

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

DISSERTAÇÃO

**Hemograma de Calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) Criadas no Estado do
Rio de Janeiro**

CAROLINE FAGUNDES TARCITANO

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Hemograma de Calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) Criadas no Estado do
Rio de Janeiro**

CAROLINE FAGUNDES TARCITANO

Sob a Orientação do Professor Doutor
Gilberto Garcia Botelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
2010

598.098153 Tarcitano, Caroline Fagundes, 1984-
T179h Hemograma de Calopsitas (*Nymphicus
T hollandicus*) Criadas no Estado do Rio de
Janeiro/ Caroline Fagundes Tarcitano -
2010.
52 f.: il.

Orientador: Gilberto Garcia Botelho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 39-42.

1. Calopsita - Rio de Janeiro (Estado) -
Teses. 2. Hemograma - Teses. 3. Aves -
Teses. I. Botelho, Gilberto Garcia, 1946-.
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

CAROLINE FAGUNDES TARCITANO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/08/2010.

Gilberto Garcia Botelho (Dr., UFRRJ)

Fernando Augusto Curvello (Dr., UFRRJ)

Elan Cardozo Paes de Almeida (Dra., UFF)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar a minha vida, conduzir meus passos e permitir que eu trilhasse sempre em frente.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e incentivo em minha vida, pelo respeito e confiança, e que em todos os momentos estiveram ao meu lado. Obrigada por permitirem que meu sonho tenha se realizado e concluir mais esta etapa.

A Felipe Victório de Castro Bath, meu marido, que participa cada dia contribuindo e compartilhando comigo minhas angústias e felicidades. Esperamos muito por esse momento, construído por companheirismo e dedicação. Obrigada por estar sempre ao meu lado todos esses anos, me abraçando nos momentos de tristeza e comemorando nas alegrias.

Ao Professor Gilberto Garcia Botelho, meu orientador, que felizmente está em minha vida desde o quinto período da graduação e me trouxe para o maravilhoso mundo da patologia clínica, já na época em que eu buscava uma disciplina que trabalhasse com microscópio, minha paixão. O tempo passou e conquistamos juntos uma bolsa de pesquisa que pôde me iniciar na área científica e ajudar meus estudos em patologia clínica. Obrigada pela forma como conduziu sua orientação, me cobrando resultados, mas sempre disposto a tirar as minhas dúvidas com bom humor e sabedoria. Você é um professor como poucos, presente e participante, nos agraciando com pensamentos rápidos e soluções práticas. Obrigada também pelos ensinamentos e contribuição em minha formação, além de acreditar e incentivar minha carreira desde que nossos caminhos se cruzaram.

BIOGRAFIA

Caroline Fagundes Tarcitano, filha de Cesar Tarcitano e Joseli Rosa Fagundes Tarcitano, natural do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, nasceu no dia 15 de Junho de 1984. Coursou o ensino fundamental (1º grau), inicialmente no “Colégio Educo C.P.S. - Tijuca” (Rio de Janeiro - RJ) e posteriormente no “Instituto Guanabara” (Rio de Janeiro – RJ), local onde permaneceu até o fim do ensino médio (2º grau).

Em 2002, deu início à graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, colando grau em outubro de 2007.

Ingressou no “Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Patologia e Ciências Clínicas” da mesma universidade em que cursou a graduação, no ano de 2008, onde sob a orientação do Professor Gilberto Garcia Botelho, desenvolveu o presente trabalho, concluído em 2010.

RESUMO

TARCITANO, Caroline Fagundes. **Hemograma de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) criadas no Estado do Rio de Janeiro**. 2010. 42 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O objetivo deste trabalho foi contribuir à Patologia e Clínica de aves, como as utilizadas nesse estudo, através da determinação de parâmetros referenciais do hemograma, utilizando-se o anticoagulante heparina. A motivação para esta pesquisa deveu-se ao fato da calopsita ser uma espécie exótica e pelo escasso conteúdo de informação, na literatura, de valores hematológicos de normalidade para aves saudáveis. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (filhotes – até 12 meses) e Grupo 2 (adultos – mais de 12 meses), totalizando 60 aves (30 em cada grupo). Através dos resultados obtidos neste experimento, concluiu-se que a técnica de contagem global numa proporção de 1:100 (sangue/ diluidor), utilizando-se a solução de Natt-Herrick, foi satisfatória para a determinação de parâmetros referenciais do hemograma em calopsitas. Em comparações gerais, observaram-se pequenas diferenças por influência do fator idade, levando em consideração animais jovens e adultos, havendo, portanto, necessidade de uma padronização etária para calopsitas, classificando-as como jovens e adultas. Os resultados observados neste estudo servem como referência para calopsitas, no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras chave: Calopsita, parâmetros referenciais, sangue.

ABSTRACT

TARCITANO, Caroline Fagundes. **Hemogram of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) created in the State of Rio de Janeiro**. 2010. 42 p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Postgraduate Course in Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

The objective was to contribute to the Pathology and Clinical birds such as those used in this study, through the determination of reference parameters of hemogram, using the anticoagulant heparin. The motivation for this research was due to the fact that the cockatiel is exotic and the sparse information content, in literature, the hematological values of normal for healthy birds. The animals were divided into two groups: Group 1 (young - up to 12 months) and Group 2 (adults - more than 12 months), totaling 60 birds (30 in each group) . Through the results obtained in this experiment, it was concluded that the overall count technique at a ratio of 1:100 (blood-thinner), using the Natt-Herrick solution was satisfactory for the determination of reference parameters of hemogram in cockatiels. General comparisons, there were small differences influenced by age factor, taking into consideration young and adult animals, therefore there is the need for a standardization group for cockatiels, classifying them as young and adults. The results of this study serve as reference for cockatiels, in Rio de Janeiro.

Key Words: Cockatiel, reference parameters, blood.

ÍNDICE DE QUADROS

- Quadro 1.** Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do Ht, Hm, Hbm, VGM, CHGM, T e PPT de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 1 (até 12 meses) 30
- Quadro 2.** Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do Ht, Hm, Hbm, VGM, CHGM, T e PPT de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 2 (mais de 12 meses) 31
- Quadro 3.** Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do LG, BASREL, BASABS, EOREL, EOABS, HETREL, HETABS, LINREL, LINABS, MONREL, MONABS de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 1 (até 12 meses) 32
- Quadro 4.** Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do LG, BASREL, BASABS, EOREL, EOABS, HETREL, HETABS, LINREL, LINABS, MONREL, MONABS de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 2 (mais de 12 meses) 33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Visualização de eritrócitos de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	14
Figura 2 Visualização de trombócitos de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	15
Figura 3 Visualização de heterófilo de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	16
Figura 4 Visualização de eosinófilo de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	17
Figura 5 Visualização de basófilo de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	18
Figura 6 Visualização de linfócito de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	18
Figura 7 Visualização de monócito de calopsita – <i>Nymphicus hollandicus</i> (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)	19
Figura 8 Vista parcial de animais em gaiolas de um dos criatórios	20
Figura 9 Vista do interior das gaiolas suspensas	20
Figura 10 Calopsita de 6 meses de idade pertencente ao Grupo 1 (até 12 meses)	21
Figura 11 Calopsita de 2 anos de idade pertencente ao Grupo 2 (mais de 12 meses)	21
Figura 12 Material utilizado na contenção das aves e obtenção de sangue	22
Figura 13 Contenção da ave para obtenção de sangue	23
Figura 14 Corte de unha do dedo médio da ave	23
Figura 15 Exposição do sangue para confecção dos esfregaços sanguíneos	24
Figura 16 Recolhimento do sangue através de capilares heparinizados	24
Figura 17 Estancamento do sangue após aplicação de pó hemostático	25
Figura 18 Esfregaço sanguíneo corado pelo método de May-Grunwald-Giemsa	25
Figura 19 Capilares heparinizados preenchidos com sangue	26
Figura 20 Preenchimento da câmara de Neubauer com solução de Natt-Herrick	27
Figura 21 Esquema ilustrativo da câmara de Neubauer evidenciando as áreas de contagem de leucócitos (L) e eritrócitos (E) (COLES, 1984)	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Calopsita	2
2.1.1 Histórico	2
2.1.2 Características	2
2.1.3 Comportamento social	5
2.1.4 Reprodução	5
2.1.5 Criação no Brasil	5
2.2 Hematologia	6
2.2.1 Hematopoiese em aves	6
2.2.2 Técnicas hematológicas	7
A. Obtenção de amostras sanguíneas	7
B. Anticoagulantes	7
C. Esfregaços sanguíneos	8
D. Processos de coloração hematológica	8
2.2.3 Hemograma	9
A. Hematócrito (Ht) ou volume globular (VG)	9
B. Proteínas plasmáticas totais (PPT)	10
C. Hemoglobinometria. (Hbm)	10
D. Contagens globais hematológicas	11
E. Índices hematimétricos	13
F. Leucometria específica	13
2.2.4 Morfologia das células sanguíneas	14
A. Morfologia dos eritrócitos	14
B. Morfologia dos trombócitos	14
C. Morfologia dos granulócitos	15
C.1 Morfologia dos heterófilos	15
C.2 Morfologia dos eosinófilos	16
C.3 Morfologia dos basófilos	17
D. Morfologia dos agranulócitos	18
D.1 Morfologia dos linfócitos	18
D.2 Morfologia dos monócitos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Métodos de obtenção do sangue	22
3.3 Procedimentos em laboratório	25
3.3.1 Fixação e coloração dos esfregaços sanguíneos	25
3.3.2 Hemoglobinometria (Hbm)	26
3.3.3 Hematócrito (Ht) ou volume globular (VG)	26
3.3.4 Proteínas plasmáticas totais (PPT)	27
3.3.5 Hematimetria (Hm), leucometria global (LG) e trombocitometria (T)	27
3.3.6 Cálculos para determinação dos índices hematimétricos	28
3.3.7 Leucometria específica	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

4.1 Determinação de parâmetros do hemograma	29
4.2 Obtenção de amostras sanguíneas	34
4.3 Anticoagulantes	34
4.4 Esfregaços sanguíneos	35
4.5 Colorações hematológicas	35
4.6 Hematócrito (Ht) ou volume globular (VG)	35
4.7 Hemoglobimetria (Hbm)	35
4.8 Contagens globais hematológicas	36
4.9 Análise de parâmetros do hemograma	36
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

A criação de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) tem se intensificado recentemente, em virtude de características próprias como baixo custo de aquisição, facilidade de manejo, dispensa de registro comercial pelo IBAMA e ótima adaptação aos locais de criação.

Com o crescente interesse pela comercialização dessas aves, torna-se de fundamental importância um estudo da fisiologia e patologia desses animais, com o intuito de auxiliar aos clínicos veterinários nos diagnósticos das possíveis doenças que acometem as calopsitas.

Ferramentas de grande valia em um exame clínico completo são os exames complementares. Estes são de grande importância, pois oferecem maior número de dados, aumentando as possibilidades de acerto em um diagnóstico preciso de patologias. Com base neste auxílio é que devemos destacar os mais diversos exames complementares; dentre eles estão os exames laboratoriais. Um dos exames laboratoriais de grande valia na rotina clínica veterinária é o hemograma completo (COLES, 1984).

O hemograma das aves representa uma coleção de testes, que analisa quantidade, qualidade e morfologia dos elementos figurados sanguíneos. Estes testes podem ser facilmente realizados no laboratório veterinário e podem promover um acesso rápido e barato à condição de saúde do animal (CAMPBELL, 1995).

Uma vez colocada em prática a iniciativa de comercialização de aves da espécie *Nymphicus hollandicus*, torna-se de fundamental importância a otimização de um programa de controle de sanidade destas aves, necessitando para tal, uma rotina clínica minuciosa buscando cada vez mais o conhecimento da homeostasia e de afecções que acometem estes animais, aprimorando ainda mais o estudo sobre as patologias destas aves. Desta forma, é imperativa a busca de padrões de normalidade no que diz respeito ao estado de saúde do animal; e neste momento, é importante que o clínico possa contar com exames complementares. Portanto, o conhecimento do perfil hematológico para a população estudada neste experimento torna-se fundamental, uma vez que há poucos padrões hematológicos referenciais nesta espécie.

Há, portanto, uma condição ímpar para o reconhecimento de padrões hematológicos para calopsitas, essencial para o bom desenvolvimento e criação dessas aves no Estado do Rio de Janeiro.

A justificativa para a realização deste experimento foi estabelecer referência para valores hematológicos através da realização do hemograma completo, de aves da espécie *Nymphicus hollandicus*, determinando valores sanguíneos para Hematócrito (Ht), Hematimetria (Hm), Hemoglobinometria (Hbm), Volume Globular Médio (VGM), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM), Trombocitometria (T), Proteínas Plasmáticas Totais (PPT), Leucometria Global (LG) e Leucometria Específica. Os resultados analisados constituirão um padrão hematológico para avaliação clínica desta espécie de ave.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os valores hematológicos de referência para a espécie *Nymphicus hollandicus* no Estado Rio de Janeiro, oferecendo subsídios aos clínicos para que estes possam comparar parâmetros de normalidade quando lidar com possíveis alterações patológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Calopsita (*Nymphicus hollandicus*)

2.1.1 Histórico

A ordem dos Psitaciformes é classificada em três grandes famílias: Loridae (lóris), Cacatuidae (cacatuas) e Psittacidae (papagaios, araras, periquitos, jandaias, calopsitas e maracanãs) (BENEZ, 2001).

A primeira descrição científica desta espécie ocorreu no ano de 1792. Em 1838, John Gould, ornitólogo inglês, autor bem sucedido de livros sobre história natural, enfocando principalmente aves, visitou a Austrália objetivando conhecer sua fauna, até então pouco conhecida e realizar ilustrações de aves. Foi a partir de seu retorno em 1840, através dos livros e ilustrações divulgadas, que o público teve sua atenção voltada para a beleza das aves daquele continente, especialmente a calopsita. Essas aves têm seu nome derivado de uma palavra alemã "kakatielje", que significa "pequena cacatua". O nome científico é *Nymphicus hollandicus*, que significa "Deusa da Nova Holanda", antigo nome da Austrália (entre 1700-1800). Ainda é creditado a esse pesquisador o fato de ter sido a primeira pessoa a levar calopsitas para fora da Austrália, contribuindo decisivamente para divulgação da espécie (BENEZ, 2001).

Somente a partir de 1884, na Europa, as calopsitas começaram a fazer parte das criações. Em 1949, houve uma maior disseminação da espécie com o surgimento da primeira mutação documentada, o Arlequim, no estado da Califórnia (Estados Unidos). A partir da década de 1970, houve a introdução destas aves no Brasil de forma organizada. A partir daí, outros padrões de cores foram sendo fixados, ganhando então a calopsita ou caturra, como descrita em Portugal, enorme popularidade, igualando-se praticamente àquela do periquito australiano (BENEZ, 2001).

2.1.2 Características

A calopsita é uma ave dócil que pode ser utilizada como animal de estimação. Na natureza, a calopsita possui o chamado padrão silvestre ou normal, já quando surgem aves mutantes, ostentando outras combinações de cores, dificilmente sobrevivem. Elas são vítimas mais fáceis de predadores, pois a coloração diferente ganha destaque e colabora para uma visualização mais rápida da ave. As inúmeras cores existentes hoje são decorrentes da fixação de mutações feitas pelos criadores, diversas surgidas nos últimos 15 anos, algumas muito recentes e difíceis de encontrar em criatórios (RUPLEY, 1999). É importante destacar que os padrões podem se mesclar, originando uma grande gama de cores, tornando cada calopsita única. Essas cores originadas de padrões silvestres ou mutações podem ser:

Cinza ou Normal (Normal Grey): A variedade original, encontrada na natureza, tem o corpo cinza com as bordas das asas brancas. A crista do macho é amarela sobre uma cabeça amarela e, na fêmea, cinza-amarelada com a cabeça cinza. Ambos têm as faces formadas por uma mancha vermelha, circular, em cada lateral da face, de tom mais suave na fêmea. A cauda é totalmente negra no macho e na fêmea intercalada de negro com amarelo na parte de baixo. No macho adulto, a cabeça é amarela, com duas manchas circulares laterais (bochechas) de cor vermelha, crista amarela, corpo revestido com penas de cor cinza, com o dorso mais escuro, bordas das asas brancas e cauda negra. A fêmea adulta apresenta a mesma coloração dos filhotes. O corpo é de cor cinza, cabeça também cinza com as

bochechas de cor vermelha mais suave, crista cinza-amarelada, bordas das asas brancas e face interior da cauda estriada de amarelo e preto, com penas laterais externas amarelas. Em ambos os sexos, os olhos são marrons, o bico cinza escuro e as patas, cinza escurecido (RUPLEY, 1999).

Lutino (Lutino): Sem dúvida alguma, é o padrão mais popular e apreciado, tendo surgido nos EUA em 1958. Essa mutação causa perda do pigmento melanina (que confere o tom cinza à ave). Desse modo, são aves de cor dominante branca, com olhos vermelhos, pés rosados, crista amarela, bico marfim, cabeça amarelada com bochechas vermelhas. Nas asas e cauda, também está presente o amarelo. Na realidade, os lutinos não podem ser considerados como brancos ou albinos, pois não são inteiramente brancos, em razão da presença das cores amarela e vermelha (dadas pelo pigmento psitacina). Os indivíduos podem apresentar desde um amarelo forte até um branco quase total no corpo. Neste padrão ocorre um defeito de origem genética, caracterizado pela existência de uma área sem penas localizada atrás da cabeça. As fêmeas têm estrias amarelas na face inferior da cauda e pontos amarelos embaixo da asa (RUPLEY, 1999).

Pérola (Pearl): Surgiu pela primeira vez na Alemanha Ocidental em 1967. É uma mutação que afeta as penas individualmente (há uma falta de melanina no centro de cada pena, individualmente), fazendo com que haja uma falta de coloração uniforme, resultando em penas com coloração em forma de "concha". São aves extremamente vistosas, sendo que o padrão básico pode variar bastante. De modo geral, mostram as duas manchas laterais à cabeça, as faces são amarelas salpicadas de cinza, e a crista amarela riscada de cinza. As penas das costas exibem um padrão "escamado", resultante da ausência de melanina no seu centro, podendo a cor desta parte das penas variar do branco ao amarelo. As penas das asas são cinza, com faixas amarelas. A cauda é amarela, e o peito e a barriga, listrados de amarelo e cinza. As fêmeas carregam o perolado nas costas, asas, nuca e cabeça, com uma concentração maior nas costas. Os machos adultos podem perder totalmente o perolado, principalmente na cabeça e na nuca (RUPLEY, 1999).

Arlequim (Pied): É a mutação mais antiga, surgida nos EUA em 1949; causa alteração da coloração normal em extremidades. Esse padrão é extremamente variável, podendo apresentar aves bastante semelhantes ao normal até aquelas com poucas áreas de cor cinza, predominando o amarelo claro e apenas algumas penas de coloração cinza. A cabeça exhibe um amarelo forte, faces vermelhas e crista amarela. Idealmente, um arlequim deve mostrar 75% de penas com ausência de melanina e 25% com presença. Um arlequim puro possui, idealmente, uma máscara "limpa", livre de manchas cinzas, uma cauda limpa e asas de vôos com um balanço igual de marcas, com simetria perfeita. Nesse padrão, é virtualmente impossível a distinção de sexo (uma vez que a marcação arlequim obscurece as diferenças de plumagem), só sendo possível no caso em que a fêmea apresente barras na parte inferior do rabo. São reconhecidas quatro classificações de arlequim: escuro (ou heavy, com 75% ou mais de melanina), claro (ou light, com apenas 25% de melanina), reverso (ou reverse, com marcações apenas nas asas de vôos, tendo restante do corpo sem melanina) e limpo (ou clear, um pássaro totalmente amarelo ou branco; é também chamado de lutino com olhos pretos) (RUPLEY, 1999).

Canela (Cinnamon): Também conhecida como Isabelino, surgiu pela primeira vez na Bélgica, em 1960. As aves são semelhantes ao padrão normal, com exceção da alteração na coloração da melanina, produzindo uma coloração marrom-claro (ou canela). Também as patas e os olhos são de coloração mais clara. Os machos adultos são um pouco mais escuros

que as fêmeas (em razão da maior presença de melanina). Algumas fêmeas podem ter mais amarelo na face do que os machos, além de apresentarem o barramento típico sob as penas da cauda (RUPLEY, 1999).

Cara branca (White Face): O padrão Cara Branca surgiu na Holanda por volta de 1969. No final da década de 1970, passou a ser produzido na Alemanha e Inglaterra. Essa mutação causa perda do pigmento psitacina (que confere tons amarelo e laranja), causando a falta da pigmentação laranja e amarela nas bochechas e no corpo. A fêmea tem o corpo cinza, bordas das asas brancas e face inferior da cauda com estrias pretas e brancas, tornando a face inteiramente cinza. O macho segue um padrão parecido com o normal, porém com a face totalmente branca e as cores cinzas com um tom mais escuro, crista cinza e bordas das asas brancas (RUPLEY, 1999).

Fulvo (Fallow): Surgidos em 1971, nos EUA. Semelhante ao canela (também há mudança da coloração da melanina de preto para marrom), mas aqui também ocorre uma diminuição da densidade da melanina, fazendo com que pareçam um canela pálido. O amarelo é mais pronunciado (principalmente embaixo do corpo e crista), olhos são vermelhos e peito é de coloração mostarda ou creme. As fêmeas costumam ser mais bonitas que os machos, por apresentarem cores mais brilhantes. Os sexos são praticamente iguais, tornando-se mais difícil a identificação (RUPLEY, 1999).

Albino (White Face Lutino): Ave inteiramente branca, com os olhos vermelhos e pés rosados, com ausência total de qualquer pigmentação (na realidade, resultam da combinação de duas mutações: lutino e cara branca). As fêmeas são mais fáceis de serem encontradas, por ser um padrão com herança ligada ao sexo (RUPLEY, 1999).

Cara amarela (Yellow Face ou Yellow Cheek): Surgida na Europa na década de 80. Ainda não há notícia de sua existência no Brasil. Os primeiros exemplares deste padrão chegaram aos EUA por volta de 1992. São em tudo semelhantes aos demais padrões, diferindo apenas na cor das bochechas, que, ao invés de serem vermelhas, mostram-se amarelas. A principal diferença entre os sexos é o amarelo da bochecha, que é mais forte no macho. Há três formas dessa mutação (como ocorre com o padrão prata): a dominante simples-fator, a dominante duplo-fator e a recessiva (RUPLEY, 1999).

Prata Recessivo: Mutação estabilizada na década de 60, na Europa (apesar de ter surgido na Nova Zelândia, em 1950). Difere do padrão normal pelo fato de os olhos serem de cor vermelha e o cinza global do corpo ter passado à cor prateada, ocorrendo uma grande flutuação de tonalidades entre os indivíduos. As demais características de cor são as mesmas do padrão normal, inclusive quanto à identificação do macho e da fêmea (RUPLEY, 1999).

Prata Dominante: É um padrão de cor obtido recentemente, tendo sido fixado por volta de 1979. São aves que apresentam a cor cinza do padrão normal diluída, mostrando um tom pastel prateado. Os olhos e patas são pretos, as penas cinzas, mantendo o amarelo forte das faces e da crista e o vermelho das bochechas, com um prateado mais escuro na região do pescoço. A graduação do prateado varia de ave para ave, sendo a cor dos machos mais brilhante e intensa. A diferenciação entre os sexos pode ser feita do mesmo modo que o padrão normal. Nesta mutação, os genes produzem dois efeitos visuais diferentes, caso ocorram como fator simples ou duplo. Aves fator-duplo são mais claras que as aves fator-

simples, parecendo lutinos, mas com um tom acinzentado; eles retêm a marcação mais escura na cabeça, olhos e pés escuros (RUPLEY, 1999).

Oliva ou Esmeralda (Olive ou Spangle ou Emerald Green): Mutação extremamente nova, surgida nos EUA, de padrão ainda não muito definido. Caracteriza-se, basicamente, por uma colora o canela-esverdeada, podendo variar de claro a escuro, e um padrão de marca o das penas muito característico (que as pessoas denominam padrão de "lantejoulas", ou spangled no inglês) (RUPLEY, 1999).

Platinum: Muta o são existente na Austrália. Há uma confusão com rela o a esse nome, uma vez que na América do Norte chamam de Platinum aves prata dominante. Essa muta o se caracteriza por uma colora o "cinza-fumaça" clara (como eles mesmos definem: smokey-grey), com asas e cauda cinza mais escuro. Bico, p s e patas são bege claro. Os olhos são vermelhos ao nascer, mas escurecem logo em seguida (RUPLEY, 1999).

2.1.3 Comportamento social

Em cativeiro, o sistema social   bastante complexo. Os indivíduos adultos apresentam comportamento social pouco greg rio, enquanto indivíduos jovens tendem a ser estritamente aglomerados, comumente permanecendo em grupos compactos como uma forma de defesa. Porém, possuem ainda um comportamento geralmente dócil se forem amansadas desde filhotes, para comercializa o, não sendo barulhentas, mas podem assobiar e algumas chegam até a "falar". Os machos têm essa capacidade, sendo que as fêmeas apenas assobiam (RUPLEY, 1999).

O tamanho e comportamento dos grupos formados variam de acordo com o habitat e sazonalidade. Animais jovens e adultos de ambos os sexos podem formar grandes grupos ou ainda subgrupos (RUPLEY, 1999).

Os indivíduos adultos, durante o período reprodutivo, são divididos em pares em gaiolas destinadas   reprodu o. O macho adulto tem ainda um comportamento de defesa de seu território, enquanto a fêmea se limita exclusivamente   postura e sobrevivência da ninhada (BENEZ, 2001).

Em geral, são aves resistentes quando adultas. Com uma alimenta o balanceada e cuidado adequado, podem viver até 25 anos (BENEZ, 2001).

2.1.4 Reprodu o

A reprodu o poderá ser feita a partir de 12 meses de idade e durante todo o ano, mas   aconselhável tirar apenas duas ou três ninhadas por ano. Esta ave tem seu próprio tipo de ninho, e o acasalamento não acontecerá sem essa condi o (BENEZ, 2001).

Têm uma postura de quatro a sete ovos, com incuba o de 17 a 22 dias. Os filhotes devem ser separados dos pais, com oito semanas de vida. Já na natureza, costumam se reproduzir nas épocas de chuvas, até porque os alimentos aparecem mais fartamente. Procuram geralmente um euc lpto que esteja próximo a água e faz seu ninho em algum buraco já existente na  rvore (RUPLEY, 1999).

2.1.5 Cria o no Brasil

O Brasil caracteriza-se por ser um país tropical, com temperaturas m dias elevadas, altos índices de umidade e matéria orgânica em abundância. Esta riqueza ambiental

proporciona condições favoráveis para que muitas doenças em aves, especialmente respiratórias e digestivas desenvolvam-se rapidamente, o que não acontece nos ambientes semi-áridos ou desérticos (VERSTAPPEN et al., 2002).

Recentemente a criação de calopsitas no Brasil vem se intensificando, sendo seus exemplares encontrados, em sua grande maioria, em criadouros comerciais particulares e em estabelecimentos comerciais (BENEZ, 2001).

2.2 HEMATOLOGIA

2.2.1 Hematopoiese em aves

Após o nascimento, a medula óssea das aves torna-se o principal sítio da eritropoiese e o sítio de produção dos leucócitos e trombócitos. (CAMPBELL, 1967; NICOLAS-BOLNET et al., 1991; BOUNOUS; STEDMAN, 2000).

Atualmente existem duas teorias comumente aceitas sobre a origem das células sanguíneas na medula óssea das aves: a teoria monofilética sustenta o fato de que apenas uma célula indiferenciada totipotente originária do mesênquima pode dar origem aos eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Esta teoria é similar à teoria aceita para os mamíferos. A segunda teoria, chamada de polifilética, sugere que os precursores eritróides, leucocitários e trombocitários originam-se de células precursoras distintas. De acordo com esta teoria, os eritrócitos seriam formados a partir de células indiferenciadas existentes nos sinusóides do tecido conectivo reticular. Em aves, a teoria polifilética tem sido mais aceita nos dias atuais (BARNES, 1996; BOUNES; STEDMAN, 2000).

Estudos em galinhas demonstraram que o mesênquima embrionário dá origem a “ilhas” hematopoiéticas na aorta dorsal e saco vitelínico, podendo este ser detectado após 24 horas de incubação (CAMPBELL, 1967; NICOLAS-BOLNET et al., 1991; BARNES, 1996; BOUNOUS; STEDMAN, 2000).

Os eritrócitos originaram-se do endotélio destas “ilhas” hematopoiéticas e, acredita-se que os trombócitos também se originaram deste mesmo sítio, mas de progenitores diferentes. Desta forma, a eritropoiese e provavelmente a trombopoiese têm origem intrasinusoidal ou intravascular enquanto as outras linhagens celulares hematopoiéticas originaram-se fora dos espaços vasculares (JAIN, 1993).

Apenas os eritrócitos, os trombócitos e seus precursores são comumente observados na corrente circulatória do embrião, sendo pouco comum a observação de precursores leucocitários (CAMPBELL, 1967; NICOLAS-BOLNET et al., 1991; BARNES, 1996; BOUNOUS; STEDMAN, 2000).

Os leucócitos e seus precursores permanecem em seus compartimentos hematopoiéticos até momentos antes do nascimento. Medula óssea, saco vitelínico e baço são os maiores centros hematopoiéticos, com exceção da linfopoiese, que acontece fundamentalmente no timo e bursa de Fabricius (CAMPBELL, 1967).

O saco vitelínico é o primordial sítio hematopoiético embrionário nas aves. O baço tem papel importante na hematopoiese embrionária, predominando a granulopoiese. Próximo ao momento do nascimento, o baço torna-se um órgão linfopoiético (NICOLAS-BOLNET et al., 1991).

Neste período, pequenas ilhas hematopoiéticas podem ser observadas ao redor de espaços vasculares de praticamente todos os tecidos embrionários, como aorta, coração, faringe, subcutâneo, músculos, gônadas, pâncreas e rins. Após o nascimento, os ossos longos

e as vértebras tornam-se os principais sítios hematoipoiéticos (CAMPBELL, 1967; NICOLAS-BOLNET et al., 1991; BARNES, 1996; BOUNOUS; STEDMAN, 2000).

Os sinusóides medulares das aves são compostos por endotélio desprovido de membrana basal. O endotélio apresenta-se contínuo e impede a entrada de células imaturas na circulação (CAMPBELL, 1967).

Os precursores dos trombócitos podem ser indistinguíveis dos precursores eritrocitários (BOUNOUS; STEDMAN, 2000).

Os estágios de desenvolvimento da linhagem eritróide incluem pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, reticulócitos e eritrócitos maduros (CAMPBELL, 1967; BARNES, 1996; BOUNOUS; STEDMAN, 2000).

2.2.2 Técnicas hematológicas

A. Obtenção de amostras sanguíneas

Para obtenção de amostras sanguíneas deve-se ter cuidados especiais, a fim de se evitar o estresse sistêmico promovido pelo ato da captura e método de contenção. Amostras obtidas sob as condições anteriores, podem provocar artefatos principalmente durante o exame hematológico (BHATTACHARYYA; SARKAR, 1968; MAXWELL, 1993). O principal artefato encontrado em aves estressadas é a chamada heterofilia de estresse, promovida pela liberação de adrenalina e corticóides (MAXWELL, 1993). Desta forma, as coletas devem ser realizadas seguindo técnicas semiológicas específicas para aves, levando-se em consideração as particularidades da espécie trabalhada (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

A determinação da volemia das aves é realizada considerando-se 10% de seu peso vivo. O valor máximo seguro para coletas sanguíneas é fixado em 1% do peso vivo total, correspondendo a 10% do sangue total dos animais, e a venopunção é o método de escolha para obtenção de amostras sanguíneas em aves grandes (FUDGE, 2000).

Em calopsitas, por serem aves de pequeno porte, as coletas sanguíneas comumente são realizadas mediante rápida contenção, a partir do corte de unha do dedo médio das aves selecionadas, fazendo-se uso de antisepsia local. Este método é considerado menos doloroso do que a punção através da veia braquial, localizada medialmente e superficialmente à asa. O corte de unha, apesar de causar um certo desconforto ao animal, é a via utilizada para obtenção de sangue no exame de rotina para sexagem das aves. Além disso, é mais seguro para confiabilidade dos resultados do que a utilização de uma seringa, visto que a aspiração rápida ou transferência da amostra para um frasco, por meio de uma agulha fina, pode causar lise de eritrócitos, além da demora do processo, levar à formação de coágulos (MOURA et al., 2004).

Para a coleta, utilizam-se vários capilares heparinizados; alguns preenchidos já são utilizados para o hematócrito e a proteína plasmática total; com outros, já com sangue e anticoagulante, parte é colocada em tubos de ensaio de 5 ml para a determinação de outros parâmetros do hemograma; e ainda, são confeccionados esfregaços sanguíneos sem contato com o anticoagulante, direto do dedo da ave, para leucometria específica e hematoscopia, sendo estocados após serem secos, em porta-lâminas.

B. Anticoagulantes

Existem divergências de opiniões sobre o melhor anticoagulante para uso em exames de aves. Estas levam em consideração o método utilizado para o processamento do hemograma,

o tempo entre coleta, processamento e qualidade das amostras (FUDGE, 1996, 2000; GREEN; BLUE-McLENDOM, 2000; VILAR et al., 2003).

O anticoagulante mais utilizado para a realização do hemograma completo em mamíferos é o ácido etileno diaminotetracético (EDTA), pois preserva adequadamente as características qualitativas e quantitativas dos elementos figurados sanguíneos por longos períodos de tempo, quando comparado com os demais anticoagulantes, embora amostras mantidas em contato com EDTA por longos períodos de tempo podem ser susceptíveis a alterações osmóticas (CAMPBELL, 1994; FUDGE, 1996, 2000).

O sangue de aves, coletado em EDTA está propenso a alterações osmóticas, principalmente em relação à linhagem eritróide. Os eritrócitos de aves, mantidos em contato por tempo prolongado com EDTA tornam-se aumentados de volume, determinando alterações no volume globular (VG) e volume globular médio (VGM). Estas alterações são dependentes do tempo e contato e tornam-se bem evidentes em 24 a 48 horas após o contato (CAMPBELL, 1994; FUDGE, 1996, 2000).

A hemodiluição não é um artefato considerável quando utilizado o EDTA liofilizado e cerca de 4,5 ml de sangue total. A quantidade de sangue coletado é um fator crítico para aves pequenas, pois muitas vezes trabalha-se com aves de pequeno peso corporal, não permitindo coletas de volumes adequados e correspondentes à quantidade de anticoagulante utilizado nos tubos disponíveis comercialmente (FUDGE, 2000).

Os eritrócitos de aves apresentam tendência à hemólise e pobre preservação destas células, quando em contato com EDTA (FUDGE, 2000; GREEN; BLUE-McLENDOM, 2000; VILAR et al., 2003).

Amostras sanguíneas coletadas utilizando-se heparina como anticoagulante podem servir para uma grande variedade de testes como: hemogramas completos, diagnósticos genéticos e exames bioquímicos, embora algumas desvantagens possam ser evidenciadas para a realização do hemograma completo. A heparina frequentemente provoca alterações tintoriais nas colorações de Romanowsky, promovendo a formação de halos róseos em volta dos leucócitos, além de causar aglutinação de heterófilos; como consequência há um aumento do espalhamento da população destas células, quando comparados com a homogeneidade daquelas coletadas em citrato. (GREEN; BLUE-McLENDOM, 2000).

É recomendado que os esfregaços sanguíneos sejam feitos imediatamente após a coleta, a fim de se obter uma melhor visualização da morfologia das células. Alguns laboratórios que utilizam o método acima descrito confirmam que esfregaços frescos sem contato com anticoagulantes têm muito menos células lisadas e com boa preservação morfológica (FUDGE, 1996, 2000; GREEN; BLUE-McLENDOM, 2000; VILAR et al., 2003).

C. Esfregaços sanguíneos

O esfregaço sanguíneo é provavelmente o mais importante exame de rotina hematológica de qualquer espécie. Um bom esfregaço sanguíneo pode prover informações valiosas sobre a morfologia e distribuição dos elementos figurados sanguíneos (CAMPBELL, 1994; FUDGE, 2000; VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004).

A técnica do esfregaço sanguíneo consiste na colocação de uma pequena gota de sangue em uma das extremidades de uma lâmina de vidro para microscopia, devendo o sangue ser distendido por uma lâmina extensora posicionada em ângulo de aproximadamente 45°. Após a confecção, os esfregaços devem ser secos ao ar, identificados e armazenados para futuro processo de coloração (VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004).

D. Processos de coloração hematológica

Romanovsky foi o primeiro pesquisador a utilizar a combinação dos corantes azul de metileno e eosina para a coloração hematológica. O propósito desta mistura era a formação de características tintoriais secundárias oriundas dos dois corantes, azul de metileno e eosina, chamados de corantes “Romanovsky modificados”. O azul de metileno é oxidado para formar azules secundários chamados de: Azure A, Azure B e Azure C. O azul de metileno oxidado também é chamado de azul de metileno policromático. A oxidação do azul de metileno ocorre com a adição de compostos alcalinos (SCHALM, 1965).

O corante de Wright é formado com azul de metileno policromático adicionado a bicarbonato e eosina. Os azules são corantes básicos e por esta característica, são atraídos por substâncias ácidas nas células, em contrapartida, a eosina é o corante ácido e tem afinidade por compostos celulares alcalinos (SCHALM, 1965).

A combinação de corantes ácidos e básicos leva à formação de sais do corante ácido (eosinatos), sendo chamados de corantes neutros. Os corantes neutros são solúveis em álcool metílico ou etílico absolutos, mas estas soluções alcoólicas tendem a reter os pigmentos, não os disponibilizando para a coloração das células. Desta forma, é necessária a adição de água destilada ou deionizada a fim de forçar a precipitação destes corantes, disponibilizando-os para as células (SCHALM, 1965).

A água utilizada nos processos de coloração deve ter o pH adequado a fim de promover uma coloração diferencial ótima, pois a utilização de água destilada de pH alcalino favorece a impregnação da coloração alcalina tornando as células mais basofílicas. Da mesma forma, a utilização de água com pH demasiadamente ácido provoca acidificação da coloração (SCHALM, 1965).

O processo de coloração só deve ser realizado após a fixação do material a ser corado. Os esfregaços sanguíneos devem ser fixados pelo álcool metílico absoluto de pH neutro e livre de contaminação pelo ácido acético (SCHALM, 1965).

2.2.3 Hemograma

O hemograma das aves representa uma coleção de testes que avaliam quantitativamente e qualitativamente os elementos figurados sanguíneos. Estes testes podem ser facilmente realizados em laboratórios clínicos veterinários de maneira rápida e barata, provendo informações de grande importância sobre a sanidade dos animais examinados. O valor do hemograma confirmando saúde e avaliando doenças é bem estabelecido na maioria das espécies domésticas (COLES, 1984).

Diversos laboratórios veterinários variam em suas escolhas quanto às técnicas realizadas para a determinação de parâmetros do hemograma em aves. Estas escolhas devem-se, em parte, ao tempo de realização do procedimento, reprodutibilidade e custo operacional (CAMPBELL, 1984; FUDGE, 2000; VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004).

A. Hematócrito (Ht) ou volume globular (VG)

Como em outros animais domésticos, o método do microhematócrito pode ser utilizado para determinação do volume globular (VG) em aves (BIERER et al., 1963; COHEN, 1964).

O termo hematócrito tem como significado “separar sangue” e a técnica mais comumente utilizada é a técnica do microhematócrito, tendo como principais vantagens o pequeno volume de sangue necessário e o curto tempo para sua realização (COHEN, 1964).

O VG é a mensuração da relação de volume de eritrócitos em relação ao plasma, provendo uma maneira rápida e eficaz de mensurar a massa eritrocitária (SATO, 1960; BIERRER et al., 1963; COHEN, 1964).

A técnica consiste no preenchimento de tubos capilares com sangue total até 2/3 de seu volume. Após o preenchimento os tubos devem ser devidamente selados e submetidos a uma força centrífuga de 15.000 rotações por minuto em aproximadamente 5 minutos, a fim de promover uma sedimentação constante dos glóbulos vermelhos. Após este processo, os capilares com sangue sedimentado devem ser lidos em escalas padronizadas marcadas de 0 a 100%. Os resultados são expressos em porcentagem (BIERRER et al., 1963; COHEN, 1964).

Amostras sanguíneas em contato prolongado com anticoagulantes podem apresentar valores de volume globular, falsamente diminuídos (COHEN, 1964).

Informações importantes podem ser obtidas através da observação do plasma separado. A cor e a turbidez do plasma podem indicar hemólise (plasma avermelhado), icterícia (plasma amarelado) ou lipemia (plasma esbranquiçado). A detecção de icterícia deve ser realizada com cautela, pois aves que têm em sua alimentação carotenóides, podem apresentar plasma fisiologicamente amarelado (SATO, 1960; BIERER et al., 1963; COHEN, 1964; FUDGE, 2000).

Numerosas situações podem causar alterações do VG (STOSKOPF; NEELY, 1982). Valores aumentados para VG podem ser observados em indivíduos machos adultos, especialmente quando em períodos reprodutivo. Aves de localidades geográficas de altas altitudes tendem a ter valores de VG cerca de 7 a 10% mais elevados do que aquelas que vivem em baixas altitudes. A desidratação pode elevar consideravelmente os valores de VG (DENNINGTON; LUCAS, 1955; SATO, 1960; BIERER et al., 1963; COHEN, 1964; HATTINGH; SMITH, 1976; FUDGE, 2000). Valores diminuídos de VG evidenciam anemia e podem ser observados em processos hemorrágicos, doenças crônicas e carências de certos minerais como ferro e cobre, comprometendo a formação do heme e conseqüentemente a eritropoiese (FUDGE, 2000).

O VG pode fornecer alguma informação sobre a quantificação dos leucócitos, através da observação da espessura da capa leucocitária. (BIERER et al., 1963; COHEN, 1964; HATTINGH; SMITH, 1976; FUDGE, 2000).

B. Proteínas plasmáticas totais (PPT)

As proteínas plasmáticas compõem um grupo heterogêneo de compostos químicos que incluem a albumina, quatro frações de globulinas (incluindo glico e lipoproteínas) e fibrinogênio. As PPT têm um papel muito importante na homeostase protéica, pois sua determinação pode ser a maneira mais fácil e prática de avaliar a concentração de proteínas em aves. Valores para PPT em aves já foram descritos, de uma forma geral em aves pequenas oscilam entre 3,5 e 6 g/dl. A determinação das PPT pode ser utilizada com valor prognóstico em aves (ALTMAN et al., 1975).

Ainda, valores de PPT podem ser utilizados para averiguar o grau de hidratação das aves e podem apresentar-se notavelmente aumentados quando uma ave apresentar-se desidratada (IVINS et al., 1978).

Valores diminuídos de PPT podem ser observados em aves com doenças hepáticas crônicas (MCDUGALD; HENSEN, 1969), afecções renais, má nutrição e hiper-hidratações iatrogênicas (HALLIWELL, 1971).

C. Hemoglobinometria (Hbm)

A mensuração da hemoglobina deve ser realizada utilizando-se o método da cianometahemoglobina, sendo este o método de referência para sua determinação. O método da cianometahemoglobina é capaz de promover reação com todos os tipos de hemoglobina exceto a sufahemoglobina. O princípio deste método é a oxidação do ferro ferroso presente no

componente prostético da hemoglobina (heme) em ferro férrico pela ação do ferrocianeto de potássio presente no reagente de Drabkin. O composto resultante é denominado hemoglobina (Hi) que reage com o cianeto de potássio originando cianeto de hemoglobina (HiCN). A quantificação do cianeto de hemoglobina pode ser feita por colorimetria através de espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 540 nm (SCHALM, 1965).

A técnica aplicada às aves necessita de adaptações, devido às suas características eritrócitárias, que por possuírem núcleo, durante o processo de hemólise, acabam por liberá-los interferindo-se nas leituras espectrofotométricas. Desta forma, é necessário que haja a centrifugação dos tubos testes antes das leituras espectrofotométricas, a fim de promover a sedimentação dos núcleos (FUDGE, 2000; VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004).

A mensuração automática da hemoglobina em amostras contendo hemoparasitos ou amostras lipêmicas podem interferir nos resultados, provocando um falso aumento da hemoglobinometria (DEIN, 1984; FUDGE, 2000).

D. Contagens globais hematológicas

Desde o início do século passado, mais precisamente na primeira década do século XX, Wartin (1907) e outros estudiosos em hematologia veterinária desenvolveram métodos diretos e indiretos para contagem global, em conjunto ou não dos glóbulos sanguíneos de aves, répteis e anfíbios. Nestes animais, os eritrócitos e trombócitos são nucleados e, desta forma, ao se estabelecer contagens, certas confusões são frequentes devido às características serem muito semelhantes entre alguns elementos figurados sanguíneos.

Por esta razão, Schmeisser (1915) descreveu um método indireto em que os eritrócitos e leucócitos eram contados de maneira ordinária, utilizando-se esfregaços sanguíneos e então correlacionados.

Blain (1928) foi o primeiro a introduzir método direto de contagem de glóbulos sanguíneos utilizando-se fluido diluente contendo vermelho neutro, em hemocítômetro, afirmando ser esta solução capaz de possibilitar a diferenciação entre leucócitos e eritrócitos. Neste método apenas os polimorfonucleares apresentavam-se adequadamente corados, enquanto os outros tipos de leucócitos se perdiam. Este autor não identificou nenhuma célula correspondente às plaquetas dos mamíferos no sangue de aves, o que leva a crer que, provavelmente incluiu os trombócitos nas contagens ou de eritrócitos ou de leucócitos.

Forkner (1929) descreveu um método de contagem com solução de vermelho neutro em que somente os polimorfonucleares e monócitos apresentavam-se corados, devendo ser contados no hemocítômetro de Neubauer, enquanto o número total de linfócitos seria calculado indiretamente em esfregaços sanguíneos.

Shaw (1930) descreveu as dificuldades de se obter a contagem global de leucócitos em aves, pelo fato dos eritrócitos e trombócitos apresentarem-se nucleados, impedindo a utilização de métodos hemolisantes, como os utilizados em mamíferos.

Wiseman (1931), afirma que contagens obtidas por métodos diretos, em hemocítômetro, são mais acuradas que as obtidas por métodos indiretos, por estimativa.

Posteriormente, Wiseman (1931), relata que o corante vermelho neutro impregna polimorfonucleares e monócitos, mas dificulta a identificação em hemocítômetro e alerta sobre a grande variação de identificação correta dos tipos leucocitários. Desta forma, propõe a combinação do corante floxina (50 mg) com formalina (5 ml) e solução de Ringer (95 ml). Segundo Wiseman (1931) esta solução preserva os eritrócitos indefinidamente, além de proporcionar uma coloração brilhante para os grânulos eosinofílicos dos eosinófilos e heterófilos. Os demais tipos celulares se corariam com menos brilho e não se confundiriam com os leucócitos contendo grânulos eosinofílicos.

Com o objetivo de eliminar o uso de qualquer método de contagens celulares globais, foram realizados experimentos a fim de se obter diluentes contendo matrizes que pudessem evidenciar colorações diferenciadas para leucócitos e trombócitos e que também preservassem eritrócitos. Estes estudos evidenciaram que o vermelho neutro e o cristal violeta preenchiam tais requisitos, quando diluídos nas soluções com cloreto de sódio, água destilada, citrato de sódio e formaldeído (WETMORE, 1940).

Blain (1928), Coates (1929), Forkner (1929) e Wiseman (1931) sugeriram o uso de azul de cresil brilhante como sendo capaz de auxiliar na diferenciação dos glóbulos sanguíneos usando método direto de contagem global.

Natt e Herrick (1952) introduziram um diluente para a contagem de eritrócitos de peixes constituído de duas soluções: uma contendo piroina e metil violeta 2B, que é combinada com a solução de formalina-Locke modificada e depois filtrada; ambas as soluções estoque têm a vantagem de serem estáveis.

Darcel e Le (1950) apresentam um novo diluente para glóbulos sanguíneos de aves, que consiste de duas soluções: uma contendo o corante de Giemsa e outra contendo cloreto de sódio, citrato de sódio e formalina neutra, em água destilada. As duas soluções são misturadas e filtradas. O diluente resultante é instável e precisa ser preparado diariamente. A amostra de sangue precisa entrar em contato com a solução por horas até que se obtenha uma boa impregnação.

Natt e Herrick (1952) procuraram obter uma diluição estável, de fácil manipulação e que permitisse uma diferenciação satisfatória dos tipos de leucócitos no hemocítmetro. O diluente, resultado de seus estudos teria a vantagem de ser uma única solução que se mantinha estável por até dois anos após preparação. A solução deveria ser uma pressão osmótica próxima a do plasma de galinha, não provocando ruptura dos glóbulos sanguíneos. Os componentes tintoriais da solução a seguir foram aproveitados da solução proposta por Natt e Herrick (1952) para contagem de glóbulos sanguíneos de peixes, sendo considerada satisfatória para a diferenciação dos glóbulos sanguíneos de galinhas. O diluente de Natt-Herrick tem a seguinte composição: Na Cl (3,88 g), Na₂SO₄ (2,50 g), Na₂HPO₄ 12 H₂O (2,91 g), KH₂PO₄ (0,25g), Formalina - 37% (7,5 ml) e Metil Violeta 2B (0,10 g).

Os componentes são diluídos em água destilada a um volume total de um litro em balão volumétrico, devendo ser mantida por toda uma noite e filtrada no dia subsequente, em filtro de papel número 2, estando então pronta para uso.

A técnica consiste no preenchimento de uma pipeta de Thomas (para glóbulos vermelhos) com sangue até a marca 0,5, completando-se com a solução de Natt-Herrick até a marca 101, aguardando-se de 1 a 2 minutos, e então homogeneizando a suspensão para posterior observação em hemocítmetro em aumento de 400x; recomenda-se contar os eritrócitos e leucócitos da mesma maneira que se procede para mamíferos (NATT; HERRICK, 1952).

Nesta técnica os três glóbulos sanguíneos são facilmente identificados: Em relação aos leucócitos, o núcleo dos mononucleares coram-se em um denso azul-violáceo, o núcleo e o citoplasma dos polimorfonucleares coram-se em violeta claro e os grânulos citoplasmáticos dos polimorfonucleares em azul-violáceo, quase negro, o que facilmente os distingue dos demais leucócitos. Os trombócitos têm a forma elíptica com núcleo corado em violeta claro; seu citoplasma usualmente hialino pode adquirir um tom levemente violáceo (NATT; HERRICK, 1952).

Comparando seu diluente com o de Gowers e com o método do fluido de Hayem utilizado para coelhos, Natt e Herrick (1952) através de seis contagens para cada método, obtiveram repetibilidade satisfatória. Essa é a técnica mais comumente utilizada em diversos laboratórios veterinários para contagens de glóbulos sanguíneos de aves e répteis (FUDGE, 2000; GREEN; BLUE Mc LENDON, 2000; PIERSON, 2000).

Segundo Pierson (2000), a desvantagem do método de Natt-Herrick é a dificuldade em diferenciar pequenos linfócitos de trombócitos, que pode resultar em contagens falsamente elevadas de leucócitos.

Villar et al. (2003) propuseram um método para determinação de parâmetros hematológicos em aves, utilizando a solução de Natt-Herrick em macrodiluição. Para a contagem de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, a técnica propõe o uso de 1,98 ml da solução diluente, acrescida de 0,02 ml (20 µl) de sangue homogeneizado, promovendo uma diluição de 1:100. As contagens globais são realizadas no hemocitômetro de Neubauer. A hematimetria é realizada no quadrado central do hemocitômetro utilizando-se apenas 1/5 do quadrado central (0,2 mm³), tendo 5.000 como fator de correção. A leucometria global é realizada utilizando-se a soma dos quatro quadrados laterais do hemocitômetro (4 mm³) e multiplicando por 250 como fator de correção. Os trombócitos são contados utilizando-se os 25 quadrados do quadrado central do hemocitômetro (1 mm³) tendo 1.000 como fator de correção.

Stelling et al. (2004) utilizaram a mesma técnica de contagem para a avaliação de parâmetros do hemograma em aves.

E. Índices hematimétricos

Os índices hematimétricos compreendem o VGM (Volume Globular Médio) e o CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média). Estes índices podem ser obtidos facilmente através de fórmulas utilizando-se o hematócrito, hematimetria e hemoglobinometria. O VGM é um índice que tem como objetivo informar sobre a média do tamanho dos glóbulos vermelhos. O CHGM fornecerá informações sobre a concentração de hemoglobina nos eritrócitos (CAMPBELL, 1995; FUDGE, 2000; GREEN; BLUE-McLENDON, 2000). Os índices hematimétricos de aves são calculados de forma comum aos dos mamíferos. Para o VGM em fl multiplica-se o valor do hematócrito por 10 e divide-se pelo número de hemácias ($VGM (fl) = Ht \times 10 / Hm$) e para o CHGM em g/dL multiplica-se o valor da hemoglobina por 100 e divide-se o valor pelo hematócrito ($CHGM (g/dl) = Hb \times 100 / Ht$).

F. Leucometria específica

A leucometria específica é realizada através do esfregaço sanguíneo corado e permite um acesso rápido e importante à morfologia e contagem relativa dos leucócitos (FUDGE, 2000; GREEN; BLUE-McLENDON, 2000; VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004). A contagem relativa dos leucócitos leva em consideração o resultado obtido da leucometria global para a obtenção dos valores absolutos em microlitros (BEACON, 1928; DEIN, 1984).

A precisão da leucometria específica depende da correta identificação dos leucócitos no esfregaço sanguíneo e também da correta confecção e coloração dos esfregaços sanguíneos (BEACON, 1928; VILAR et al., 2003).

A aparência dos leucócitos pode ser dramaticamente influenciada pelo método de coloração escolhido. Métodos rápidos de coloração, como panótico ou Diff-Quick, comumente apresentam colorações de qualidade inferior para leucócitos quando comparados com as metodologias tradicionais de coloração hematológica (DEIN, 1984; FUDGE, 2000).

A técnica de contagem para obtenção da leucometria específica deve ser realizada corretamente, a fim de se obter dados representativos da real distribuição dos leucócitos (FUDGE, 2000). A contagem de leucócitos deve ser realizada nos bordos dos esfregaços sanguíneos, perfazendo uma contagem diferencial de 100 células, sendo 50 em cada extremidade do esfregaço, obtendo-se desta forma a porcentagem de cada tipo leucocitário (BEACON, 1928; VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004).

2.2.4 Morfologia das células sanguíneas

A. Morfologia dos eritrócitos

Os eritrócitos das aves são células nucleadas e elípticas, possuindo um núcleo central, com cromatina condensada, que se torna cada vez mais condensada de acordo com a idade do eritrócito, e sua forma, varia de um oval alongado até uma forma da gota. A coloração do citoplasma é róseo-alaranjada e uniforme quando corado com os diversos corantes de Romanowsky. Eritrócitos policromatófilos jovens, normalmente compreendem aproximadamente 1 a 2 % da população total de eritrócitos e refletem diretamente o *status* da produção medular de eritrócitos. Os eritrócitos imaturos possuem formato mais arredondado quando comparados aos eritrócitos maduros, e com coloração citoplasmática um tanto quanto basofílica. Seus núcleos são também mais arredondados e muito menos condensados que os núcleos de eritrócitos maduros (Figura 1) (GREEN; BLUE-Mc LENDON, 2000).

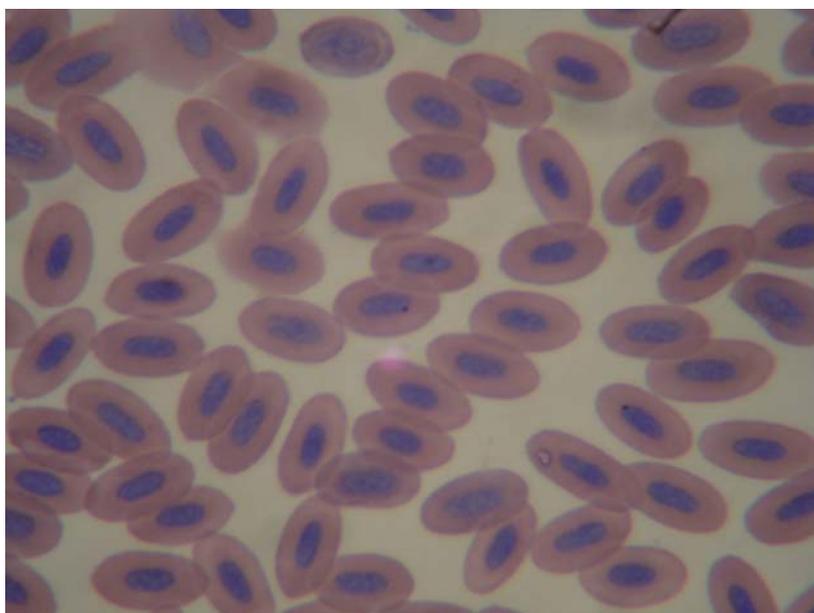


Figura 1. Visualização de eritrócitos de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x).

A contagem de reticulócitos não é comumente realizada no sangue das aves pequenas, embora possa ser utilizada em outras espécies de aves. Utilizando-se corantes de Romanowsky, os reticulócitos tendem a ser levemente maiores e mais basofílicos que eritrócitos maduros (GREEN; BLUE-Mc LENDON, 2000).

Segundo Campbell (1995) o corante supra-vital Novo Azul de Metileno (NAM) revela um número variado de agregados de RNA de coloração azul escura, que cercam o núcleo do reticulócito.

B. Morfologia dos trombócitos

O trombócito de ave é uma célula nucleada que possui aproximadamente metade do tamanho dos eritrócitos. Possui uma forma que varia de redonda a oval, com um núcleo picnótico, redondo, condensado e uma quantidade moderada de citoplasma hialino. O citoplasma freqüentemente possui diversos grânulos de coloração eosinofílica e pode

apresentar vacúolos, o que é mais comumente notada em trombócitos ativados (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

Estas células freqüentemente tendem a agrupar-se em blocos de trombócitos reativos em esfregaços sanguíneos, o que dificulta a contagem. Uma contagem qualitativa dos trombócitos é freqüentemente realizada durante a avaliação do esfregaço sanguíneo e usualmente reportada como diminuída, adequada ou aumentada. O número adequado de trombócitos é usualmente associado com o achado de cinco a dez células por cinco campos microscópicos com objetiva de imersão, realizado no esfregaço sanguíneo. Os imaturos também são ocasionalmente notados no esfregaço, indicando alteração na sua produção. Seu tamanho é um tanto quanto maior que trombócitos maduros (próximo ao tamanho de um linfócito grande). Seu núcleo é arredondado, com cromatina condensada e bem moldada; seu citoplasma é ligeiramente basófilo e com um número aumentado de pequenos grânulos eosinofílicos arredondados, similares àqueles encontrados em trombócitos maduros (Figura 2) (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000). Doenças hemorrágicas nas aves, causada por disfunção dos trombócitos é incomum (BERMUDEZ et al., 1997).

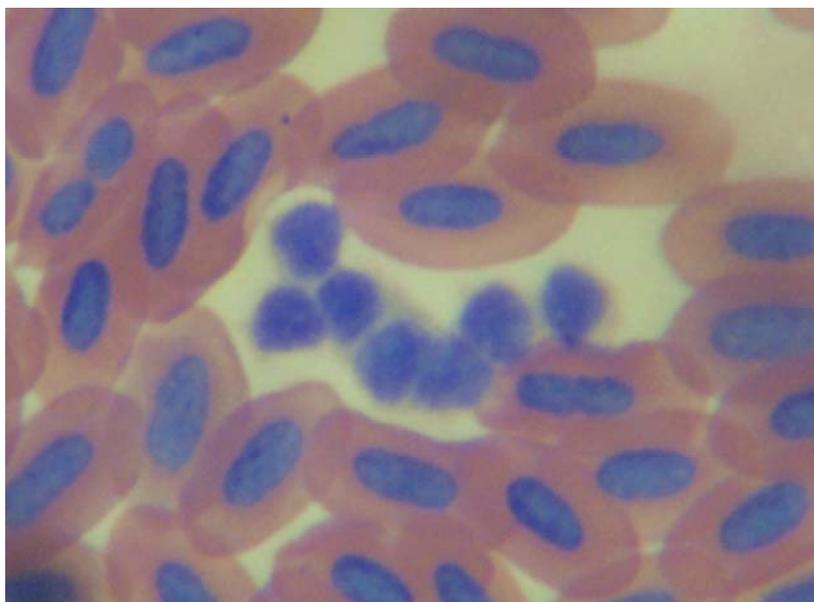


Figura 2. Visualização de trombócitos de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x).

C. Morfologia dos granulócitos

C.1. Morfologia dos heterófilos

Os heterófilos são as células brancas mais numerosas encontradas no sangue das aves e possuem função similar a dos neutrófilos no sangue dos mamíferos. O heterófilo maduro é o uma célula arredondada, com núcleo segmentado e freqüentemente está parcialmente coberto por numerosos grânulos, que variam seu formato de redondo a fusiforme, com coloração eosinofílica variando do vermelho ao alaranjado. O citoplasma é hialino no heterófilo maduro (Figura 3) (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

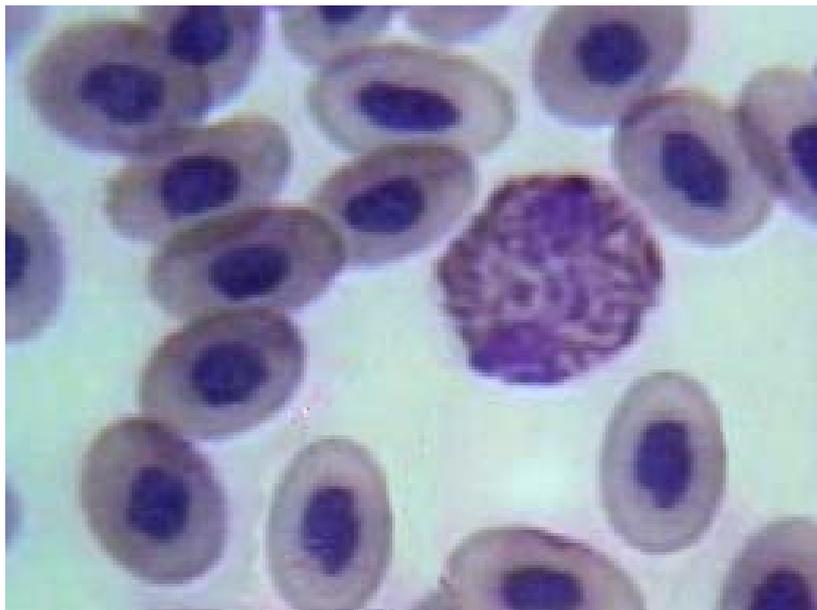


Figura 3. Visualização de heterófilo de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x).

As células imaturas são incomuns no sangue de aves sadias, e seus estágios de maturação são baseados na forma do núcleo, como em outras espécies. O citoplasma dos heterófilos imaturos é discretamente mais basofílico do que os heterófilos maduros. A granulação dos heterófilos imaturos apresenta-se com um número moderado de grânulos basofílicos e arredondados; as células intermediárias apresentam grânulos arredondados e eosinofílicos em maior quantidade e as células maduras possuem predominantemente grânulos eosinofílicos em formato fusiforme. O número aumentado de células imaturas da linhagem granulocítica heterofílica no sangue das aves, decorre do aumento da demanda por heterófilos, e está frequentemente associado a doenças inflamatórias agudas. Em infecções agudas severas, é comum observar-se granulação anormal dos heterófilos, caracterizada por células pouco granuladas ou que mantêm grânulos arredondados dos precursores (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

De acordo com Campbell (1995) em infecções agudas severas, heterófilos podem degranular-se parcialmente, manifestar presença de cariorrexia e presença de intensa basofilia citoplasmática.

C.2. Morfologia dos eosinófilos

Os eosinófilos são encontrados em pequeno número no sangue de aves sadias. As células frequentemente possuem núcleo bilobado, com abundantes grânulos róseo-avermelhados redondos e citoplasma discretamente basofílica (Figura 4) (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

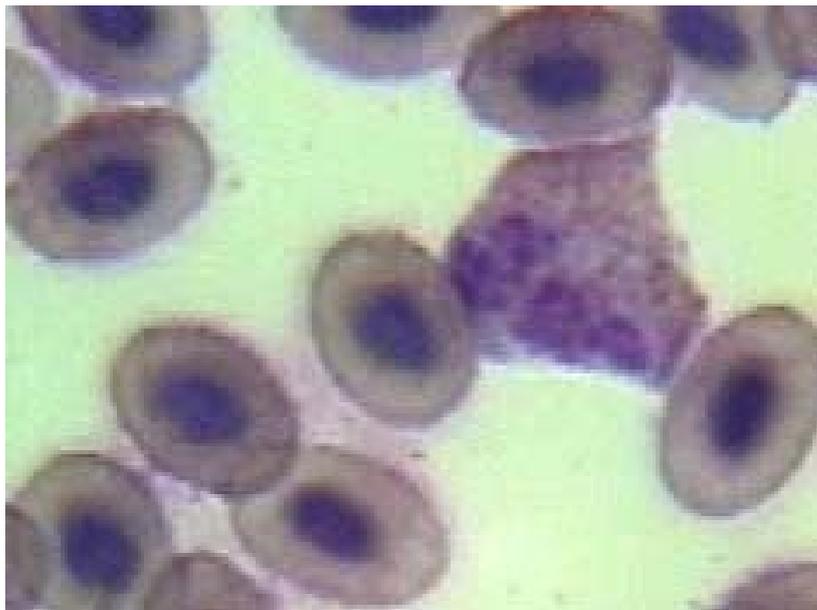


Figura 4. Visualização de eosinófilo de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x).

Os grânulos dos precursores dos eosinófilos são maiores e grânulos primários podem também estar presentes em seu citoplasma. O parasitismo parece induzir eosinofilia, menos comumente nas aves do que em mamíferos (GREEN; BLUE-Mc LENDON, 2000).

C.3. Morfologia dos basófilos

Os basófilos também são encontrados em pequeno número no sangue de aves em estado de saúde; todavia, são mais comuns que eosinófilos em animais jovens; são ligeiramente menores que os heterófilos e possuem núcleo não segmentado, variando de redondo a oval. O citoplasma do basófilo é escasso e frequentemente possui distinguível coloração basofílica. Os numerosos grânulos coram-se com metacromasia e comumente dissolvem-se com corante de Romanowsky de rotina, deixando o citoplasma com aparência vacuolisada. Poucos grânulos basófilos mostram-se presentes para a classificação celular. A função dos basófilos não é clara nas aves, porém a basofilia é ocasionalmente notada em reações de hipersensibilidade e doenças respiratórias crônicas (Figura 5) (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

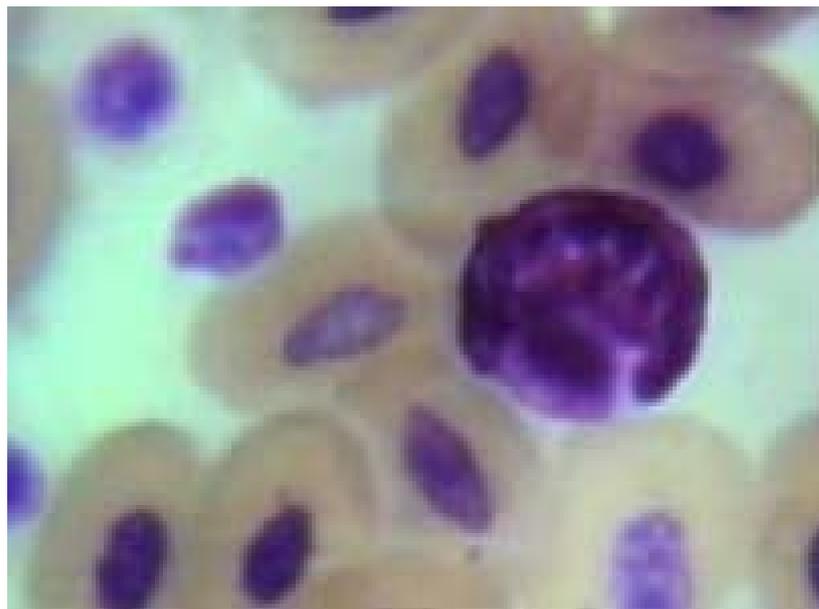


Figura 5. Visualização de basófilo de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)

D. Morfologia dos agranulócitos

D.1 Morfologia dos linfócitos

Os linfócitos são o segundo tipo celular de leucócitos mais encontrados no sangue de aves sadias. As linfopenias são comumente associadas a doenças que cursam com estresse. A morfologia dos linfócitos é similar a de todas as espécies de aves, variando de pequenos linfócitos, que podem ser de difícil diferenciação de trombócitos, a linfócitos intermediários ou grandes linfócitos, que podem se tornar reativos (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

A forma nuclear dos pequenos linfócitos é redonda com padrão de cromatina frouxo; seu citoplasma varia em quantidade, de escasso a moderado e comumente apresenta-se discretamente basofílico; esta característica é muito útil na distinção entre pequenos linfócitos e trombócitos, que apresentam citoplasma hialino (Figura 6) (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

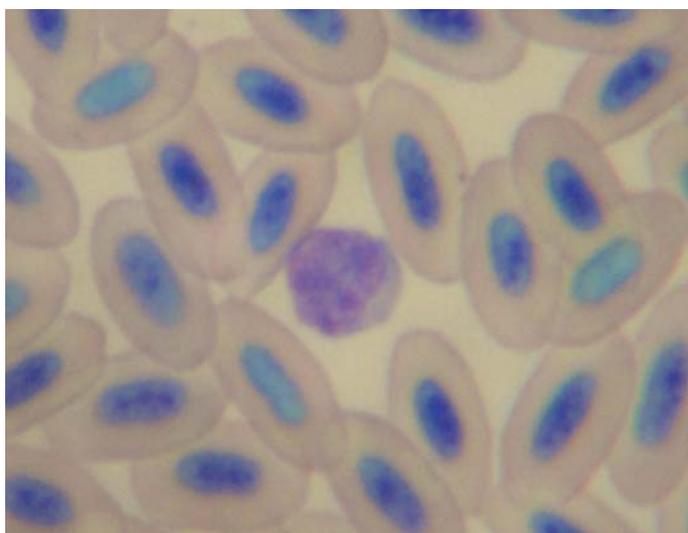


Figura 6. Visualização de linfócito de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x).

Linfócitos degenerados podem apresentar citoplasma escasso ou vacúolos citoplasmáticos. Ocasionalmente pode-se encontrar grandes linfócitos com alguns poucos grânulos azurófilos, similares aos encontrados em linfócitos Natural Killer nos mamíferos. Imunócitos ou linfócitos reativos podem ser observados em aves, principalmente durante respostas imunes e de convalescença (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000). Marcadas leucocitoses com linfocitoses, de pequenos ou grandes linfócitos podem ser sugestivas de leucemias linfocíticas nas aves (GREGORY et al., 1996).

D.2. Morfologia dos monócitos

Os monócitos são encontrados em pequeno número no sangue de aves saudáveis, e sua morfologia é bem similar a de monócitos dos mamíferos. São células grandes, pleomórficas, com moderada quantidade de citoplasma azul-acinzentado, que ocasionalmente podendo apresentar discretos vacúolos. Seu núcleo é pleomórfico, com um padrão de cromatina frouxo e um pouco menos condensado que o dos linfócitos. Grânulos citoplasmáticos distinguíveis são incomuns nestas células (Figura 7) (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

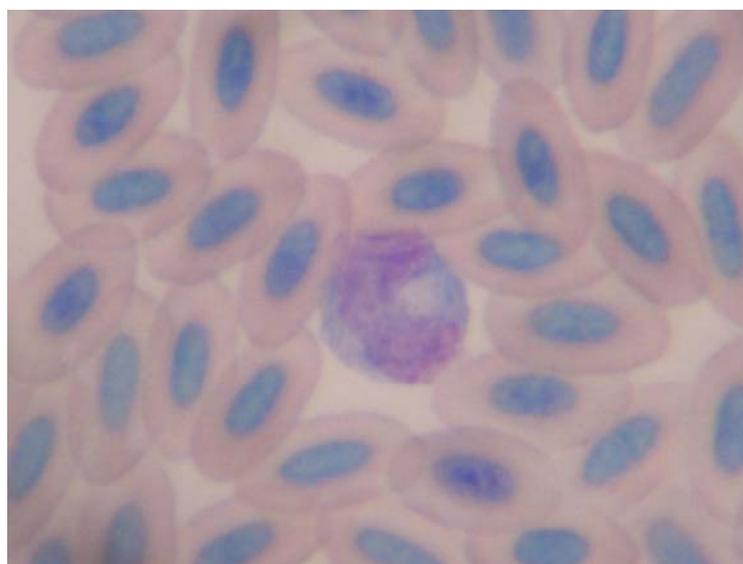


Figura 7. Visualização de monócito de calopsita – *Nymphicus hollandicus* (May-Grunwald-Giemsa, 1000 x)

A diferenciação entre monócitos e grandes linfócitos reativos pode ser um desafio nos esfregaços sanguíneos. Leucocitoses com monocitoses são frequentemente associadas a várias doenças granulomatosas crônicas das aves, incluindo micoses e afecções que provocam marcada necrose tissular (GREEN; BLUE-McLENDON, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados três criatórios de calopsitas, localizados nos municípios de Niterói, Maricá e Rio de Janeiro, situados no Estado do Rio de Janeiro, totalizando um plantel

estimado em mais de 150 aves, distribuídas em diferentes faixas etárias, onde o manejo é considerado zootecnicamente adequado(Figuras 8 e 9).



Figura 8. Vista parcial de animais em gaiolas de um dos criatórios



Figura 9. Vista do interior das gaiolas suspensas

As aves foram escolhidas ao acaso, sendo que houve acompanhamento das condições higiênico-sanitárias, supervisão médico veterinária (com exame parasitológico anual) e anotações dos dados de registros em cada um dos criatórios utilizados. Para tal, obteve-se permissão dos proprietários para o desenvolvimento do projeto.

As aves escolhidas nos criatórios foram enviadas, em grupos de 10 aves por mês, 20 de cada criatório, durante 6 meses a um consultório para obtenção do sangue e o mesmo, em seguida, ao laboratório para seu processamento.

Foram utilizadas, 60 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) de diferentes mutações, machos e fêmeas, já sexados e agrupados em duas faixas etárias (30 aves em cada grupo): filhotes – até 12 meses (Grupo 1) - (Figura 10) e adultos – mais de 12 meses (Grupo 2) – (Figura 11).



Figura 10. Calopsita de 6 meses de idade pertencente ao Grupo 1 (até 12 meses).



Figura 11. Calopsita de 2 anos de idade pertencente ao Grupo 2 (mais de 12 meses).

3.2 Método de obtenção do sangue

As coletas foram realizadas mediante rápida e melhor forma de contenção para estas aves (Figuras 12 e 13), a fim de se evitar grande estresse de captura. Em cada animal foi feita assepsia local e o corte de unha do dedo médio (Figura 14), para a obtenção do sangue, procedimento semelhante feito para determinação da sexagem desses animais, em que se utiliza esse material. Após o corte, imediatamente foram feitos esfregaços sanguíneos em lâminas, com uma gota do sangue sem o contato com o anticoagulante (Figura 15), e o sangue restante, recolhido em tubos capilares heparinizados (Figura 16), em uma média de cinco unidades, sendo uns vedados para a determinação do hematócrito e outros vertidos em tubos de ensaio, para a determinação da hemoglobina e contagem de células sanguíneas, tais como eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Logo após a coleta do sangue, foi feito o estancamento do mesmo através da aplicação de pó hemostático à base de cloreto de ferro e alumínio hexaidratado e sulfato de cobre pentaidratado (Figura 17). Os índices hematimétricos restantes foram calculados por fórmulas matemáticas, que serão explicadas posteriormente.



Figura 12. Material utilizado na contenção das aves e obtenção de sangue.



Figura 13. Contenção da ave para obtenção de sangue



Figura 14. Corte de unha do dedo médio da ave.



Figura 15. Exposição do sangue para confecção dos esfregaços sanguíneos.



Figura 16. Recolhimento do sangue através de capilares heparinizados.



Figura 17. Estancamento do sangue após aplicação de pó hemostático.

3.3. Procedimentos em laboratório

3.3.1 Fixação e coloração dos esfregaços sanguíneos

Os esfregaços previamente secos foram fixados e corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (MGG); e posicionados em bastões de vidro sobre a bandeja plástica, com a face voltada para cima, em seguida foram cobertos com o corante MGG pelo período de 2 minutos, após este período foi adicionada água destilada tamponada (pH 7) homogeneizando-se a solução e após 6 minutos as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar para posterior leitura (Figura 18).



Figura 18. Esfregaço sanguíneo corado pelo método de May-Grunwald-Giemsa

3.3.2 Hemoglobimetria (Hbm)

A determinação da hemoglobina foi realizada pela metodologia do cianeto de hemoglobina, utilizando-se os kits comerciais (Hemoglobina Labtest e Padrão de Hemoglobina Labtest) por colorimetria no analisador bioquímico semi-automático BIOPLUS 2000[®].

A técnica foi realizada em duplicata, inicialmente com o preparo do reagente (Reagente de Cor), adicionando-se o conteúdo de um frasco do kit (10 ml) a 990 ml de água destilada ou deionizada; com o reagente final já preparado, em tubos de ensaio foram pipetados 1250 µl do mesmo e acrescidos 5 µl de sangue total homogeneizado. Aguardando o período de 5 minutos (para lise dos eritrócitos e liberação da hemoglobina no meio), os tubos foram centrifugados pelo mesmo tempo a 3.000 rpm, separando-se então o sobrenadante; para posterior leitura no aparelho. O fator de correção foi estabelecido com base no valor do padrão de hemoglobina fornecido pelo fabricante, fazendo-se os cálculos fotocolorimétricos e obtendo-se assim a concentração de hemoglobina em g/dl.

3.3.3 Hematócrito (Ht) ou volume globular (VG)

A determinação do VG foi realizada através da técnica do microhematócrito utilizando-se tubos capilares Perfecta[®] e centrifuga de microhematócrito SPIN 1000[®].

Os tubos capilares foram preenchidos com sangue total heparinizado até aproximadamente 2/3 de sua capacidade (Figura 19); em seguida, a extremidade oposta à entrada do sangue foi fechada na chama do bico de Bunsen.



Figura 19. Capilares heparinizados preenchidos com sangue.

Após esta etapa, os tubos capilares fechados foram colocados na centrífuga de microhematócrito por 5 minutos a 15.000 rpm. Após a centrifugação os capilares foram lidos contra uma régua de microhematócrito, alinhando-se o menisco superior (plasma) com a linha superior da régua, deslizando até coincidir o limite inferior da régua, sendo o valor expresso em porcentagem.

3.3.4 Proteínas plasmáticas totais (PPT)

A determinação das PPT foi realizada por refratometria através de refratômetro de mão QUIMIS® Q767.

Os tubos capilares utilizados para a determinação de microhematócrito de cada ave foram seccionados no limite entre o plasma e os elementos figurados sanguíneos; parte do plasma foi depositada no refratômetro, após sua calibração com água destilada, fornecendo a determinação das proteínas plasmáticas em g/dl.

3.3.5 Hematimetria (Hm), leucometria global (LG) e trombocitometria (T)

A determinação de Hm, LG e T foram realizadas a partir de uma única diluição que evidencia eritrócitos, leucócitos e trombócitos, utilizando-se a solução de Natt-Herrick.

Em um tubo de ensaio, pipetou-se 2 ml da solução diluente em temperatura ambiente; logo em seguida, descartou-se 0,02 ml da mesma, perfazendo um volume total de 1,98 ml; acrescentou-se então 0,02 ml (20µl) de sangue total homogeneizado, obtendo-se então a solução final de 2 ml. Foi então retirada, uma alíquota para o preenchimento de um dos receptáculos do hemocitômetro de Neubauer (Figura 20).



Figura 20. Preenchimento da câmara de Neubauer com solução de Natt-Herrick.

Após este passo, esperou-se de 5 a 10 minutos para sedimentação dos glóbulos no hemocitômetro e então procederam-se as contagens, em aumento de 400 x.

Os eritrócitos foram contados utilizando-se 5 quadrados dos 25 quadrados centrais, contabilizando, desta forma, $1/5$ do mm^3 . A contagem dos trombócitos foi realizada nos 25 quadrados centrais, contabilizando 1 mm^3 . A leucometria global foi realizada nos 4 quadrados laterais, contabilizando os leucócitos em 4 mm^3 (Figura 21).

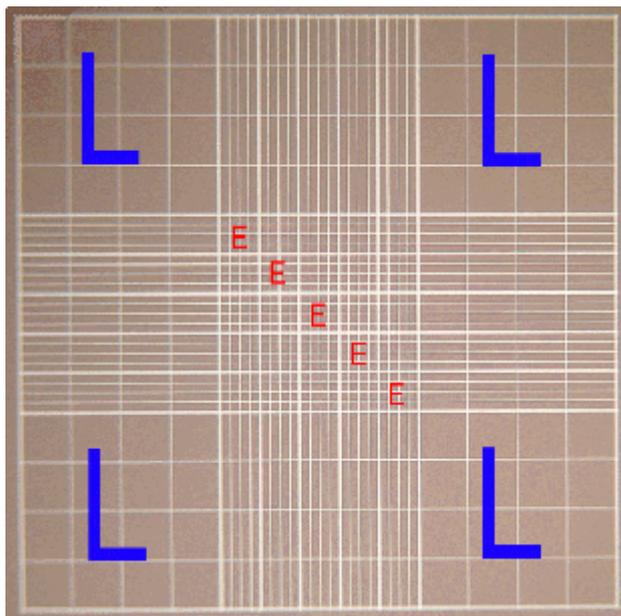


Figura 21. Esquema ilustrativo da câmara de Neubauer evidenciando as áreas de contagem de leucócitos (L) e eritrócitos (E) (COLES, 1984).

Os eritrócitos apresentam-se elípticos, sendo facilmente visualizados destacando-se seu citoplasma levemente eosinofílico e núcleo tenramente corado em púrpura discreto.

Os trombócitos foram identificados apenas por seus núcleos, que se apresentam com formato redondo a oval e, visto que seus citoplasmas hialinos ficam pouco evidentes, permite desta forma, diferenciação dos eritrócitos.

Os leucócitos se apresentam caracteristicamente arredondados, de tamanhos variados e com intensa basofilia, alguns evidenciando grânulos.

3.3.6 Cálculos para determinação dos índices hematimétricos

Os valores das contagens globais em microlitros através de cálculo que levam em consideração a altura do hemocitômetro, a diluição utilizada e a área de contagem no hemocitômetro. Desta forma, os cálculos realizados para obtenção dos fatores de cada contagem global foram:

Para Hematimetria: $5 \times 100 \times 10 = 5.000$ (fator)

5 = Contagem de apenas $1/5$ do mm^3

100 = Diluição utilizada

10 = Constante dos cálculos das contagens no hemocitômetro de Neubauer, uma vez que a referida câmara possui 0,1 mm de profundidade, o que fornece volume de $0,1 \text{ mm}^3$, para cada quadrante, obrigando a multiplicação por 10, para corrigir o valor para 1 mm^3 .

Para Leucometria Global: $1/4 \times 100 \times 10 = 250$ (fator)

$1/4$ = Contagem de 4 mm^3

100 = Diluição utilizada

10 = Constante dos cálculos

Para Trombocitometria: $1 \times 100 \times 10 = 1000$ (fator)

1 = Contagem de 1 mm^3

100 = Diluição utilizada

10 = Constante dos cálculos

Para Volume Globular Médio (VGM): o cálculo foi feito dividindo-se o valor encontrado para o Ht pelo valor encontrado para a Hm, multiplicando-se o resultado por 10. O resultado foi expresso em fentolitros (fl).

Para Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM): O cálculo foi feito dividindo-se o valor encontrado para Hbm pelo valor encontrado para Ht, multiplicando-se o resultado por 100. O resultado foi expresso em porcentagem (%).

3.3.7 Leucometria específica

A técnica da leucometria específica foi realizada através de hematoscopia em aumento de 1000 x (imersão) dos esfregaços corados pelo May-Grunwald-Giemsa (MGG). Os leucócitos foram observados seguindo-se a técnica de leitura de esfregaço sanguíneo, em que se utiliza o terço médio de cada extremidade lateral do esfregaço corado, contando-se 50 leucócitos em cada lateral, obtendo-se assim, a leucometria específica relativa (em porcentagem), para posterior cálculo da leucometria específica absoluta expressa, em milhares de leucócitos por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{l}$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de parâmetros do hemograma

Os resultados dos parâmetros do hemograma encontrados neste estudo foram apresentados em quadros, evidenciando-se os valores pontuais individualmente e para cada parâmetro do hemograma, referente ao eritrograma (Quadros 1 e 2) e ao leucograma (Quadros 3 e 4) assim como seus valores mínimos, máximos, médias e desvios-padrão. Os quadros também foram divididos de acordo com os grupos etários Grupo 1 (filhotes – até 12 meses) e Grupo 2 (adultos – mais de 12 meses).

Quadro 01: Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do Ht, Hm, Hbm, VGM, CHGM, T e PPT de calopsitas *Nymphicus hollandicus* do Grupo 1 (até 12 meses).

	Ht (%)	Hm (x10 ⁶ /μl)	Hbm (g/dl)	VGM (fl)	CHGM (%)	T (x10 ³ /μl)	PPT (g/dl)
1	57	0,71	16,3	803	28,5	15	3,6
2	52	0,46	12,4	1130	23,8	8	2,4
3	54	0,85	14,1	635	26,1	11	2,8
4	54	0,67	14,5	806	26,8	10	3,4
5	53	0,64	11,3	828	21,3	9	2,4
6	55	0,81	13,4	679	24,4	12	3,0
7	56	0,75	13,8	747	24,6	13	2,8
8	54	0,63	12,8	857	23,7	14	3,2
9	57	1,02	16,5	558	28,9	16	3,8
10	55	0,51	13,6	1078	24,7	15	3,4
11	56	0,83	14,2	675	25,3	11	3,2
12	58	1,27	16,8	457	28,9	19	3,4
13	52	0,58	11,9	896	22,8	9	2,2
14	53	0,47	12,4	1128	23,4	11	2,8
15	55	0,82	13,4	670	24,7	13	3,2
16	52	0,79	12,0	658	23,1	11	3,0
17	52	0,44	12,2	1181	23,5	14	2,6
18	54	0,53	13,1	1081	24,2	12	2,8
19	54	0,75	13,5	720	25,0	13	2,4
20	57	1,16	14,3	491	25,1	17	3,6
21	59	1,38	16,6	427	28,1	18	3,8
22	53	0,50	12,4	1060	23,4	12	2,4
23	54	0,72	13,4	750	24,8	13	3,0
24	52	0,43	12,3	1209	23,6	13	2,4
25	53	0,56	12,7	297	24,0	8	2,6
26	54	0,77	12,9	701	23,9	15	3,0
27	52	0,46	11,8	1130	22,7	11	2,4
28	51	0,58	11,9	879	23,3	9	2,2
29	51	0,42	12,1	1214	23,7	10	2,6
30	56	0,61	14,4	918	25,7	12	2,8
Média	56,50	0,66	15,35	860,50	27,10	13,50	3,20
DP	0,70	0,70	1,34	81,31	1,98	2,12	0,57
Mínimo	51,00	0,42	11,30	427,00	21,30	8,00	2,20
Máximo	59,00	1,38	16,80	1214,00	28,90	19,00	3,80

Legendas e Unidades: Ht – Hematócrito (%); Hm – Hematimetria (x10⁶/μl); Hbm – Hemoglobinetria (g/dl); VGM – Volume Globular Médio (fl); CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média (%); T – Trombocitometria (x10³/μl); PPT – Proteínas Plasmáticas Totais (g/dl).

Quadro 2. Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do Ht, Hm, Hbm, VGM, CHGM, T e PPT de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 2 (mais de 12 meses).

	Ht (%)	Hm (x10 ⁶ /μl)	Hbm (g/dl)	VGM (fl)	CHGM (%)	T (x10 ³ /μl)	PPT (g/dl)
1	57	2,0	13,7	285	24,0	13	3,4
2	62	2,4	14,5	258	23,4	16	4,6
3	58	2,2	14,0	264	24,1	14	3,6
4	60	2,3	13,9	261	23,2	17	4,0
5	64	3,0	14,8	213	23,1	23	4,4
6	62	2,8	14,2	221	22,9	20	3,8
7	58	2,1	13,8	276	23,8	15	3,6
8	62	3,2	14,9	194	24,0	22	4,2
9	68	3,6	15,6	189	22,9	27	4,8
10	60	3,3	14,2	182	23,7	25	4,0
11	59	2,8	13,9	211	23,5	23	3,8
12	56	2,4	14,0	233	25,0	21	3,8
13	54	2,1	13,8	257	25,5	18	3,4
14	58	2,6	14,1	223	24,3	19	3,6
15	61	3,2	14,3	191	23,4	23	4,0
16	63	3,4	15,1	185	23,9	26	4,2
17	59	2,4	14,2	246	24,7	16	3,8
18	57	2,2	13,8	259	24,2	13	3,4
19	64	3,1	15,3	206	23,9	25	4,6
20	66	3,5	14,9	189	22,6	28	4,4
21	62	3,0	14,2	206	22,9	20	3,8
22	58	2,8	13,9	207	23,7	15	3,6
23	57	2,6	13,7	219	24,0	14	3,4
24	67	3,6	15,1	186	22,5	30	4,4
25	60	3,0	14,8	200	24,7	18	4,2
26	68	3,4	15,4	200	22,6	29	4,8
27	63	2,9	14,8	217	23,5	24	4,2
28	57	2,4	13,8	237	24,2	16	3,4
29	59	3,1	14,0	190	23,7	21	3,8
30	62	3,3	14,3	188	23,1	23	4,4
Média	59,50	2,65	14,00	236,50	23,55	18,00	3,9
D-P	3,54	0,92	0,43	68,60	0,64	7,07	0,78
Mínimo	56,00	2,00	13,70	182,00	22,50	13,00	3,40
Máximo	68,00	3,60	15,60	285,00	25,50	30,00	4,80

Legendas e Unidades: Ht – Hematócrito (%); Hm – Hematimetria (x10⁶/μl); Hbm – Hemoglobinetria (g/dl); VGM – Volume Globular Médio (fl); CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média (%); T – Trombocitometria (x10³/μl); PPT – Proteínas Plasmáticas Totais (g/dl).

Quadro 3. Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do LG, BASREL, BASABS, EOREL, EOABS, HETREL, HETABS, LINREL, LINABS, MONREL, MONABS de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 1 (até 12 meses).

	LG (x10 ³ /μl)	BASREL (%)	BASABS (/μl)	EOREL (%)	EOABS (/μl)	HETREL (%)	HETABS (/μl)	LINREL (%)	LINABS (/μl)	MONREL (%)	MONABS (/μl)
1	6,9	0	0	2	138	87	6003	11	759	0	0
2	9,7	0	0	0	0	87	8439	11	1067	2	194
3	11,3	0	0	0	0	92	10396	7	791	1	113
4	10,5	0	0	0	0	89	9345	9	945	2	210
5	9,7	0	0	1	97	80	7760	17	1649	2	194
6	9,4	0	0	1	94	82	7708	12	1128	5	410
7	11,3	0	0	1	113	87	9831	9	1017	3	339
8	8,3	0	0	4	332	87	7221	4	332	5	415
9	11,6	0	0	2	232	78	9048	17	1972	3	348
10	10,2	0	0	0	0	83	8466	16	1632	1	102
11	15,7	0	0	5	785	90	14130	4	628	1	157
12	7,7	0	0	4	308	89	6853	4	308	3	231
13	10,8	0	0	0	0	90	9720	9	972	1	108
14	20,4	0	0	2	408	81	16524	15	3060	2	408
15	6,9	0	0	1	69	81	5589	12	828	6	414
16	9,1	0	0	1	91	78	7098	17	1547	4	364
17	7,2	0	0	0	0	90	6480	10	720	0	0
18	8,0	0	0	1	80	87	6960	12	960	0	0
19	12,4	0	0	0	0	87	10788	9	1116	4	496
20	13,8	0	0	2	276	88	12144	8	1104	2	276
21	15,2	0	0	0	0	89	13528	10	1520	1	152
22	6,4	0	0	2	128	91	5824	3	192	4	256
23	6,1	0	0	2	122	84	5124	12	732	2	122
24	17,4	0	0	2	348	83	14442	14	2436	1	174
25	15,2	0	0	1	152	87	13224	12	1824	0	0
26	15,4	0	0	0	0	88	13552	9	1386	3	462
27	13	0	0	0	0	97	12610	2	260	1	130
28	7,7	0	0	1	77	82	6314	12	924	5	385
29	18,2	0	0	0	0	93	16926	3	546	4	728
30	10,8	0	0	4	432	87	9396	8	864	1	108
Média	11,21	0,00	0,00	1,30	142,70	86,47	9714,77	9,93	1107,3	2,3	245,2
DP	3,77	0,00	0,00	1,42	180,43	4,49	3359,53	4,32	641,93	1,71	176,58
Mínimo	6,10	0,00	0,00	0,00	0,00	78,00	5124,00	2,00	192,00	0,00	0,00
Máximo	20,40	0,00	0,00	5,00	785,00	97,00	16926,00	17,00	3060,00	6,00	728,00

Legendas e Unidades: LG – Leucometria Global (x10³/μl); BASREL – Valores Relativos de Basófilos (%); BASABS – Valores Absolutos de Basófilos (/μl); EOSREL – Valores Relativos de Eosinófilos (%); EOSABS – Valores Absolutos de Eosinófilos (/μl); HETREL – Valores Relativos de Heterófilos (%); HETABS – Valores Absolutos de Heterófilos (/μl); LINREL – Valores Relativos de Linfócitos (%); LINABS – Valores Absolutos de Linfócitos (/μl); MONREL – Valores Relativos de Monócitos (/μl); MONABS – Valores Absolutos de Monócitos (/μl)

Quadro 4. Médias, Desvio-Padrão (DP) e Limites do LG, BASREL, BASABS, EOREL, EOABS, HETREL, HETABS, LINREL, LINABS, MONREL, MONABS de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Grupo 2 (mais de 12 meses).

	LG (x10 ³ /μl)	BASREL (%)	BASABS (/μl)	EOREL (%)	EOREL (/μl)	HETREL (%)	HETABS (/μl)	LINREL (%)	LINABS (/μl)	MONREL (%)	MONABS (/μl)
1	7,2	0	0	0	0	88	6336	10	720	1	72
2	11,3	0	0	2	226	93	10509	5	565	0	0
3	5,8	0	0	2	116	85	4930	9	522	4	232
4	6,1	0	0	4	244	72	4392	22	1342	2	122
5	12,4	0	0	0	0	86	10664	7	868	7	868
6	8,0	0	0	2	160	90	7200	7	560	1	80
7	15,7	0	0	0	0	94	14758	3	471	3	471
8	14,9	0	0	1	149	89	13261	6	894	4	596
9	10,2	0	0	1	102	83	8466	13	1326	3	306
10	13,5	0	0	1	135	92	12420	4	540	3	405
11	11,0	0	0	2	220	80	8800	17	1870	1	110
12	6,9	0	0	2	138	92	6348	6	414	0	0
13	9,7	0	0	6	582	80	7760	10	970	4	388
14	14,6	0	0	1	146	92	13432	4	584	3	438
15	7,0	0	0	3	210	75	5250	14	980	8	560
16	16,3	0	0	1	163	82	13365	15	2445	2	326
17	6,6	0	0	4	264	86	5676	8	528	2	132
18	11,3	0	0	3	339	87	9831	9	1017	1	113
19	9,7	0	0	1	97	93	9021	6	582	0	0
20	8,3	0	0	1	83	83	6889	12	996	4	332
21	9,9	0	0	0	0	97	9603	11	297	0	0
22	16,8	0	0	1	168	90	15120	8	1344	1	168
23	12,4	0	0	3	372	88	10912	8	992	1	124
24	14,9	0	0	4	596	87	12963	7	1192	1	149
25	16,0	0	0	1	160	77	12320	22	3520	0	0
26	5,3	0	0	1	53	86	4558	11	583	2	106
27	7,2	0	0	3	216	87	6264	9	648	1	72
28	19,3	0	0	2	386	95	18335	3	579	0	0
29	19,6	0	0	5	980	87	17052	7	1372	1	196
30	16,5	0	0	0	0	93	15345	5	825	2	330
Média	11,48	0,00	0,00	1,90	210,17	86,97	10059,37	9,03	984,87	2,07	223,20
DP	4,21	0,00	0,00	1,56	210,15	6,02	3930,58	5,01	665,16	1,98	213,20
Mínimo	5,30	0,00	0,00	0,00	0,00	72,00	4392,00	3,00	297,00	0,00	0,00
Máximo	19,60	0,00	0,00	6,00	980,00	97,00	18335,00	22,00	3520,00	8,00	868,00

Legendas e Unidades: LG – Leucometria Global (x10³/μl); BASREL – Valores Relativos de Basófilos (%); BASABS – Valores Absolutos de Basófilos (/μl); EOSREL – Valores Relativos de Eosinófilos (%); EOSABS – Valores Absolutos de Eosinófilos (/μl); HETREL – Valores Relativos de Heterófilos (%); HETABS – Valores Absolutos de Heterófilos (/μl); LINREL – Valores Relativos de Linfócitos (%); LINABS – Valores Absolutos de Linfócitos (/μl); MONREL – Valores Relativos de Monócitos (/μl); MONABS – Valores Absolutos de Monócitos (/μl).

4.2 Obtenção de amostras sanguíneas

Neste estudo, as amostras de sangue venoso foram obtidas através de corte da unha do dedo médio, devido à facilidade de acesso e visualização da via mostrando eficiência, rapidez e adequação, promovendo desta forma, uma minimização do efeito estressante nas aves. Os métodos de captura e contenção utilizados neste estudo mostraram-se bastante satisfatórios, sendo realizados de maneira rápida, eficiente e adequada. Durante a captura, as aves reagem quando se sentem ameaçadas, e frequentemente debatem-se e pulam com o intuito de se libertar. Segundo Bhattacharyya e Sarkar (1968) e Maxwell (1993), as coletas de amostras sanguíneas em aves devem seguir cuidados especiais, a fim de se evitar o estresse sistêmico promovido pelo ato da captura e método de contenção. Este ato é sem dúvida uma condição de estresse sistêmico relevante, devendo ser minimizada através de um processo de captura rápido e eficiente. Maxwell (1993) relatou que, o estresse comumente provoca a liberação excessiva de adrenalina e corticoesteróides, causando artefato conhecido como heterofilia de estresse, podendo facilmente ser confundida com processos infamatórios agudos sépticos ou assépticos, frustrando as interpretações pelos médicos veterinários.

Segundo Vilar et al. (2003) e Stelling et al. (2004), os parâmetros do hemograma que podem sofrer alterações pelo estresse são: Hematócrito (Ht), Hematimetria (Hm), Hemoglobinometria (Hbm), Trombocitometria (T), Leucometria Global (LG) e a Leucometria Específica (LE), principalmente na linhagem granulocítica heterofílica.

Devido à impossibilidade de condições de nulidade de estresse, a determinação do hemograma de calopsitas neste estudo, foi realizada com obtenção de amostras em condições mínimas de estresse, como a rápida e melhor forma de contenção, proporcionando correta interpretação e assim possibilitando a padronização, conforme realizados previamente por outros autores em aves, como Levi et al. (1989); Palomeque et al., (1991); Fudge (1996); Mushi et al., (1999); Green (1999); Romdhane et al. (2000) e Vilar et al. (2003).

As amostras sanguíneas foram obtidas utilizando-se capilares heparinizados, ao invés da coleta em seringas, levando em consideração a minimização do possível efeito de hemólise durante a coleta, tentando-se evitar, desta forma, artefatos de técnica que prejudicariam a determinação de parâmetros do hemograma fidedignos para a espécie, mostrando-se eficaz nos animais utilizados nos grupos etários envolvidos neste estudo, sendo este um método de obtenção de sangue semelhante aos utilizados em animais de laboratório.

4.3 Anticoagulantes

Neste estudo, a escolha do anticoagulante ideal para a determinação do hemograma em calopsitas teve que levar em consideração a menor interferência de sua morfologia dos elementos figurados sanguíneos. Por este motivo, amparando-se em dados da literatura (CAMPBELL, 1994; FUDGE, 1996, 2000), escolheu-se um anticoagulante que minimizasse estes efeitos. Desta forma, o presente trabalho utilizou a heparina como anticoagulante de escolha para a determinação do hemograma de calopsitas, devido às características deletérias dos demais anticoagulantes, conforme já fora observado por outros autores (CAMPBELL, 1994; FUDGE, 2000; VILAR et al., 2003), obtendo-se amostras livres de hemólise, assim não prejudicando a análise dos parâmetros avaliados. Segundo Campbell (1994); Fudge (1996) e Fudge (2000), o uso do EDTA como anticoagulante para amostras sanguíneas de aves, pode ocasionar alterações osmóticas, principalmente em relação à linhagem eritróide. Assim sendo, os eritrócitos de aves preservados em EDTA por longos períodos de tempo aumentam de tamanho devido ao desequilíbrio osmótico, alterando desta forma parâmetros do hemograma como Ht, Hm e VGM. Estas alterações são dependentes do tempo de contato com o

anticoagulantes, tornando-se bastante evidentes após 24 ou 48 horas, como proposto por Campbell (1994); Fudge (1996) e Fudge (2000).

4.4 Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços foram confeccionados imediatamente após a coleta, sem o contato com o anticoagulante, assim proporcionando uma confecção de esfregaços sanguíneos sem qualquer alteração morfológica, permitindo a melhor identificação dos elementos figurados, como sugerido por vários autores (FUDGE, 1996; GREEN; BLUE-Mc LENDON, 2000; VILAR et al., 2003). Os esfregaços sanguíneos, após serem secos, foram submetidos ao processo de coloração. É importante considerar o fato de que a não secagem imediata dos esfregaços pode ocasionar alterações dos glóbulos sanguíneos, acarretando em alterações morfológicas potencialmente importantes, conforme relatado por Vilar et al. (2003) e Stelling et al.(2004).

4.5 Colorações hematológicas

O processo de coloração utilizado neste estudo seguiu o método de May-Grunwald-Giemsa (MGG), sendo este uma associação de dois corantes de Romanowsky, o May-Grunwald e o Giemsa, bastante utilizado em sangue de aves, como descrito em Schalm (1965). A metodologia mostrou-se bastante eficiente na evidenciação dos glóbulos sanguíneos, assim como na caracterização tintorial das células.

4.6 Hematócrito (Ht) ou volume globular (VG)

A utilização da técnica do microhematócrito foi considerada eficiente para a obtenção dos resultados do presente experimento. Segundo Green e Blue-McLendon (2000) o contador eletrônico hematológico Abbott CELL-DYN 3500 Hematology Analyzer determina com acurácia o volume globular (VG), baseado no volume globular médio e na contagem de eritrócitos. Entretanto, segundo Stockham e Scott (2002), o microhematócrito obtido em centrífuga é o teste ouro do eritrograma, porém, podem apresentar valores de VG falsamente diminuídos, devido às alterações osmóticas promovidas por anticoagulantes.

O fenômeno de hemólise pode ser facilmente evidenciado através da observação da turbidez do plasma e sua coloração avermelhada. A intensidade da hemólise é proporcional à intensidade da coloração avermelhada do plasma. Neste estudo, e como já mencionado, foi utilizado o anticoagulante heparina, a fim de minimizar o efeito de hemólise no sangue das aves, conforme sugerido por Campbell (1994).

4.7 Hemoglobimetria (Hbm)

Neste estudo, a determinação da hemoglobina foi realizada por análise bioquímica semi-automática, após a centrifugação das amostras. A técnica de Hbm aplicada às aves necessita de adaptações, devido às suas características eritrocitárias, que por possuírem núcleo, durante o processo de hemólise, acabam por libertá-los, causando maior turbidez e interferindo nas leituras de análise. Devido a estas características, a técnica precisa ser adaptada, sendo incluída a centrifugação dos tubos testes antes das leituras das absorbâncias, promovendo, desta forma, a sedimentação dos núcleos dos eritrócitos, fato observado por vários autores (DEIN, 1984; FUDGE, 2000, VILAR et al., 2003; STELLING et al., 2004).

4.8 Contagens globais hematológicas

A metodologia utilizada por Vilar et al. (2003) foi a escolhida para a determinação de parâmetros do hemograma neste estudo, tendo demonstrado reprodutibilidade, praticidade e acurácia durante as contagens globais.

Vilar et al. (2003) utilizaram nova metodologia de contagem conjunta de glóbulos para a determinação dos parâmetros em aves, baseando-se nas metodologias propostas por Darcel e Le (1950) e Almosny et al. (1993). Estes autores utilizaram soluções corantes baseadas em corantes de Romanowsky (Giemsa), obtendo resultados satisfatórios para evidenciação de eritrócitos e leucócitos.

A técnica proposta permite a identificação adequada de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, demonstrando praticidade e simplicidade em todas as etapas da técnica. A validade da técnica foi obtida através da repetibilidade e comparação dos parâmetros hematológicos com autores que utilizaram a técnica de Natt e Herrick (1952) em Avestruzes (*Struthio camelus*) (VILAR et al., 2003); Pingüins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (STELLING et al., 2004) e Jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) (BEZERRA et al., 2005).

4.9 Análise de parâmetros do hemograma

Os parâmetros do hemograma neste estudo foram analisados separando-se as aves em dois grupos: Grupo 1 (filhotes – até 12 meses) e Grupo 2 (adultos – mais de 12 meses). A divisão etária proposta levou em consideração a possibilidade da variabilidade nos parâmetros do hemograma de aves em faixas etárias diferentes (jovens e adultos) observada em estudos de autores como Levi et al. (1989); Palomeque et al. (1991); Fudge (1996); Mushi et al. (1999); Green (1999); Romdhane et al. (2000); Vilar et al. (2003). De qualquer forma, não foi encontrado na literatura consultada, nenhum tipo de padronização etária para calopsitas, que pudesse ser utilizada como referência, levando em consideração os parâmetros do hemograma.

A divisão etária dos grupos, proposta neste estudo procurou levar em consideração as possíveis variações fisiológicas em diferentes etapas do ciclo de vida de calopsitas da população estudada, e que desta forma, pudessem provocar diferenças nos parâmetros globais destas aves. Assim sendo, no Grupo 1 procurou-se englobar em uma única população, animais considerados jovens (filhotes – até 12 meses) e no Grupo 2 englobaram-se animais considerados adultos (mais de 12 meses).

Em uma comparação geral com os quadros, pode-se perceber que o grupo com faixa etária menor (filhotes) apresentou valores médios, limites mínimo e máximo referentes ao Eritrograma (Ht, Hm, Hbm, VGM, CHGM, T e PPT) ligeiramente menores que os de faixa etária mais elevada (adultos), já em relação ao Leucograma (LG, Valores Relativos e Absolutos de Basófilos, Eosinófilos, Heterófilos, Linfócitos e Monócitos) observaram-se resultados mais homogêneos, com poucas variações entre os dois grupos estudados.

Diversos autores já mencionados como Vilar et al. (2003), Stelling et al. (2004) e Bezerra et al. (2005), em seus estudos realizados em aves de diferentes espécies, relataram que grupos classificados como jovens apresentavam valores ligeiramente menores em todos os parâmetros do hemograma, principalmente em relação ao Ht e à Hbm, quando comparado aos grupos adultos. Este fato foi observado neste experimento realizado.

É preciso salientar que os parâmetros do hemograma de uma dada população de animais de uma mesma espécie, pode apresentar valores com variações significantes, dependendo da região geográfica, como sugerido por Vilar et al. (2003) em populações de avestruzes, e Stelling et al. (2004) em Pingüins de Magalhães. Este fato deve-se às variações

climáticas e diferenças de altitudes de uma região geográfica para outra, podendo interferir, desta forma, em parâmetros hematológicos. Assim sendo, estatisticamente não é possível comparar dados de populações sob interferências climáticas e geográficas diferentes a fim de se comprovar matematicamente algum grau de similaridade, pois se trata de populações distintas, conforme observado por Levi et al. (1989).

5 CONCLUSÕES

A técnica de contagem global utilizada foi satisfatória para determinação de parâmetros do hemograma em calopsitas.

Em comparações gerais, observaram-se diferenças por influência do fator idade, havendo, portanto, necessidade de uma padronização por faixa etária, para calopsitas, classificando-as como jovens e adultas.

Os resultados dos parâmetros do hemograma determinados neste experimento podem ser utilizados como referência para calopsitas criadas no Estado do Rio de Janeiro.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMOSNY, N.R.P.; NASCIMENTO, M.D.; SILVA, K.P.; MELO, D.L.S.; BRESSAN, A.C.S.; ROMÃO, M.A.P.; BRUNO, S.F.; PAULS, E. **Hemograma de aves: Métodos**. Anais do 6º Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa. Salvador, Bahia, Organização Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa. Salvador, v.1, p.317, 1993.
- ALTMAN, R.B.; MONTALI, R.; KOLLIAS, G.; HARRISON, G.J; Avian clinical pathology evaluation Panel. **Proceedings Annual Meeting American Association Zoo. Vet.**, v.31, p.146-149, 1995.
- BARNES, H.J. Hemic system. In Ridell, C. Ed. Avian Histopathology. 2nd. Ed. Kenett Square, P.A.; **American Association of Avian Pathologists**, v.28, p.1-16, 1996.
- BEACON, D.N. Differential blood counts. **Journal Laboratory Clinical. Med.**, v.13, p.366-369, 1928.
- BENEZ, S.M. Aves: **Criação, Clínica, Teoria, Prática**. São Paulo – SP: Robe Editorial, 2001, 522 p.
- BERMUDEZ, A.J.; FREISCHUTZ, B; YUR, K.; NONNEMAN, D; JOHNSON, G.S.; BOON, G.D.; STOGSDILL, P.L.; LEDOUX, D.R.; Heritability and biochemistry of gangliosidosis in Emus (*Dromaius novaehollandiae*). **Avian Disease**, v.41, p.838-849, 1997.
- BEZERRA, S.C.B.; NEVES JÚNIOR, J.M.; STELLING, W.; VOLINO, W; VILAR, T.D. Parâmetro hematológicos de filhotes de Jacaré-de-Papo-Amarelo Caiman latirostris (Daudin, 1801) em cativeiro no Parque Chico Mendes – RJ. **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida, Rio de Janeiro**, v.25, suplemento, p.61-62, 2005.
- BHATTACHARYYA, T.K.; SARKAR, A.K. Avian leukocytic responses induced by stress and corticoid inhibitions. **Journal Experimental Biology Indian**, v.6, p.26-28, 1968.
- BIERER, B.W.; THOMAS, J.B.; ROEBUCK, D.E.; POWELL, H.S.; ELEAZER, T.A. Hematocrit and sedimentation rate values as an aid in poultry disease diagnosis. **Journal American Veterinary Association**, v.143, p.1096, 1963.
- BLAIN, D. A. Direct method for making total white blood counts on avian blood. **Proceedings Society Experimental Biologic and Medician**, v.25, p.594, 1928.
- BOUNOUS, D.I.; STEDMAN, N.L. Normal avian hematology: chicken and turkey. In: Feldman, B.F. ,Zinkl, J.G., Jain, N.C. eds **Schalm's Veterinary Hematology**. 5nd. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000, 1154 p.
- CAMPBELL, F. Fine struture of the bone marrow of the chicken and pigeon. **Journal Morphologic**, v.123, p.405-440, 1967.
- CAMPBELL, T.W., Avian Hematology. In: CAMPBELL, T. W.; Ed. **Avian Hematology & Cytology**. Ames; IA: Iowa States University Press, 1994, 320 p.
- CAMPBEL, T.W. **Avian Hematology and Cytology**. 2nd Ed. Ames, IA: Iowa State University Press. EUA, 1995, 465 p.

- COATES, I.A. Method of counting white cells in the blood of fowls. **Ontario Department of Agriculture**. Agr., v.29, p.68, 1929.
- COHEN, Rr. Anticoagulation, centrifugation time, and sample replicate number in microhematocrit method for avian blood. **Poultry Scientific**, v. 43, p.46, 214 p, 1964.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ed. São Paulo – SP: Editora Manole, 1984, 565 p.
- DARCEL, C.; L.E, Q. **Counting erthrocytes and leucocytes in fowl blood**. Stain Tech. v. 26, p.57-59, 1950.
- DEIN, F.J. **Avian Hematology: Clinical Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984, p.174-191, 392 p.
- DENNINGTON, E.M.; LUCAS, A.M. Blood tecniques for chickens. **Poultry Science**, v.34, p.360, 1955.
- FORKNER, C.E. Blood and bone marrow cells of the domestic fowel. **The Journal Experimental Medicine**, v.50, p.121-142, 1929.
- FUDGE, M.E; Avian blood sampling and artifact considerations. In FUDGE, A.M. **Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. Philadelphia. W.B. Saunders, 347 p, 2000.
- FUDGE, A.M. Clinical Pathology: In: TULLY, T.N.J, SHANE, S.N. EDS. **Ratite Management: Medicine and Surgery**. Malabar. FL. Krieger, v.14, p.105-114, 1996.
- GREEN, R. A. Reference range for normal Ostriches & Rheas. **Veterinary Clinical Pathology Laboratory**. Texas. A & M University Teaching Hospital, 1999, 342 p.
- GREEN-R.BLUE Mc LENDON, A. ratite hematology (1201-1206 p). In: FELDMAN, B.F. ; ZINK, J.G. & JAIN, N.C. **Schalm 's Veterinary Hematology**. 5nd Ed. Philadelphia: Lippincot Willians, 2000,1344 p.
- GREGORY, C. R. ; LATIMER, K.S. ; MAHAFFEY, E.A.; DOKER, T. Lymphoma and leukemic blood picture in na Emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.25, p.136-139, 1996.
- HALLIWELL, W.H. Serum chemistry profiles in the health and disease of birds of prey. In: Cooper, J.E. & Greenwood, A.G. Eds: Recent Advances in the Study of Raptor Diseases. West Yorkshire, England: **Chiron Publishing**, v. 45, p.111-112, 1971.
- HATTING, J.; SMITH, E.M. Anticoagulants for avian andreptilian blood: Heparin and EDTA. **Pfluegers. Archives**, v.363, p.267, 1976.
- IVINS, G.K.; WEDDLE, G.D.; HALLIWELL, W.H. Hematology and serum chemistries in birds of prey. In: Fowler, MB. Ed. **Zoo and Wild.Animal Medicine** 1st Ed. Philadelphia: W.B. Sauders, v.67, p.286-290, 1978.
- JAIN, N.C. Hematopoiesis. In: Jain, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993, p.72-81, 417 p.

LEVI, A.; PERELMAN, B.; WANER, T.; VAN GREVENBROEK, M.; VAN GREVELD, C.; YAGIL, R. Haematological parameters of the Ostrich (*Struthio camelus*). **Avian Pathology**, v.18, p.321-327, 1989.

MAXWELL, M.H. Avian blood leucocyte responses to stress. **World's Poultry Science Journal**, EUA, v.49, p.34-43, 1993.

McDOUGALD, L.R.; HENSEN, M.F. Serum protein changes in chickens subsequent to infections with *Histomonas meleagridis*. **Avian Disease**, v.13, p.673, 1969.

MUSHI, E.Z.; BINTA, M.G.; CHABO, R.G.; ISA, J.F.W.; KAPAATA, R.W. Selected hematologic values of farmed Ostriches (*Struthio camelus*) in Botswana. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.372-374, 1999.

MOURA, R.A.; WADA, C. S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. **Técnicas de laboratório**, São Paulo – SP: Editora Atheneu, 2004, 578 p.

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

NICOLAS-BOLNET, C.; YASSINE, F.; CORMIER, F.; DIETERLIEN-LIEVRE, F. Developmental kinetics of hematopoietic progenitors in the avian spleen. **Experimental Cell Research**, v.16, p.294-301, 1991.

PALOMEQUE, J.; PINTÓ, D.; VISCOR, G. Hematologic and blood chemistry values of the Masai Ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of Wildlife Disease**, v.27, p.34-40, 1991.

PIERSON F.W. Laboratory techniques for avian hematology. In: FEDMAN, B.F.; ZINKL, J.G. & JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5^o Ed. Philadelphia: Lippincot William & Wilkins, 2000, 1344 p.

ROMDHANE, S.B.; ROMDHANE, M.N.; MHIRI, S.; MILED, M.A.; KORTAS, M. Lês Paramètres biochimiques et hématologiques chez l'áutruche (*Struthio camelus*) dans un élevage tunisien. **Revue Médecine Veterinaire**, v.151, n^o 3, p.231-238, 2000.

RUPLEY, A.E. **Manual de clínica aviária**. São Paulo – SP: Editora Roca, 1999, 582 p.

SATO, K. Hematocrit of chickens with species reference to visceral lymphomatosis. **Poultry Science**, v.39, p.1126, 1960.

SCHMEISSER, H.C. Leukemia of the fowl; spontaneous and experimental. Johns. Hopkins. **Hospital Representative Baltimore**, v.17, p.551, 1915.

SHALM, O. W. **Veterinary Hematology**. Philadelphia. Lea & Febiger, 1965, 664 p.

SHAW, A.F.B. A Direct method for counting the leucocytes, thrombocytes, and erythrocytes of Bird's blood. **Journal Pathology Bacterial**, v.33, p.833-835, 1930.

STELLING, W.; NASCIMENTO, M.D.; FEDULLO, L.P.L. FERRER, D.M.V.; LEMOS, M.; VILAR, T.D. Determinação dos parâmetros hematológicos de Pinguins de Magalhães (Spheniscidae: Aves) *Spheniscus magellanicus* da Fundação Rio Zôo, RJ, Brasil. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**, v. 24, n^o 1, p.325-326, 2004.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. Iowa State Press. 2002, 610 p.

STOSKOPF, M.J.; NEELY, E. An introduction to avian hematology for the veterinary technician. **Proceedings Association Zoo Veterinary Technicians**, v.26, p.85-93, 1982.

VERSTAPPEN, F.A.L.M.; LUMEIJ, J.T.; BRONNEBERG, G.G. Plasma chemistry reference values in Ostriches. **Journal of Wildlife Disease**, v.38, p.154–159, 2002.

VILAR, T.D.; VOLINO, W.; STELLING, W.; RIBEIRO, I.C.; LEMOS, M.; NASCIMENTO, M.D. Determinação dos parâmetros hematológicos em Avestruzes (Struthionidae: Aves) *Struthio camelus* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida. Seropédica, RJ, EDUR, v.23, suplemento, 2003.

WARTHIN, A.S. Leukemia of the comon fowl. **The Journal of Infection Diseases**, v.4, p.369-381, 1907.

WETMORE, p.w. A Direct method of determining the erythrocyte, leucocyte and thrombocyte count of fowl blood. **Science**, 1940, 386 p.

WISEMAN, B.K. An improved direct method for obtaining white cell counts in avian blood. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.28 p.1031-1033, 1931.