo.org/media/fotos/4\\_cigue%C3%B1ablanca04.pdf](http://www.seo.org/media/fotos/4_cigue%C3%B1ablanca04.pdf)
- Montesinos, A., Sainz, A., Pablos, M.V., Mazzucchelli, F. & Tesouro, M.A. (1997). Hematological and plasma biochemical reference intervals in young white storks. *Journal of Wildlife Diseases*, 33, 405–412.
- Naidoo V., Diekmann M., Wolters K., Swan G.E. (2008). Establishment of selected baseline blood chemistry and hematologic parameters in captive and wild-caught african White-backed vultures (*Gyps africanus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 44, 649-654.
- Peirce M. A. (1981). Distribution and host-parasite checklist of the haematozoa of birds in Europe [Abstract]. *Journal of Natural History*, 15, 419-458.



- Pendl, H. (2006). Morphological changes in red blood cells of birds and reptiles and their interpretation. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61. Acedido em Julho 17, 2011, disponível em: [http://www.isrvma.org/ImageToArticle/Files/Vol\\_%2061\\_1.doc](http://www.isrvma.org/ImageToArticle/Files/Vol_%2061_1.doc)
- Pendl, H. & Samour, J. (2009). Avian hematology. In A. Martel, T. Bailey, J. Chitty, N.Harcourt-Brown, J.M. Hatt, & M.Jones (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Antwerp, 17th – 21st March 2009, pp.513-523.
- Pendl, H. (2011a). Practical aspects of avian immunology. In J. Samour & A. Montesinos (Eds), *Proceedings of the 11th European Association of Avian Veterinarians Conference and 1st Scientific European Collage of Zoological Medicine Meeting*, Madrid, 26th – 30th April 2011, pp.340-348.
- Pendl, H. (2011b). Avian and reptilian haematology. In J. Samour & A. Montesinos (Eds), *Proceedings of the 11th European Association of Avian Veterinarians Conference and 1st Scientific European Collage of Zoological Medicine Meeting*, Madrid, 26th – 30th April 2011, pp.550-564.
- Prinzinger R. & Misovic A. (2010). Age-correlation of blood values in the Rock Pigeon (*Columba livia*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 156, 351-356.
- Puerta, M.L., Muñoz-Pulido, R., Huecas, V. & Abelenda, M. (1989). Hematology and blood chemistry of chicks of white and black storks (*Ciconia ciconia* and *Ciconia nigra*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 94, 201–204.
- R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Raptor Rescue (2010). Rehabilitation Handbook. Acedido em Set. 15, 2011, disponível em: [http://wildpro.twycrosszoo.org/000ADOBES/D389\\_RaptorRescueHANDBOOK\\_V2.pdf](http://wildpro.twycrosszoo.org/000ADOBES/D389_RaptorRescueHANDBOOK_V2.pdf)
- Reagen W.J., Sanders T.G. & DeNicofa D.B. (1999). Hematopoyesis. In W.J. Reagen, T.G. Sanders & D.B. DeNicofa. *Hematología veterinária: Atlas de especies domésticas comunes*. (pp. 3-12). Espanha: Harcourt Brace.
- Rehder, N.B., Bird, D.M., Laguë, P.C. & Mackay, C. (1982). Variation in selected hematological parameters of captive redtailed hawks. *Journal of Wildlife Diseases*, 18(1), 105–109.
- Rodriguez E. M. (1987). *Cuadernos Madrileños de la Naturaleza: Estudio de la cigüeña blanca en la comunidad de Madrid*. Comunidad de Madrid: Consejería de Agricultura y Ganadería, Dirección General del Medio Rural, Servicio del Medio Natural.
- Rosa G., Encarnação V. & Candelária M. (2004). *V Censo Nacional de Cegonha-branca (Ciconia ciconia)*. Acedido em Set. 19, 2011, disponível em: <http://portal.icnb.pt/NR/rdonlyres/8825E19A-1841-4AD3-BEB54B8A2D4F86D1/0/RELAT%C3%93RIOVCensonacionaldeCegonhabranca.pdf>

- Rosa G. (2006) *Monitorização dos efectivos nidificantes de cegonha-branca (Ciconia ciconia) em Portugal: resultados gerais de 2006*. Acedido em Set. 12, 2011, disponível em: <http://portal.icnb.pt/NR/rdonlyres/E601C3D1-B5B1-497E-8889EAA44FDDC7EB/0/MonitorizaçãodeCegonhabranca2006.pdf>
- Salakij C, Salakij J, Narkkong N, Pitakkingthong D & Poothong S. (2003). Hematology, morphology, cytochemistry and ultrastructure of blood cells in painted stork (*Mytheria leucocephala*). *Kasetsart Journal of Natural Science*, 37, 506–513.
- Samour, J. (2000). *Avian Medicine*. (2<sup>nd</sup> Ed). London: Mosby Elsevier.
- Samour, J. (2006a). Diagnostic Value of Hematology. In G.J. Harrison & T.L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine, Vol II*. (pp. 587-609). Florida: Spix Publishing.
- Samour, J. & Pendl, H. (2009). The value of hematology in avian clinical practice. In A.Martel, T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, J.M. Hatt, & M.Jones (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Antwerp, 17th – 21st March 2009, pp. 283-289.
- Scope, A. (2011). Clinical chemistries in birds. In J. Samour & A. Montesinos (Eds), *Proceedings of the 11th European Association of Avian Veterinarians Conference and 1st Scientific European Collage of Zoological Medicine Meeting*, Madrid, 26th – 30th April 2011, pp. 520-564.
- Severo A. (2009). *Monitorização da população de cegonha-branca (Ciconia ciconia) nos concelhos de Alcoutim e Castro Marim em Vila Real de Santo António*. Acedido em Set. 12, 2011, disponível em: [http://portal.icnb.pt/NR/rdonlyres/01527235-CCF9-48FE-A780-FA1BF5D30681/0/Monit\\_Pop\\_Cegonhabranca.pdf](http://portal.icnb.pt/NR/rdonlyres/01527235-CCF9-48FE-A780-FA1BF5D30681/0/Monit_Pop_Cegonhabranca.pdf)
- Shurulinkov P. & Mihaela I. (2009). Spatial and temporal differences in the blood parasite fauna of passerine birds during the spring migration in Bulgaria. *Parasitology Research*, 104, 1453-1458.
- Smith F.M., West N.H. & Jones D.R. (2000). The cardiovascular system In: G.C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology*. (5th Ed.). (pp. 141–232). San Diego, California: Academic Press.
- Sol D., Jovani R. & Torres J. (2003). Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia*, 135, 542-547.
- Spagnolo V., Crippa V., Marzia A. & Sartorelli P. (2006). Reference intervals for hematologic and biochemical constituents and protein electrophoretic fractions in captive common buzzards (*Buteo buteo*). *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 82-87.
- Spagnolo V., Crippa V., Marzia A. & Sartorelli P. (2008) Hematologic, biochemical, and protein electrophoretic values in captive tawny owls (*Strix aluco*). *Veterinary Clinical Pathology*, 37(2), 225-228.

- Styles D.K. & Phalen D.N. (1998). Clinical avian urology. *Seminars in avian and exotic pet medicine*, 7(2), 104-113.
- Sutton R.H. (1976). The refractometric determination of the total protein concentration in some animal plasmas. *New Zealand Veterinary Journal*, 24, 141-148.
- Thomsen K. & Hötter H. (2006). The sixth International White Stork Census: 2004-2005. Waterbirds around the world. G.C. Boere, C.A. Galbraith & D.A. Stroud (Eds). (pp. 493-495). UK, Edinburgh: The Stationery Office. Acedido em Set. 19, 2011, disponível em: [http://jncc.defra.gov.uk/PDF/pub07\\_waterbirds\\_part4.3.18.pdf](http://jncc.defra.gov.uk/PDF/pub07_waterbirds_part4.3.18.pdf)
- Tomé R., Santos N., Cardia P., Ferrand N., Korpimäki E. (2005). Factors affecting the prevalence of blood parasites of Little Owls *Athene noctua* in southern Portugal. *Ornis Fennica*, 82, 63-72.
- Valkiūnas. G. (2005). *Avian malarial parasites and other haemosporidia*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Villegas A., Sánchez J.M., Costillo E. & Corbacho C. (2002) Blood chemistry and hematocrit of black vulture (*Aegypius monachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132, 489-497.
- Villegas A., Sánchez Guzmán J.M., Corbacho C., Corbacho P. & Vargas J.M. (2004) Blood values of bald ibis (*Geronticus eremita*) in captivity: comparative ranges and variability with age, sex and physical condition. *Journal of Ornithology*, 145, 98–104.
- Vleck, M.C., Vortalino, N., Vleck, D. & Bucher, T.L. (2000). Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free living Adélie Penguins. *The Condor*, 102, 392-400.
- Wernery, R., Wernery, U., Kinne, J. & Samour, J. (2004). Haematology and blood biochemistry. In R. Wernery, U. Wernery, J. Kinne & J. Samour (Eds), *Colour Atlas of Falcon Medicine*. (pp. 12-42). Hannover: Schütersche.
- Wideman R.F. (1991). Autoregulation of avian renal plasma flow: contribution of the renal portal system. *Journal of Comparative Physiology, Part B*, 160, 663-469.
- Williams, J.I. & Trainer, D.O. (1971) A hematological study of snow, blue, and Canada geese. *Journal of Wildlife Diseases*, 7(4), 258–265.
- Wobeser G.A. (2008). Parasitism: Costs and Effects. In C.T. Atkinson, N.J. Thomas & D.B. Hunter (Eds), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 3-12). Iowa: Wiley-Blackwell.

## ANEXO I – Ordem Ciconiformes

---

**Tabela 12.** Animais pertencentes a Ordem Ciconiformes, residentes ou nidificantes na Europa.  
(Adaptado de ICNB, 2008)

<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>
<b>Ciconiidae</b>	<i>Ciconia nigra</i>	Cegonha preta
	<i>Ciconia ciconia</i>	Cegonha branca
<b>Therskiomitgidae</b>	<i>Plegadis falcinellus</i>	Ibis-preto; Maçarico preto
	<i>Platalea leucorodia</i>	Colhereiro
<b>Ardeidae</b>	<i>Botaurus stellaris</i>	Abetouro
	<i>Ixobrychus minutus</i>	Garçote; Garça-pequena
	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Goraz
	<i>Ardeola ralloides</i>	Papa-ratos
	<i>Bubulcus ibis</i>	Carraçeiro; Garça-boieira
	<i>Egretta garzetta</i>	Garça-branca pequena
	<i>Egretta alba</i>	Garça-branca grande
	<i>Ardea cinerea</i>	Garça-real
	<i>Ardea purpurea</i>	Garça-vermelha

## ANEXO II – Características da espécie *Ciconia ciconia*

Tabela 13. Características da espécie *Ciconia ciconia*.

Característica em estudo	Valor
Longitude (ponta do bico à ponta das patas)	100 – 115 cm
Envergadura alar	200 – 210 cm
Medida do bico	15 – 18 cm
Medida do tarso	20 – 21 cm
Medida da cauda	21 – 23 cm
Peso de um exemplar adulto macho	3.0 – 4.5 kg
Peso de um exemplar adulto fêmea	2.7 – 4.0 kg
Maturidade sexual em machos	2 – 3 anos
Maturidade sexual em fêmeas	2 – 5 anos
Longevidade máxima registada	33 anos
Chegada da “migração pré-nupcial”	Início de Dezembro
Partida para a “migração pós-nupcial”	Início de Agosto
Época de incubação	Fevereiro a Maio
Época de crias nos ninhos	Março a Julho
Número de ovos	3 – 5
Número de posturas	Uma anual
Regime de postura	Um ovo a cada dois dias
Dimensões do ovo	71 x 51 mm
Peso do ovo	96 – 115 g
Cor do ovo	Branco
Duração da incubação	33 – 34 dias
Período de crias nos ninhos	64 – 76 dias
Número de crias	1 – 4

## ANEXO III – Alterações hematológicas

**Tabela 14.** Índice policromático adaptado de Pendl e Samour (2009) e Pendl (2011).

Índice	%	Impressão geral	Critério Morfológico	Interpretação
1	0	Homogéneo	Homogeneidade eritrocitária na forma e estrutura. Células policromáticas em número reduzido ou ausente.	Fisiológico ou suspeito de desvio à direita com depressão da eritropoiese.
2	<10	Ligeiramente irregular	Eritrócitos não são totalmente homogéneos. Presença de algumas células policromáticas.	Fisiológico.
3	10-20	Moderadamente irregular	Células policromáticas vistas regularmente.	Desvio à esquerda. Eritropoiese ligeiramente aumentada.
4	20-50	Claramente irregular	Número significativo de células policromáticas; poiquilocitose ligeira.	Desvio à esquerda regenerativo a degenerativo. Eritropoiese aumentada.
5	>50	Extremamente irregular	Presença de bastantes células policromáticas; Presença marcada de poiquilocitose.	Desvio à esquerda degenerativo. Eritropoiese bastante aumentada.

**Tabela 15.** Alteração na concentração das células sanguíneas.

<b>Alteração da concentração</b>	<b>Achado hematológico</b>	<b>Interpretação</b>
<b>Policitémia</b>	Aumento do hematócrito e da contagem total de eritrócitos (TRBC)	Pode ocorrer devido a um aumento absoluto da eritropoiese; secundária a situações de hipoxia, por resposta fisiológica a altitudes elevadas ou por condições patológicas como doenças circulatórias ou respiratórias crónicas, hemocromatose e raquitismo ou por alterações relativas, como consequência da redistribuição dos componentes eritrocitários ou fluidos do sangue (desidratação ou outras etiologias). (Clark <i>et al.</i> , 2009; Samour, 2006)
<b>Anemia</b>	Diminuição do hematócrito e da contagem total de eritrócitos	A anemia pode ocorrer por perda de eritrócitos (Hemorrágica) por aumento da destruição de eritrócitos (Hemolítica) ou por diminuição da produção de eritrócitos (Hipoproliferativa) (Clark <i>et al.</i> , 2009)
<b>Heterofilia</b>	Concentração de heterófilos superior ao limite máximo do intervalo de referência.	Normalmente indicativo elevada resposta ao stresse, presença de inflamação; infecções bacterianas ou fúngicas (Clark <i>et al.</i> , 2009;)
<b>Heteropénia</b>	Concentração de heterófilos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Indicativo da presença de inflamação, resultando na depleção da reserva de granulócitos da medula óssea; (Clark <i>et al.</i> , 2009).
<b>Eosinofilia</b>	Concentração de eosinófilos superior ao limite máximo do intervalo de referência.	Sem correlação entre o parasitismo ou reacção anafiláctica, as observações clínicas sugerem uma correlação com lesão tissular em especial no caso das dermatopatias. Valor fisiologicamente alto em algumas espécies (Pendl, 2011).
<b>Basofilia</b>	Concentração de basófilos superior ao limite máximo do intervalo de referência.	Raro em aves (Campbell 2006a). Observações clínicas sugerem correlação com lesão tissular, e doença activa de clamidiose. Inconsistente em infecção respiratória grave. Valor fisiologicamente alto em algumas espécies (Pendl, 2011).
<b>Linfocitose</b>	Concentração de linfócitos superior ao limite máximo do intervalo de referência.	Indicativo de estimulação imunitária; pouco comum; (Campbell, 1994; Fudge, 1997; Clark <i>et al.</i> , 2009;).
<b>Linfopénia</b>	Concentração de linfócitos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Geralmente indicativo de stresse; (Fudg, 1997;Clark <i>et al.</i> , 2009).
<b>Monocitose</b>	Concentração de monócitos superior ao limite máximo do intervalo de referência.	Geralmente indicativo de inflamação; Pode estar associada a clamidiose, doenças granulomatosas bacterianas e micóticas, infecções micobacterianas e necrose tissular massiva (Campbell, 1995; Clark <i>et al.</i> , 2009).
<b>Trombocitose</b>	Concentração de trombócitos superior ao limite máximo do intervalo de referência.	Resposta a hemorragia; aumento da fagocitose não específica; produção de trombócitos após trombocitopénia. (Pendl, 2011)
<b>Trombocitopénia</b>	Concentração de trombócitos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Artefacto (agregação); diminuição da produção em caso de depressão da medula óssea; ou necessidade excessiva em caso de coagulopatias. (Pendl 2011)

**Tabela 16.** Morfologia atípica das células sanguíneas, por activação celular.

Linha Celular	Morfologia atípica	Definição e Interpretação	
Eritrócitos	Policromasia	Número elevado de eritrócitos policromáticos; aumento da taxa de eritropoiese (Pendl, 2006).	
	Poiquilocitose	Número elevado de eritrócitos com formas anormais; defeito metabólico, aumento da taxa de eritropoiese, hemólise (Pendl, 2006).	
	Anisocitose	Aumento da variabilidade do tamanho dos eritrócitos; aumento da taxa de eritropoiese (Pendl, 2006).	
	Corpos de inclusão intra-eritrocitários	Corpos de Heinz	Estruturas de tamanho e forma irregular, associadas à membrana celular. Representam hemoglobina desnaturada e são indicativos de lesão oxidativa (Pendl, 2006).
		Corpos de Howell Jolly	Estruturas esféricas e excêntricas, resultantes de uma divisão nuclear anormal (Pendl, 2006).
		Pontuações basofílicas	Grânulos pequenos, irregulares de coloração arroxeadada, distribuídos pelo citoplasma; causados pela presença de agregados ribossomais residuais. Nas aves, o seu significado é sempre patológico, estando associados a deficiências em ferro ou hemoglobina e intoxicação por chumbo (Pendl, 2006).
	Vacuolização citoplasmática	Pequenos vacúolos no citoplasma das células; ocorre em caso de intoxicação por chumbo (Pendl, 2006).	
Eritroplastideos	Ausência de núcleo; aparece em número reduzido e não tem significado patológico (Pendl, 2006).		
Heterófilos	Toxicidade celular (Campbell, 1995)	+1	Ligeira basofilia citoplasmática.
		+2	Citoplasma mais basofílico e desgranulação parcial.
		+3	Basofilia citoplasmática marcada, desgranulação moderada e vacuolização do citoplasma.
		+4	Citoplasma profundamente basofílico, desgranulação moderada a marcada (mostrando frequentemente grânulos grandes formados por fusão), vacuolização citoplasmática e cariorréxis e cariólise.
Linfócitos	Aspecto	Aumento do tamanho da célula e citoplasma intensamente basofílico (Campbell, 1995).	
	Grânulos azurófilos	Grânulos citoplasmáticos, esféricos, intensamente eosinofílicos (Campbell, 1995; Pendl & Samour, 2009).	
	Pseudópodes	Projeções citoplasmáticas (Campbell, 1995; Pendl & Samour, 2009).	
Trombócitos	Aspecto	Forma variável, com margens irregulares. Citoplasma incolor a ligeiramente basofílico com presença de vacúolos e pseudopodes. Núcleo frequentemente picnótico (Pendl & Samour, 2009).	



## ANEXO IV – Valores de referência para a Classe das aves

**Tabela 17.** Valores de referência dos parâmetros de hemograma, para a maioria das espécies de aves.

Parâmetro	Unidades	Intervalo de referência em aves
Hematócrito	%	35.00-55.00 <sup>a</sup>
		40.00-55.00 <sup>b</sup>
TRBC	x 10 <sup>6</sup>	2.00 – 4.00 <sup>a</sup>
	células/ $\mu$ l	2.10 – 5.50 <sup>b</sup>
Hemoglobina	g/dL	11.00–18.00 <sup>a</sup>
		12.20–20.00 <sup>b</sup>
VCM	fl	100.0–200.0 <sup>a</sup>
		121.0-200.0 <sup>b</sup>
HCM	pg	30.0–70.0 <sup>a</sup>
CHCM	g/dL	<28.0 <sup>a</sup>
		28.0–38.0 <sup>b</sup>
TWBC	x 10 <sup>3</sup> células/ $\mu$ l	5.00–11.00 <sup>a</sup> *
		15.00–25.00 <sup>a</sup> **
		1.00 - 32.00 <sup>b</sup>
Heterófilos	%	20–75 <sup>b</sup>
Eosinófilos	%	1–4 <sup>b</sup>
Basófilos	%	2.5–6 <sup>b</sup>
Linfócitos	%	20–65 <sup>b</sup>
Monócitos	%	2–5 <sup>b</sup>
TTC	x 10 <sup>3</sup> células/ $\mu$ l	20.00–40.00 <sup>a</sup>

\*- Espécies granulocíticas

\*\* - Espécies linfocíticas

<sup>a</sup> – Pendl, 2011

<sup>b</sup> - Krautwald-Junghanns, 2007

**Tabela 18.** Valores de referência dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, para a maioria das espécies de aves.

Parâmetros bioquímicos	Unidades	Intervalo de referência em aves
Ácidos biliares	µmol/L	< 100.00 <sup>a</sup>
Glucose	mg/dL	200.00 – 500.00 <sup>b c</sup>
Proteínas Totais (Método do biureto)	g/dL	2.50 - 4.50 <sup>b</sup> 3.00 – 5.00 <sup>c</sup>
Triglicéridos	mg/dL	-
Colesterol	mg/dL	100.00 – 200.00 <sup>b</sup> 108.00 – 330.00 <sup>c</sup>
ALT	U/L	19.00 – 50.00 <sup>b</sup> 6.50 – 263.00 <sup>c</sup>
AST	U/L	< 275.00 <sup>b</sup> 52.00 – 270.00 <sup>c</sup>
LD	U/L	< 1 000.00 <sup>b</sup> 46.00 – 442.00 <sup>c</sup>
GGT	U/L	-
Fosfatase Alcalina	U/L	42.00 – 479.00 <sup>c</sup>
Creatinina Kinase	U/L	100.00 – 500.00 <sup>b</sup> 110.00 – 480.00 <sup>c</sup>
GLD	U/L	< 10.00 <sup>b</sup>
Ureia	mg/dL	0.00 – 4.00 <sup>b</sup> 2.40 – 4.20 <sup>c</sup>
Ácido úrico	mg/dL	< 15.00 <sup>b</sup> 2.00 – 15.00 <sup>c</sup>
Creatinina	mg/dL	0.20 – 0.50 <sup>c</sup> 0.10 – 0.40 <sup>d</sup>
Cálcio	mg/dL	8.00 – 11.00 <sup>b</sup> 8.00 – 12.00 <sup>c</sup>
Fósforo	mg/dL	5.00 – 7.00 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> - Fudge, 1997

<sup>b</sup> - Campbell, 2006b

<sup>c</sup> - Krautwald-Junghanns, 2007

<sup>d</sup> - Hochleithner, 1994

## ANEXO V – Técnica de Wright Giemsa modificada

**Tabela 19.** Técnica Wright Giemsa modificada por Jaime Samour para coloração de esfregaços, adaptada de Pendl (2011)

	Material	Protocolo
<b>Coloração</b>	<p>3 g de corante Wright em pó;</p> <p>0.3 g de corante Giemsa em pó;</p> <p>5 ml de Glicerina;</p> <p>1000 ml de metanol absoluto (sem acetona);</p> <p>Filtrar e armazenar num frasco protegido da luz.</p> <p><i>Nota:</i> Mantém-se estável por várias semanas.</p>	<p>1º - Colocar os esfregaços secos ao ar num suporte sobre um lavatório ou recipiente;</p> <p>2º - Cobrir os esfregaços com o corante durante 3 minutos;</p> <p>3º - Juntar igual quantidade de solução tampão e misturar gentilmente com uma pipeta, até aparecer um brilho verde metálico na superfície;</p> <p>4º - Deixar repousar por 6 minutos;</p> <p>5º - Lavar e cobrir os esfregaços com solução tampão durante 1min. para permitir a diferenciação;</p>
<b>Solução Tampão pH (segundo Weise)</b>	<p>Dissolver 1 pastilha de tampão em 1 litro de água recém- destilada;</p> <p>Se necessário agitar.</p> <p><i>Nota:</i> Mantém-se estável no mínimo durante 4 semanas.</p>	<p>6º - Lavar abundantemente com solução tampão;</p> <p>7º - Limpar a parte de trás do esfregaço para eliminar o excesso de coloração;</p> <p>8º - Deixar num suporte até secar;</p> <p>9º - Montagem entre lâmina e lamela.</p>

## ANEXO VI – Solução de Natt and Herrick's

---

Seguidamente serão indicados os constituintes da Solução de Natt and Herrick's e respectivas quantidades, segundo Samour e Pendl,(2009):

Cloreto de sódio (NaCl).....	3.88gr
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	2.50gr
Fosfato de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O).....	2.91gr
Fosfato de Potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	0.25gr
Formalina 37%.....	7.50ml
Metil Violeta 2B.....	0.10gr
Água destilada.....	Até perfazer 1000ml

## ANEXO VII – Testes bioquímicos realizados

**Tabela 20.** Teste laboratorial utilizado para cada parâmetro.

Teste bioquímico	Método laboratorial
Ácido úrico (Spinreact®, Uric Acid, refª 41000, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção enzimática colorimétrica</b> - Este composto é oxidado, na presença da enzima uricase, a alantoína e peróxido de hidrogénio. Este último por sua vez, em presença da peroxidase, 4- aminofenazona e 2-4-diclorofenol sulfonato, forma um composto rosado (quinonaimina). A intensidade da coloração é proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.
Creatinina (Spinreact®, Creatinine-J, refª 1001111, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Método colorimétrico de Jaffé</b> - baseado na reacção da creatinina com o picrato alcalino, que forma um complexo avermelhado. A intensidade da cor deste complexo é proporcional à concentração de creatinina na amostra.
Cálcio (Spinreact®, Calcium-AIII, refª 1001065, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Método colorimétrico</b> - Baseado na reacção do cálcio com o arsenazo III a pH neutro, que forma um complexo azulado. A intensidade da cor deste complexo é proporcional à concentração de cálcio na amostra.
Fósforo (Spinreact®, Phosphorus-UV, refª 1001155, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção molibdato</b> - O fosfato inorgânico reage com molibdato de amónia em meio ácido para formar o complexo fosfomolibdato de cor amarela. A intensidade da cor deste complexo é proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra.
FA (Spinreact®, ALP-LQ, refª 1001138, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção p-Nitrofenilfosfato, procedimento D.G.K.C., cinética UV</b> - A fosfatase alcalina catalisa a hidrólise do p-nitrofenilfosfato a pH 10.4, libertando p-nitrofenil e fosfato. A taxa de formação de p-nitrofenil, medida fotométricamente é proporcional à concentração de fosfatase alcalina presente na amostra.
AST (Spinreact®, GOT(AST), refª 1001160, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção NADH, procedimento I.F.C.C., cinética UV</b> - A AST catalisa a transferencia reversível de um grupo amino do aspartato para $\alpha$ -cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato produzido é reduzido a malato na presença da enzima malato desidrogenase e de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A velocidade de diminuição da concentração de NADH no meio, determinada fotométricamente, é proporcional à concentração de AST na amostra.
ALT (Spinreact®, GPT(ALT), refª 1001170, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção NADH, procedimento I.F.C.C., cinética UV</b> - A ALT catalisa a transferência reversível de um grupo amino da alanina para $\alpha$ -cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato produzido é reduzido a lactato na presença da enzima lactato desidrogenase e de NADH. A velocidade de diminuição da concentração de NADH no meio, determinada fotométricamente é proporcional à concentração de ALT na amostra.
LD (Spinreact®, LDH-LQ, refª 1001268, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção do piruvato, procedimento D.G.K.C., cinética UV</b> - A LD catalisa a redução do piruvato pelo NADH. A velocidade de diminuição da concentração de NADH no meio determinada fotométricamente, é proporcional à concentração de LD na amostra.
GGT (Spinreact®, $\gamma$ -GT-LQ, refª 1001188, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Método cinético UV</b> - A GGT catalisa a transferência de um grupo $\gamma$ -glutamilo da $\gamma$ -glutamil-p-nitroanilida para o péptido aceitador glicilglicina. A velocidade de formação do ácido 5-amino-2-nitrobenzoico (produto da reacção), determinada fotométricamente, é proporcional à concentração de GGT na amostra.

Tabela 18 (Continuação)

CK (Spinreact®, CK-NAC, refª 1001050, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Reacção NAC, cinética UV</b> - A CK cataliza a transferencia reversível de um grupo fosfato de fosfocreatina para ADP. Esta reacção é acoplada a outras catalizadas pela hexokinase (HK) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH). O ratio da formação de NADPH, medido fotométricamente, é proporcional à concentração catalítica de CK presente na amostra.
AB (Spinreact®, TBA, refª 1001030, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Método enzimático colorimétrico</b> - Os AB são convertidos pela enzima 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\alpha$ -HSD), na presença de Tio-NAD, em 3-cetoesteroide e Tio-NADH. A reacção é reversível, sendo que a 3 $\alpha$ -HSD pode converter 3-cetoesteóides e Tio-NADH novamente em ácidos biliares e Tio-NAD. Na presença de NADH, o ciclo enzimático ocorre eficientemente e a taxa de formação de Tio-NADH é proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.
Glucose (Spinreact®, Glucose-LQ, refª 10011 0, ant Estev de Bas, Spain)	<b>Reacção hexokinase-G6P-DH</b> - A glucose foi oxidada a ácido glucónico, pela enzima glucose oxidase, ocorrendo a formação de peróxido de hidrogénio que é detectado, na presença de peroxidases, por um aceitador de oxigénio cromogénico – fenol-4-aminofenazona. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de glucose na amostra.
PT (Spinreact®, Total Protein, refª 1001291, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Método do biureto</b> - As proteínas conferem uma coloração azul-arrozada intensa, quando em complexo com sais de cobre, em meio alcalino. Na reacção é incluído um antioxidante. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.
TG (Spinreact®, Triglycerides-LQ, refª 41030, Sant Esteve de Bas, Spain)	<b>Método enzimático colorimétrico</b> - Os triglicéridos incubados com lipoproteína lipase (LPL) libertam glicerol e ácidos gordos livres. O glicerol é fosforilado pelo glicerolfosfato desidrogenase (GPO) e ATP, em presença de glicerol quinase (GK), para produzir glicerol-3-fosfato (G3P) e ADP. O G3P é convertido em dihidroxiacetona fosfato (DAP) e peróxido de hidrogénio pelo GPO. Por fim o peróxido de hidrogénio reage com 4-aminofenazona (4-AF) e p-clorofenol, na presença da enzima peroxidase, dando uma coloração avermelhada. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de triglicéridos na amostra

## ANEXO VIII – Estudos anteriores realizados em cegonha-branca: características e valores obtidos

Tabela 21. Descrição dos estudos anteriormente realizados em cegonha-branca.

Caracterização	Referências bibliográficas						© I.S.I.S. 2002
	Puerta <i>et al.</i> (1989)	Alonso <i>et al.</i> (1991)	Montesinos <i>et al.</i> (1997)		Jerzak <i>et al.</i> (2010)		
<b>Localização</b>	Colônia do Vale do rio Tietar, Espanha,	Colônia de <i>El Escorial</i> , Madrid, Espanha	Colônia do Vale do Rio Lozoya (3°45'N; 40°55'W)	Cenicientos, (4°30'N;40°15'W). Madrid, Espanha. Nascidos no centro	Cenicientos, (4°30'N;40°15'W). Madrid, Espanha. Tratados no centro.	Polónia (51°40'–54°38'N; 14°42'–17°33'E)	Amostras de 18 Instituições membro desconhecidas
<b>Altura do ano</b>	Fim de Maio e início de Junho	Março 1989 e 1990	Fim de Abril a início de Junho 1994			23 de Junho a 4 de Julho de 2005 a 2008	Desconhecido
<b>Estado</b>	Selvagem	Selvagem	Selvagem	Cativeiro	Selvagem	Selvagem	Desconhecido
<b>n</b>	24	7	31	7	19	192 150	Variável
<b>Idade dos animais</b>	Jovens 15-40 e 40-55 dias	Adultos	<12 dias; 17-32 dias; 44-56 dias	<72horas; 15 dias; 30 dias; 45 dias e 90 dias	>90 dias	35.3±1.43	Todas incluídas
<b>Peso (gr)</b>	Desconhecido	3300±101	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido		Desconhecido
<b>Gênero</b>	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	machos fêmeas	Desconhecido
<b>Jejum</b>	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
<b>Diferenças no método hematológico</b>	Fixação dos esfregaços em metanol. Método de coloração de Giemsa. Método colorimétrico de Drabkin (1945)	Fixação dos esfregaços em metanol. Método de coloração de Giemsa. Metodo colorimétrico de Drabkin (1945)	Fixação dos esfregaços em metanol. Método de coloração May-Grünwald Giemsa.	Fixação dos esfregaços em metanol. Método de coloração May-Grünwald Giemsa.	Fixação dos esfregaços em metanol. Método de coloração May-Grünwald Giemsa.	Não realizado	Desconhecido
<b>Diferenças no método bioquímico</b>	Método de química seca.	Método de química seca.	Método de química seca.	Método de química seca.	Sistema Reflotron® (Química seca)	Utilização do mesmo aparelho bioquímico (Cobas Mira)	Desconhecido





**Tabela 22 (Continuação)**

Parametros Bioquimicos														
AB (µmol/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose (mg/dL)	-	-	237.79 ± 27.02	255.81± 14.41	246.80± 10.81	217.62± 16.21	217.62± 18.01	234.19± 9.01	216.18± 23.42	212.57± 9.01	245.72± 24.68	-	-	252.0 ±59.9
PT* (g/dL)	-	-	2.09±0.09	2.46±0.21	3.04± 0.04	1.41± 0.13	2.20±.14	2.4±0.14	2.95± 0.05	3.02±0.06	3.09±0.04	3.68± 0.03	3.74± 0.04	3.8± 0.9
PT**(g/dL)	4.5 ± 0.2	-	4.3 ± 0.3	2.13± 0.11	2.9± 0.14	3.65± 0.06	1.8± 0.21	2.85± 0.11	3.02± 0.15	3.53± 0.06	3.60± 0.06	3.6± 0.9	-	-
TG (mg/dL)	156.0 ± 16.0	415 ± 106	186±18	195±18	168±27	99 ± 27	81 ± 27	99 ± 18	117 ± 18	108 ± 18	108±9	154.8± 6.3	160.2±9	85.84± 36.28
Colesterol (mg/dL)	167.60 ± 12.67	145± 23	174.01± 27.07	185.61± 11.60	189.48± 34.80	104.41 ±23.20	143.08 ±15.47	185.61± 15.47	193.35 ±19.33	185.61 ±19.33	216.55± 1.60	187.16± 2.32	227.76± 3.09	176.8 ±55.2
ALT (U/L)	31.57 ± 1.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.4 ± 4.8	37.4±0.7	38±0.8	60± 108
AST (U/L)	98.14 ± 7.38	-	350±22.3	245±19.4	182.9±21.9	190.7± 18.4	293.8± 11.8	195.7± 10.9	205.2± 13.6	393.0± 11.5	330.3 ±22.4	198±2	221±3	403± 215
LD (U/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	839± 800
GGT (U/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0± 5.0
FA (U/L)	947.74 ± 57.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	107± 106
CK (U/L)	-	-	229±65.3	304±61.1	259±80.4	214.5± 61.8	224.0 ±71.1	198.5 ±60.3	213.7± 39.3	203.5± 39.0	-	-	-	322± 217
AU (mg/dL)	14.3 ± 0.8	2.5 ± 0.4	14.52±2.89	12.91±2.18	13.48± 3.11	18.62 ±1.92	12.39± 1.80	10.29± 1.60	11.26 ±1.06	10.89± 1.01	11.66± 1.67	11.42± 0.37	12.12± 0.44	25.57± 16.30
Ureia (mg/dL)	8.32 ± 1.17	11.4± 2.1	10.92± 1.4	13.73± 0.84	14.57± 1.68	7.00 ±1.12	10.36± 1.12	12.04 ±1.40	20.17 ±1.68	17.93 ±1.96	18.77± 2.52	6.36±0.17	6,72±0.20	4.0± 2.0
Creatinina (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4± 0.2
Cálcio (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.4± 1.2
Fósforo (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.31± 1.3

\*- Método do biureto

\*\* - Refractometria