

Antonio José Sabino

**ERITROGRAMA E MORFOMETRIA
ERITROCITÁRIA DE AVESTRUZES (*Struthio
camelus*) CRIADOS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO
RIO PRETO, SÃO PAULO, BRASIL**

Araçatuba – S.P.
2007

Antonio José Sabino

**ERITROGRAMA E MORFOMETRIA
ERITROCITÁRIA DE AVESTRUZES (*Struthio
camelus*) CRIADOS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO
RIO PRETO, SÃO PAULO, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina
Veterinária da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre.

Orientador: Prof. Assist. Dr. Paulo César Ciarlini

Araçatuba – S.P.
2007

Dedico este trabalho
a meu pai “in memoriam” e a minha mãe,
à minha esposa Ana Maria e
a meus filhos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini pela orientação,
apoio, incentivo, exemplo
e pela amizade.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que nos auxilia e ilumina.

À minha esposa pela paciência e dedicação.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária pela oportunidade.

Ao amigo Alexandre Werneck, por suas sugestões e contribuição.

A meus professores da pós-graduação, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos professores: Prof. Dr. Manoel Garcia Neto e Prof^{fa}. Valéria Maria Savoya da Silva, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e residentes do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita filho – UNESP – campus de Araçatuba pelo carinho e amizade.

Aos funcionários da biblioteca do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita filho – UNESP – campus de Araçatuba, especialmente a Isabel e Fátima, pelo auxílio e atenção.

Aos meus companheiros de pós-graduação pela amizade e carinho.

A meus filhos pela compreensão.

Muito obrigado!

“Sê humilde para evitar orgulho, mas voe alto para alcançar a sabedoria”.

Santo Agostinho

SABINO, A. J. ERITROGRAMA E MORFOMETRIA ERITROCITÁRIA DE AVESTRUZES (*Struthio camelus*) CRIADOS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO, BRASIL. Araçatuba, 2007, 61 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2007.

RESUMO

Objetivou-se obter valores eritrocitários de referência para avestruzes criados em sistema comercial na Região de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Para tal foi padronizada a forma de colheita de sangue, comparando o efeito de dois diferentes anticoagulantes (ácido etilenodiaminotetracético sódico - EDTA e heparina sódica) na morfometria e integridade dos eritrócitos permitindo concluir que, para fins de análises quantitativa e morfométrica dos parâmetros eritrocitários de avestruzes, a heparina sódica (10 U/mL sangue) é um anticoagulante mais adequado do que o EDTA sódico (2 mg/ mL sangue). Foram analisadas 240 amostras de sangue heparinizadas de avestruzes de ambos sexos, divididos em três diferentes faixas etárias: 4-13 meses; 13-22 meses e 22-30 meses. Utilizando-se método analítico padrão, verificou-se que os valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), o diâmetro maior e menor dos eritrócitos sofrem influência do sexo (fêmeas) e faixa etária. Concluiu-se deste estudo que para adequada interpretação clínica dos valores eritrocitários dos avestruzes deve-se levar em consideração o tipo de anticoagulante utilizado para obtenção da amostra e valores de referência que considere as particularidades do sexo e da idade.

Palavras-chave: hemácias; valor de referência; efeito de anticoagulante; fator etário; fator sexual

SABINO, A. J., ERYTHROCYTE ERYTHROGRAM AND MORPHOMETRY OF THE OSTRICHES (*Struthio camelus*) RAISED IN THE REGION OF SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO STATE, BRAZIL. Araçatuba, 2007, 61 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2007.

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain the reference values of erythrocyte indices for ostriches raised in a commercial system in the region of São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. To achieve the purpose of the study, we standardized a blood specimen collection comparing the effect of two different anticoagulants such as Ethylenediaminetetraacetic Acid sodium (EDTA) and Heparin sodium on the erythrocyte morphometry and integrity, which made possible to conclude that for the purposes of quantitative and morphometric analyses of the erythrocyte parameters of ostriches, the heparin sodium (10 U/mL of blood) is a much more appropriated anticoagulant than the EDTA sodium (2 mg/mL of blood). We analyzed 240 heparinized blood samples of both male and female ostriches divided into different age groups: 4 – 13 months; 13 – 22 months; and 22 – 30 months. Using a standard analytical method it was observed that the erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) values, and both the greater and the smaller diameters of the erythrocytes are under the influence of gender and age group. It was concluded that to have an appropriate clinical interpretation of the erythrocyte indices of the ostriches it should be taken into account the type of the anticoagulant used to obtain the sample and the reference values considering the peculiarities of ostriches' gender and age.

Keywords: red blood cells; reference value; anticoagulant effect; age factor; sex factor.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Metodologia da pesquisa bibliográfica	17
2.2	Colheita e conservação de amostras sanguíneas de avestruzes	18
2.3	Parâmetros eritrocitários de avestruzes	19
3	OBJETIVOS	23
4	ARTIGO CIENTÍFICO	25
4.1	COMPARAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO (EDTA) E DA HEPARINA SOBRE OS ERITRÓCITOS DE AVESTRUZES (<i>Struthio camelus</i>)	25
4.2	ERITROGRAMA E MORFOMETRIA ERITROCITÁRIA DE AVESTRUZES (<i>Struthio camelus</i>) CRIADOS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO, BRASIL	40
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	55
	ANEXOS	59

Anexo A – Instrução aos autores da revista “Arquivos do Instituto
Biológico”

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por produtos de alto valor agregado proporcionou a popularização da criação de avestruz em diversos países, cujo rebanho mundial, explorado zootecnicamente, chega a aproximadamente quatro milhões de aves. O Brasil apresenta um plantel em formação na primeira fase de produção, com cerca de dez anos e aproximadamente 200 mil aves distribuídas em várias regiões do país (ACAB, 2005). Estima-se que a industrialização se inicie nos próximos três anos. O interesse na patologia clínica desses animais determinou a necessidade de se estabelecer perfis hematológicos para auxiliar no diagnóstico das doenças.

Os parâmetros hematológicos são reflexos de fatores como espécie, sexo, idade, dieta e manejo, essenciais para avaliação das desordens clínicas e nutricionais das aves (THRALL et al., 2004). A boa prática da medicina das aves exige valores hematológicos de referência que levam em consideração a localização geográfica e os diferentes sistemas de manejo da espécie (MUSHI et al., 1999).

São escassos os estudos sobre os parâmetros eritrocitários de avestruzes e os resultados dos diferentes autores divergem, pois foram realizados com pequeno número de animais, alguns sem considerar o sexo, em condições geográficas e climáticas diferentes. Contribuem também para tais divergências de resultados a falta de padronização da colheita das amostras sanguíneas, alguns utilizando heparina, outros citrato ou EDTA.

O presente estudo propõe padronizar a colheita das amostras sangüíneas comparando os anticoagulantes EDTA e heparina a fim de estabelecer valores eritrocitários de referência para avestruzes criados em sistema de produção comercial na região paulista de São José do Rio Preto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metodologia de pesquisa bibliográfica

Para a presente revisão de literatura utilizou-se bancos de dados eletrônicos (Biological Abstracts 1998 até 06/2007; CAB Abstracts 2006/12-2007/06 - 1989-1990; SilverPlatter MEDLINE(R) 1966 - In-Process & Other Citations Jul Wk 1-2 2007/07; OLDMEDLINE(R) Upd 2 1950-1965; Zoological Record v.115-120 1978 até v.141 2005), disponíveis no portal da pesquisa (www.portaldapesquisa.com.br) e as seguintes estratégias de busca: :#1 (struthio camelus or ostrich) and (heparina or ethilenediaminetetraacetic acid or EDTA or anticoagulants); #2 (struthio camelus or ostrich) and (hematology or haematological or hematologic or haemogram or erythrocytes) and (values or parameters or reference values) e #3(struthio camelus or ostrich) and (hematology or haematological or hematologic or haemogram or erythrocytes) and (Dimensions or cell lenght or cell width or area).

Como pesquisa complementar utilizou-se a literatura disponível do PubMed (www.pubmed.gov) e o recurso de pesquisa avançada do Google acadêmico (www.scholar.google.com.br) e os termos indexadores: struthio camelus or ostrich and erythrocytes.

Utilizou-se como critério de inclusão estudos de periódicos indexados relativos à série vermelha do sangue de animais da espécie “*camelus*” considerados sadios, independente do tamanho amostral, região de criação, manejo, sexo e idade. Não foram considerados como fator de exclusão diferenças

quanto à metodologia de colheita, conservação e análise laboratorial das amostras.

2.2 Colheita e conservação de amostras sanguíneas de avestruzes.

Pennock; Jones (1966) compararam o efeito do EDTA e da heparina sobre os índices hematimétricos do sangue humano e verificaram que esse sal na proporção maior de 2 mg/ml sangue produz valores de volume corpuscular médio (VCM) e de concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) falsamente diminuídos, comprometendo o diagnóstico das anemias.

Acredita-se que em humanos a hemólise causada pelo EDTA seja oriunda de seu efeito osmótico sobre a membrana eritrocitária e que a ação hemolítica é tão maior quanto maior for a concentração do anticoagulante (BLAXHALL, 1973). O EDTA promove alterações na membrana dos eritrócitos de humanos, modificando sua morfologia e desencadeando hemólise osmótica PINTERIC et al. (1975). Há outros relatos em humanos de que o EDTA também causa a agregação de eritrócitos, plaquetas e leucócitos (DEOL et al., 1995; LOMBARTS et al., 1999).

Sangue de aves e répteis colhidos com EDTA (1,8 mg/ml sangue) e heparina (10U/ml de sangue), apresentam valores de hematócrito similar, enquanto que maiores valores de VCM e de hemólise foram observadas nas amostras colhidas com o primeiro anticoagulante (HATTING; SMITH, 1976).

Fourie (1977) concluiu que a heparina é o anticoagulante mais adequado para a hematologia de pombos. A hemólise causada pelo EDTA foi observada na ave grou (HAWKEY et al., 1983), corvo, peru e calau (DEIN, 1986). Já Thrall

(2004) afirma que a heparina e o citrato podem ser utilizados nas análises hematológicas de aves e que o EDTA apresenta a vantagem de preservar a morfologia e evitar aglomerados leucocitários.

Assim como em outras espécies aviárias, não há um consenso sobre o uso dos anticoagulantes na hematologia dos avestruzes. Alguns pesquisadores utilizaram o EDTA (KELLY, 1999; SPINU et al., 1999; BEN ROMDHANE et al., 2000); outros a heparina (PALOMEQUE et al., 1991; MUSHI et al., 1999); enquanto Raukar e Simpraga (2005) utilizaram o citrato. Embora vários estudos comparativos comprovem efeitos de diferentes anticoagulantes sobre os parâmetros hematológicos de diversas espécies aviárias, répteis e peixes, estudos similares não foram realizados em avestruzes.

2.3 Parâmetros eritrocitários de avestruzes

Palomeque et al. (1991) estudaram o efeito da idade sobre os parâmetros eritrocitários de quatro avestruzes criados em zoológico na Espanha, nascidos num zoológico de Israel. Concluíram que os valores de volume globular (VG) e de hemoglobina das aves aos cinco meses foi significativamente menor do que aos 12 meses de idade. Neste mesmo estudo, utilizando-se uma ocular milimetrada, foi mensurado o diâmetro maior e menor de 50 eritrócitos de cada uma das quatro aves na sua fase jovem e adulta. Os resultados da morfometria eritrocitária, não revelaram diferenças em relação à idade dos avestruzes.

Tabela 1 - Resumo de resultados de estudos sobre o eritrograma e morfometria eritrocitária de avestruzes registrados na literatura.

	PALOMEQUE et al. (1991)	PALOMEQUE et al. (1991)	MUSHI et al. (1999)	MUSHI et al. (1999)	BEN ROMDHANE et al. (2000)	DURGUN et al. (2005)	DURGUN et al. (2005)	RAUKAR; SIMPRAGA, (2005)
País	Espanha	Espanha	Botsuana	Botsuana	Tunísia	Turquia	Turquia	Croácia
Número animais	4	4	50	50	54	15	13	10
Sexo	*	*	*	*	21♀ + 33 ♂	10♀ + 5 ♂	7♀ + 6 ♂	*
Idade	5 m	12 m	1-10 m	11-18 m	10-60 m	2 m	8 m	1d
Anticoagulante	Heparina	Heparina	Heparina	Heparina	EDTA	EDTA	EDTA	Citrato sódio
Eritrócitos (x10 ¹² /l)	1,91 ± 0,28	2,42 ± 0,37	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,58±0,30	1,83±0,19	1,62 ± 0,04
Hemoglobina (g/l)	133 ± 3,9	156 ± 8,9	109 ± 12	166,8 ± 9	147 ± 24	113,7±8,1	120,1±1,51	82 ± 45,7
Hematócrito (l/l)	0,37 ± 2,1	0,48 ± 2,4	0,36 ± 1,2	0,4325 ± 1,9	0,382 ± 5,7	0,3647±3,78	0,4015±2,44	0,1996 ± 1,1
VCM (fl)	196,9± 31,2	201,1± 25,1	200 ± 18	205,95± 15	250,6±19,3	236,61±40,31	221,46±18,21	122,92± 3,48
HCM (pg)	70,5 ± 9,0	65,3 ± 7,0	60,56 ± 5,0	79,42 ± 12	94,6 ± 3,0	74,26±14,19	66,11±8,15	50,68 ± 1,55
CHCM (g/l)	359 ± 31	325 ± 30	302,8 ± 15	385,6 ± 20	388 ± 26	314,0±16,1	299,5±3,72	412 ± 78,5
Diâmetro maior (µm)	13,18 ± 1,17	13,3 ± 1,09	16,5 ± 0,7	16,24 ± 0,84	-	14,00± 0,57	14,19± 0,83	-
Diâmetro menor (µm)	7,49 ± 0,84	7,53 ± 0,79	11,4 ± 0,8	11,3 ± 0,78	-	8,27± 0,62	8,38± 0,79	-
Diâmetro maior/menor (µm)	1,76 ± 0,15	1,77 ± 0,19	1,49 ± **	1,47 ± 0,12	-	-	-	-

* Informação não relatada pelo autor.

** Desvio padrão não fornecido pelo autor

- Dados não avaliados pelo autor

Mushi et al. (1999), realizaram na república africana de Botsuana o mais completo estudo sobre os valores hematológicos de avestruzes criados em sistema de produção comerciais. Neste estudo o eritrograma foi determinado em 100 avestruzes, sendo 50 jovens (1-10 meses) e 50 adultos (11-18 meses), entretanto, o sexo das aves não foi relatado pelos autores. Os valores de hemoglobina e VG dos avestruzes adultos foram significativamente maiores do que dos jovens. Neste mesmo estudo, utilizando-se uma ocular milimetrada, foi mensurado o diâmetro maior e menor de 50 eritrócitos de apenas cinco aves adultas e cinco jovens, não sendo observada diferença quanto à idade.

Ben Romdhane et al. (2000), na Tunísia determinaram o eritrograma de 54 avestruzes (21 fêmeas e 33 machos) com idade variando entre 10 e 60 meses. A partir de amostras colhidas com EDTA, em contador automático de células, determinaram os valores de eritrócitos, hemoglobina, VG, VCM e CHCM. Verificou-se que os valores de VCM e CHCM dos avestruzes com mais de 20 meses foram significativamente superiores aos dos avestruzes com menos de 20 meses, mas não quanto ao sexo.

Durgun et al. (2005) em amostras tratadas com EDTA, determinaram pelo método de hemocitometria, utilizando a solução de Natt-Herrick, a concentração de eritrócitos, hemoglobina, VG, VCM, HCM, CHCM e o diâmetro médio dos eritrócitos de 15 filhotes e 13 reprodutores. Foram comparados apenas os grupos segundo a faixa etária e foram encontradas diferenças significantes para a contagem de eritrócitos e VG que foram menores nos pintinhos do que nos reprodutores.

Raukar e Simpraga (2005), na croácia, utilizando apenas 10 aves e sem identificar o sexo, concluíram que a taxa de eritrócito, hemoglobina, VG, VCM, CHCM e HCM de avestruzes de um dia foi menor do que os com 10 dias de idade.

3 OBJETIVOS

3.1 Testar a hipótese de que o volume, a integridade e a morfometria eritrocitária de avestruzes diferem em amostras colhidas com EDTA sódico e heparina sódica.

3.2 Testar a hipótese de que os valores do eritrograma e da morfometria dos eritrócitos variam de acordo com a faixa etária e o sexo.

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
(EDTA) E DA HEPARINA SOBRE OS ERITRÓCITOS DE AVESTRUZES
(*Struthio camelus*)**

Antonio José Sabino¹, Silvia Cellone Trevelin², Paulo César Ciarlini^{1*}.

¹Méd. Veterinário, aluno do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, nível de Mestrado do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Unesp – Campus de Araçatuba, SP.

²Bolsista de Iniciação Científica – FAPESP (Proc. 06/50945-8) do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Unesp – Campus de Araçatuba, SP.

^{2*}Méd. Vet., Dr. Professor Assistente, UNESP – Curso de Medicina Veterinária – Depto. de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, - Araçatuba – Rua Clóvis Pestana, 793 – Araçatuba – SP CEP: 16050-680 – E-mail: ciarlini@fmva.unesp.br, * **Autor para correspondência.**

RESUMO

Anticoagulantes com diferentes formas de ação têm sido utilizados na hematologia aviária, entretanto, poucos estudos sobre o efeito dos mesmos, sobre os parâmetros hematológicos dos avestruzes foram publicados. Visando preencher essa lacuna, foi comparado o efeito de dois anticoagulantes de rotina (EDTA - 2 mg/mL sangue e da heparina -10U/mL sangue) sobre os eritrócitos de avestruzes. Para tal, foram avaliadas a integridade, o volume globular e a morfometria dos eritrócitos de amostras sangüíneas de 20 aves, tratadas com ambos os anticoagulantes. A integridade eritrocitária foi estimada pelo grau de hemoglobina livre no plasma, sendo o volume globular obtido pelo método de micro-hematócrito e os dados morfométricos (área, diâmetro maior e menor) calculados automaticamente em sistema computadorizado de imagem digital de alta resolução. A hemólise estimada pela dosagem de hemoglobina plasmática, o volume globular, a área e o diâmetro máximo dos eritrócitos foram significativamente maiores nas amostras tratadas com EDTA. Por melhor preservar a integridade e a morfometria dos eritrócitos, concluiu-se que a heparina é um anticoagulante mais adequado que o EDTA para avaliar as discrasias eritrocitárias dos avestruzes.

Palavras chave: Hemácias, interferência de anticoagulante, morfometria eritrocitária, técnica de colheita, hematologia aviária.

ABSTRACT

COMPARISON OF THE EFFECT OF ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID (EDTA) AND HEPARIN ON ERYTHROCYTES OF THE OSTRICHES (*Struthio camelus*). Anticoagulants with different forms of action have been used in avian hematology. However, regarding to the ostriches, few researches about the anticoagulant effects on the hematological parameters was published. Aiming at fulfilling this gap, the effect of two routine anticoagulants (EDTA - 2 mg/mL blood and Heparin - 10 U/mL blood) on erythrocytes of ostriches was compared. Blood samples of 20 ostriches, treated with both anticoagulants were evaluated for integrity, globular volume and morphometry of the erythrocytes. The erythrocyte integrity was estimated by the concentration of free hemoglobin in the plasma. The globular volume was obtained by the method of microhematocrit, and the morphometric data (area, bigger and smaller diameters) were calculated automatically by a computer-based system of high-resolution digital image. The hemolysis estimated by the plasmatic hemoglobin level, the globular volume, the area, and the maximum diameter of the erythrocytes were significantly higher in the samples treated with EDTA. To better preserve the integrity and the morphometry of the erythrocytes, it was concluded that the heparin rather than EDTA is a more appropriated anticoagulant to evaluate the erythrocyte dyscrasia of the ostriches.

KEY WORDS: red blood cells (erythrocytes), anticoagulant interference, erythrocyte morphometry, blood collection techniques, avian hematology

INTRODUÇÃO

A demanda mundial por produtos de alto valor agregado proporcionou a popularização da criação de avestruz em diversos países, cujo rebanho mundial, explorado zootecnicamente, chega a aproximadamente quatro milhões de aves. O Brasil apresenta um plantel em formação na primeira fase de produção, com cerca de dez anos e aproximadamente 200 mil aves distribuídas em várias regiões do país (ACAB, 2005). Estima-se que a industrialização se inicie nos próximos três anos. O interesse na patologia clínica desses animais determinou a necessidade de se estabelecer perfis hematológicos para auxiliar no diagnóstico das doenças.

A heparina possui ação antitrombínica, impedindo a coagulação, enquanto o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um composto orgânico que age formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Em razão dessa propriedade, o sal EDTA é usado como anticoagulante do sangue, pois quela os íons de cálcio, que promovem a coagulação sangüínea (JAIN, 1993).

PENNOCK; JONES (1966) compararam o efeito do EDTA e da Heparina sobre os índices hematimétricos do sangue humano e demonstraram que esse sal produz valores de volume corpuscular médio (VCM) e de concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) falsamente diminuídos, podendo comprometer o diagnóstico das anemias. Observaram que os valores do volume globular de sangue colhido com concentração de EDTA superior a 2 mg/ml diminuíram significativamente.

Em humanos, acredita-se que a hemólise causada pelo EDTA seja oriunda de seu efeito osmótico sobre a membrana eritrocitária, cuja ação hemolítica é tão maior quanto maior for a concentração do anticoagulante (BLAXHALL, 1973). Segundo PINTERIC *et al.* (1975),

o EDTA promove alterações na membrana dos eritrócitos de humanos, modificando sua morfologia e desencadeando o processo de hemólise osmótica. Vários autores relataram agregação de eritrócitos, plaquetas e principalmente leucócitos associada à presença de EDTA (DEOL *et al.*, 1995; LOMBARTS *et al.*, 1999).

O volume globular de sangue de aves e répteis colhidos com EDTA e heparina foi similar, entretanto, observaram-se maiores valores de VCM e de hemólise nas amostras colhidas com o primeiro anticoagulante (HATTING; SMITH, 1976). Segundo FOURIE (1977) a heparina é o anticoagulante mais adequado para a hematologia de pombos. A hemólise causada pelo EDTA foi observada na ave grou (HAWKEY *et al.*, 1983), corvo, peru e calau (DEIN, 1986). Diferentemente, THRALL (2004) afirma que a heparina e o citrato podem ser utilizados nas análises hematológicas de aves, entretanto, o EDTA apresenta a vantagem de preservar a morfologia e evitar aglomerados de leucócitos.

KELLY (1999), SPINU *et al.* (1999) e BEN ROMDHANE *et al.* (2000) utilizaram o EDTA, enquanto RAUKAR; SIMPRAGA (2005) utilizaram o Citrato de Sódio e PALOMEQUE *et al.* (1991) e MUSHI *et al.* (1999) utilizaram a heparina, como anticoagulante de escolha para estudos hematológicos em avestruzes; mesma situação observada em estudos hematológicos sobre outras espécies aviárias, demonstrando que não há um consenso sobre o uso dos anticoagulantes na hematologia aviária.

Como foi visto, há trabalhos comparando o efeito dos anticoagulantes em diversas espécies aviárias, répteis e peixes, mas não foram encontrados registros na literatura de estudos comparando o efeito dos anticoagulantes sobre os eritrócitos de avestruzes.

À semelhança do que já foi verificado em outras espécies, supomos que os valores hematológicos de avestruzes se diferenciam conforme o anticoagulante utilizado, particularmente quanto à série eritrocítica. O presente estudo objetivou testar a hipótese de

que o volume, a integridade e a morfometria eritrocitária diferem em amostras colhidas com EDTA sódico e Heparina sódica.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais: Utilizaram-se 20 avestruzes com idades entre 7 e 62 dias, sendo oito fêmeas e doze machos, provenientes do incubatório do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP – Campus de Araçatuba, São Paulo, e foram selecionados animais que apresentavam boa condição clínica e não apresentaram nenhuma doença até 30 dias de acompanhamento pós-experimento.

Coleta das amostras: Em coleta única, utilizando-se agulhas (0,70 x 25 mm) e seringas plásticas descartáveis, de cada ave, por flebocentese da jugular, obtiveram-se três mililitros de sangue que foram distribuídos eqüitativamente em três diferentes frascos plásticos: Tubo E: contendo 20 µL de solução aquosa de EDTA sódico¹ a 10% (2 mg/mL sangue); Tubo H: contendo 2 µL de heparina sódica² (10 U/mL sangue), conforme preconizado por JAIN (1993) e THRALL (2004) e Tubo SA: isento de anticoagulante.

Análises laboratoriais: As amostras foram mantidas refrigeradas (4°C) até o momento de seu processamento (2 a 5 horas). O volume globular (VG) foi determinado pelo método de micro-hematócrito, conforme preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), utilizando-se tempo de centrifugação de cinco minutos e força de centrifugação de 11827 g. A concentração de hemoglobina no soro e no plasma foi determinada pelo método da cianohemiglobina, utilizando-se um conjunto reativo de Drabkin comercial³ e leitura em espectrofotômetro⁴ com comprimento de onda de 540 nm.

¹ EDTA Titriplex II GR for analysis, Merck, UK

² Heptar, 5000U, Eurofarma, São Paulo-SP

³ Líquido de Drabkin, Newprov, Maringá-PR

⁴ Espectrofotômetro CELM E205D, São Paulo-SP

A coloração dos esfregaços sangüíneos foi realizada utilizando-se um conjunto de reativo panótico rápido comercial⁵. A determinação morfométrica dos eritrócitos foi realizada com imagens obtidas por sistema de microscopia óptica⁶ (aumento 400X) acoplado à câmera de captura digital⁷ e analisadas por programa computadorizado de análise de imagem⁸ configurado para o cálculo automático de área e dos diâmetros máximo e mínimo de estruturas elípticas. Os parâmetros morfométricos foram estimados a partir das análises individuais de no mínimo 100 eritrócitos de cada amostra de sangue colhida com EDTA e heparina, totalizando o mínimo de 2000 eritrócitos por tratamento.

Análise estatística: Depois de realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, a significância das diferenças de VG, a área e os diâmetros entre os tratamentos EDTA e heparina foram calculadas pelo teste T de Student não pareado ou de Mann-Whitney. Para a variável hemoglobina, realizaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Dunn para a comparação múltipla de postos referentes aos tratamentos EDTA, heparina e soro. Todas as análises estatísticas supracitadas foram realizadas em programa estatístico computadorizado⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os parâmetros analisados no presente estudo não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quanto à idade e o sexo, diferindo da literatura, de modo que os dados foram analisados como um todo, levando-se em consideração apenas os tratamentos (EDTA e heparina).

⁵ Instant Newprov, Maringá-PR

⁶ LEICA DMLS, Wetzlar, Germany

⁷ LEICA DC 300, Heerbrugg, Schweiz

⁸ Image-Pro[®] Plus, version 4.1, Media Cybernetics, Maryland, USA.

⁹ SAS/Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA

A concentração de hemoglobina no soro das amostras colhidas sem anticoagulantes foi insignificante e não diferiu das amostras tratadas com heparina (Tab. 1). O grau de hemólise indicado pela concentração de hemoglobina no plasma de amostras tratadas com EDTA foi significativamente superior ao verificado com amostras heparinizadas e do soro, independentemente da idade (Fig. 1). Os achados quanto à presença de hemoglobina no soro indicam que a metodologia de colheita e manipulação das amostras não promoveu perda significativa da integridade dos eritrócitos. Já a maior concentração de hemoglobina no plasma colhido com EDTA, evidencia o efeito hemolítico mais acentuado desse anticoagulante quando comparado à heparina, conforme descrito nas aves grou (HAWKEY *et al.*, 1983), corvo, peru e calau (LUMELJ, 1986).

Independentemente da faixa etária dos avestruzes, a grande maioria (95%) das amostras com EDTA apresentou VG maior do que as amostras tratadas com heparina, sendo a maior diferença de 9% (Fig. 2). Embora tenha sido observado neste estudo um efeito hemolítico maior em amostras com EDTA, o VG médio de amostras obtidas com esse sal foi significativamente superior aos com heparina (Tab. 1). Este achado aparentemente contraditório se deve a um efeito osmótico do EDTA sobre os eritrócitos, ocasionando maior hemólise e aumento do volume das células mais resistentes não lisadas, conforme já descrito em humanos por BLAXHALL (1973) e PINTERIC *et al.* (1975) e indicado pelos demais parâmetros morfométricos do presente estudo. O EDTA em concentrações que diferem de uma espécie para outra, seqüestra os íons Ca^{++} responsáveis pela ativação da bomba de Na^{+} e K^{+} da membrana celular, permitindo a livre entrada de água para o interior da célula, promovendo seu intumescimento e conseqüente lise (JAIN, 1993). De fato, a média da área dos eritrócitos obtidos com EDTA foi significativamente superior ao da heparina (Tab. 1), sendo os menores eritrócitos ($30-99 \mu\text{m}^2$) mais freqüentes em amostras heparinizadas, enquanto eritrócitos maiores ($100-150 \mu\text{m}^2$) mais numerosos

em amostras com EDTA (Fig. 3). Achados semelhantes foram encontrados por GULIVER (1875) apud e descritos em outras aves e répteis por HATTING; SMITH (1976). Estes autores observaram que o volume globular de sangue de aves e répteis colhidos com EDTA e heparina foi similar, entretanto, verificaram maiores valores de VCM e hemólise nas amostras colhidas com o primeiro anticoagulante. Adicionalmente, os eritrócitos dos avestruzes, apresentam diferentes grau de fragilidade osmótica por interações químicas com ambos os anticoagulantes, observados pela presença de hemólise nas amostras obtidas no plasma das amostras tratados com EDTA e heparina, também reportado por ANDREASEN (1997).

Amostras colhidas com EDTA, quando comparadas às heparinizadas, apresentaram diferenças significativas quanto ao diâmetro maior e menor (Tab. 1), apresentando eritrócitos mais alongados. Tais diferenças devem ser consideradas em estudos que utilizam a morfometria eritrocitária para desenvolvimento de contadores automatizados e para investigação comparativa da evolução e adaptação das espécies.

Os resultados obtidos indicam que para a adequada interpretação dos valores eritrocitários dos avestruzes, o clínico deve considerar o tipo de anticoagulante utilizado na colheita da amostra. Amostras colhidas com EDTA podem mascarar o diagnóstico de processos anêmicos quando considerado valor de referência de VG obtidos de amostras heparinizadas. Por outro lado, quando considerado a contagem eritrocitária, a amostra colhida com EDTA pode induzir a um falso diagnóstico de anemia devido ao efeito hemolítico desse sal. Esse efeito hemolítico, não observado com a heparina, contra-indica o uso do EDTA para fins de análises bioquímicas, observando que os kits comerciais para bioquímica sanguínea, de maneira geral, não permitem amostras com presença de hemólise, com concentração de hemoglobina no soro ou plasma superior a 0,2 mg/dl, valor

inferior aos encontrados. Para fins de análises quantitativa e morfométrica dos parâmetros eritrocitários de avestruzes, a heparina sódica (10 U/mL sangue) demonstrou ser um anticoagulante mais adequado do que o EDTA sódico (2 mg/ mL sangue).

Agradecimentos: Prof. Dr. Manoel Garcia Neto, Prof^a. Valéria Maria Savoya da Silva, funcionários e Médicos Veterinários residentes do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita filho – UNESP – campus de Araçatuba

5. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE AVESTRUZ DO BRASIL (ACAB). *Estrutociultura*. São Paulo, Disponível em: < <http://www.acab.org.br/?md=estatico&pag=estrutociultura/index> >. Acesso em: 25 jul. 2005.

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

BEN ROMDHANE, S.; ROMDANE, M. N.; MHIRI, S.; BEN MILED, M. A.; KORTAS, M. Les paramètres biochimiques et hematologiques chez l'autruche (*Struthio camelus*) dans un élevage tunisien. *Révue de Médecine Vétérinaire*, Toulouse, v. 3, n. 151, p. 231 – 238, 2000.

BLAXHALL, P. C. Error in haematocrit value produced by inadequate concentration of thilenediamine tetra-acetate. *Journal of Fish Biology*, London, v.5, n. 6, p. 767 - 769, 1973.

DEIN, F. J. *Clinical Avian Medicine and Surgery*. Philadelphia: C. J. Harrison and L. R. Harrison, 1986. pp 174 – 191.

DEOL I.; HERNANDEZ A. M.; PIERRE R. V. Ethilenediaminetetraacetic acid – associated leukoagglutination. *American Journal of Cinical Pathology*, Philadelphia, v. 103, n. 3, p. 338 – 340, 1995.

FOURIE, F. R. Effects of anticoagulants on the haematocrit, osmolarity and pH of avian blood. *Poultry Science*, Menasha, v.56, n.6, p.1842 – 1846, 1977.

GULLIVER, G. Observations on the sizes and shapes of the red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements. *Proceedings of the Zoological Society of London*, p. 474-495, 1875. In: BIRD erithrocyte sizes. Disponível em: < <http://www.genomesize.com/cellsize/references.htm> >. Acesso em: 18 abril 2007.

HATTING J.; SMITH E. M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflugers Archives*, Berlin, v. 363, n. 3, p. 267 - 269, 1976.

HAWKEY, C.; SAMOUR, J. H.; ASHTON, D. G.; HART, M. G.; CINDERY, R. N.; FINCH, J. M.; JONES, D. M. Normal and clinical hematology of captive cranes (gruiformes). *Avian Pathology*, London, v. 12, n.1, p.73-84, 1983.

JAIN, N. C. Coagulation and its disorders. In:____ *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993. cap. 5, p. 82 – 104.

KELLY, M. P. Psittacine blood and hematology, In:___ *Basics for the veterinary practitioner*, IVCVM, 1999. Disponível em: < <http://www.vet.uga.edu/vpp/ivcvm/1999/phillips/index.php> >. Acesso em: 3 maio 2007.

LOMBARTS, A. J. P. F.; ZIJSTRA, J. J.; PETERS, R. H. M.; THOMASSON, C. G.; FRANCK, P. F. H. Accurate platelet counting in an insidious case of pseudothrombocytopenia. *Clinical and Chemical Laboratory Medicine*, Berlin, v. 37, n. 11 - 12, p. 1063 – 1066, 1999.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. In:___ *Clinical biochemistry of domestical animals*. Philadelphia: C. J. Harrison and L. R. Harrison, 1986. cap. 30, p 858.

MUSHI, E. Z.; BINTA, G. M.; CHABO, R. G.; ISA, J. F. W.; KAPAATA, R. W. Selected hematologic values of farmed ostriches (*Struthio camelus*) in Botswana. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. Davis, v. 11, n. 4, p. 372 – 374, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Procedure for determining packed cell volume by the microhematocrit method; Approved standard – 3rd ed., document H7-A3, Wayne, Pa, 2000. v. 20, n. 18. Disponível em: < <http://www.clsi.org/source/orders/free/h7-a3.pdf> >. Acesso em: 5 maio. 2007.

PALOMEQUE, J.; PINTÓ, D.; VISCOR, G. Hematologic and blood chemistry values of the masai ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, v. 27, n. 1, p. 34 – 40, 1991.

PENNOCK, C. A; JONES, K. W. Effect of ethylene-diamine-tetracetic-acid (dipotassium salt) and heparin on the estimation of packed cell volume. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 19, n. 2, p. 196 – 199, 1966.

PINTERIC, L.; MANERY, J. F.; CHAUDRY, I. H; MADALPALLIMATTAM, G. The effect of EDTA, cations, and various buffers on the morphology of erythrocyte membranes: an electron-microscopic study. *Blood*, Washington, v. 45, n. 5, p. 709 – 724, 1975.

RAUKAR, J.; SIMPRAGA, M. Haematological parameters in the blood of one day old ostriches. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, Raanana, v. 60, n. 4, p. 112 – 116, 2005.

SPINU, M.; SPINU, O.; DEGEN, A. A. Haematological and imunological variables in a domesticated and wild subspecies of ostrich (*Struthio camelus*). *British Poultry Science*, Edinburgh, v. 40, n. 5, p. 613 – 618, 1999.

THRALL, M.A. Hematology of birds. In: ____ *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lea & Fabiger, cap. 17, p. 225-258, 2004.

Tabela 1 – Média e desvios-padrão do volume globular, do teor de hemoglobina plasmática e sérica e da morfometria dos eritrócitos de amostras de sangue de avestruzes colhidas com EDTA e Heparina.

	EDTA	HEPARINA	Soro	P-value
Hemoglobina (g/L)	3,3 ± 2,4 ^a	0,1 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,2 ^b	< 0,01
Volume globular (L/L)	0,30 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,03 ^b		0,007
Área (µm ²)	103,13 ± 14,55 ^a	99,67 ± 14,72 ^b		< 0,0001
Diâmetro máximo (µm)	15,51 ± 1,14 ^a	15,42 ± 1,64 ^b		0,03
Diâmetro mínimo (µm)	8,65 ± 1,03 ^a	8,98 ± 1,17 ^b		< 0,0001

* Letras não coincidentes na mesma linha indicam diferença significativa.

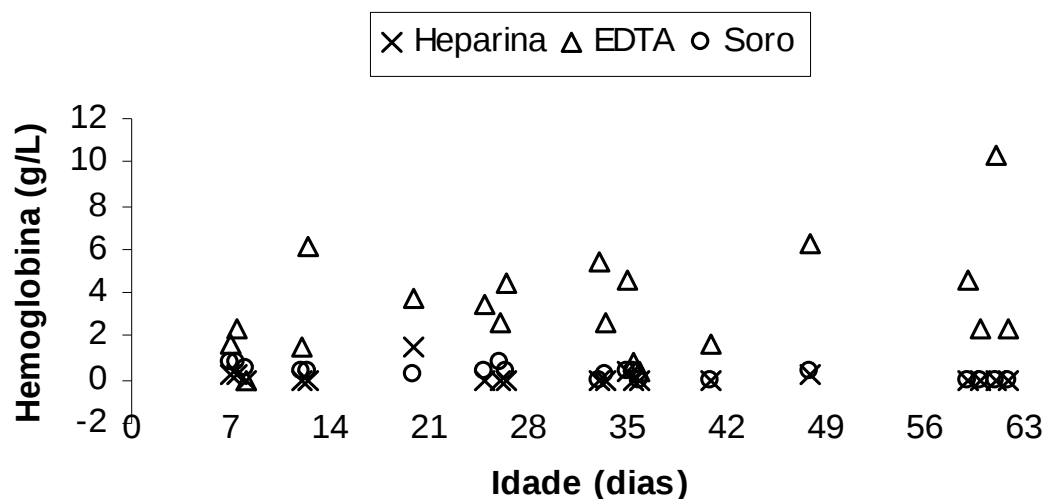


Figura 1 – Dispersão do grau de hemólise de acordo com a faixa etária expressa pela concentração de hemoglobina livre em amostras sanguíneas de avestruzes colhidas sem anticoagulantes (soro) e com anticoagulantes (EDTA e heparina).

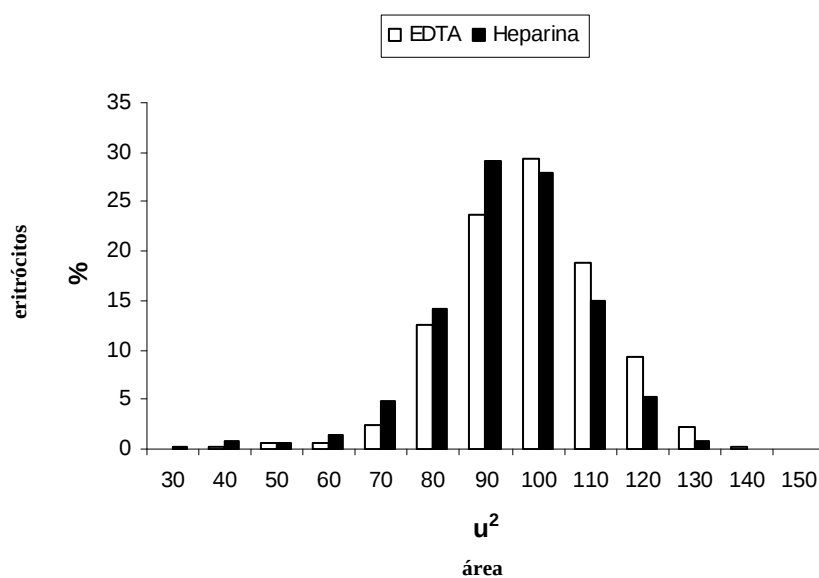


Figura 2 – Frequência de eritrócitos de acordo com a área, em amostras sanguíneas de avestruzes colhidas com EDTA e heparina

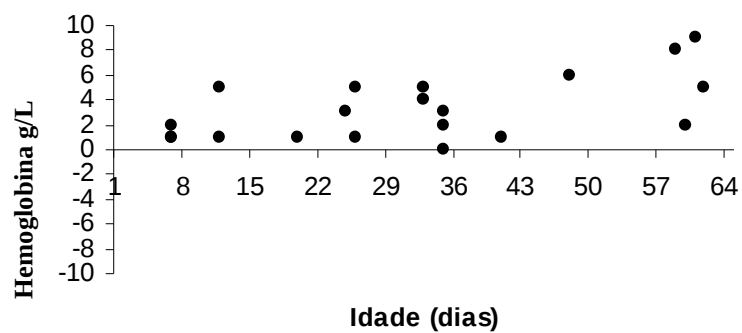


Figura 3 – Diferenças da concentração de hemoglobina no plasma de amostras sanguíneas de avestruzes colhidas com EDTA em relação à heparina de acordo com a faixa etária.

ERITROGRAMA E MORFOMETRIA ERITROCITÁRIA DE AVESTRUZES (*Struthio camelus*) CRIADOS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, BRASIL*

Antonio José Sabino¹, Silvia Cellone Trevelin², Paulo César Ciarlini^{10*}.

¹Méd. Veterinário, aluno do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, nível de Mestrado do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Unesp – Campus de Araçatuba, SP.

² Bolsista de Iniciação Científica – FAPESP (Proc. 06/50945-8) do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Unesp – Campus de Araçatuba, SP.

^{2*}Méd. Vet., Dr. Professor Assistente, UNESP – Curso de Medicina Veterinária – Depto. de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, - Araçatuba – Rua Clóvis Pestana, 793 – Araçatuba – SP CEP: 16050-680 – E-mail: ciarlini@fmva.unesp.br, * **Autor para correspondência.**

RESUMO

Objetivou-se obter valores eritrocitários de referência para avestruzes criados em sistema comercial na Região de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Para tal foram analisadas 240 amostras de sangue heparinizadas de avestruzes de ambos os sexos, divididos em três diferentes faixas etárias: 4 | 13 meses; 13 | 22 meses e 22 | 30 meses. Utilizando-se método analítico padrão, verificou-se que os valores de eritrócitos, da hemoglobina, do hematócrito, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e os diâmetros maior e menor dos eritrócitos sofrem influência do sexo e da faixa etária. No geral, aves mais jovens apresentaram valores eritrocitários menores do que os dos mais velhos, sendo que o efeito etário apenas foi significativo nas fêmeas para as variáveis eritrócitos, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM. Avestruzes fêmeas apresentaram valores de hematócrito, VCM, HCM e CHCM significativamente mais elevados do que os dos

* Parte integrante da dissertação de mestrado do primeiro autor. A constituent part of the first author's Master Degree Dissertation

machos em algumas faixas etárias. Verificou-se que os eritrócitos de aves fêmeas são mais alongados e mais largos que os dos machos. Conclui-se que os parâmetros eritrocitários de avestruzes da Região de São José do Rio Preto apresentam valores particulares diferentes dos obtidos em outras condições geoclimáticas e de manejo. Confirmou-se a hipótese de que os parâmetros eritrocitários de avestruzes sofrem a influência do sexo e da faixa etária, ressaltando a importância de considerar esses fatores para a adequada interpretação clínica do eritrograma.

Palavras-chave: hemácia, diâmetro, valor de referência; fator sexual, fator etário.

ABSTRACT

ERYTHROGRAM AND MORPHOMETRY OF OSTRICHES (*Struthio camelus*)

RAISED IN THE REGION OF SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, BRAZIL

The aim of this study was to obtain the reference values of erythrocyte indices for ostriches raised in a commercial system in the region of São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. We analyzed 240 heparinized blood samples of both male and female ostriches divided into different age groups: 4 – 13 months; 13 – 22 months; and 22 – 30 months. Using a standard analytical method it was observed that the erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) values, and both the greater and the smaller diameters of the erythrocytes are under the influence of gender and age group. On the whole, the younger ostriches presented lower erythrocyte indices than the older ones. The age group effect was only significant in the females for the erythrocyte, hemoglobin, MCV, MCH, and MCHC variables. The female ostriches presented hematocrit, MCV, MCH, and MCHC values significantly higher than the male ostriches in some of the age

groups. It was observed that the erythrocytes of the female ostriches are more elongated and larger than the male ostriches. We concluded that the erythrocyte parameters of the ostriches from the region of São José do Rio Preto present different specific values from that obtained in other geoclimatic and handling conditions. The hypothesis that the erythrocyte parameters of ostriches are under the influence of gender and age group was confirmed highlighting the importance of considering these factors for an appropriated clinical interpretation of the erythrogram.

Keywords: red blood cell, diameter, reference value, age factor; sex factor.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um plantel em formação na primeira fase de produção, com cerca de dez anos e aproximadamente 200 mil aves, sendo São José do Rio Preto uma das mais importantes regiões da avicultura do país (ACAB, 2005). Aliado ao seu alto valor comercial e grande longevidade dos avestruzes, é crescente o interesse no estabelecimento de valores hematológicos de referência que auxiliem nos diagnósticos das doenças e distúrbios nutricionais que afetam esta espécie. Segundo MUSHI et al. (1999) a medicina das aves exige valores hematológicos de referência que levem em consideração a localização geográfica e os diferentes sistemas de manejo da espécie. Os parâmetros hematológicos das aves são influenciados por fatores como espécie, sexo, idade, dieta e manejo (THRALL et al. 2004).

Os escassos estudos sobre os parâmetros eritrocitários de avestruzes até então realizados (PALOMEQUE et al., 1991; MUSHI et al., 1999; BEN ROMDHANE et al., 2000; DURGUN et al., 2005; RAUKAR; SIMPRAGA, 2005) apresentam resultados divergentes e se caracterizam pelo pequeno número de amostras analisadas sem definição

do sexo dos animais e em condições geográficas e climáticas diferentes. Contribuem também para tais divergências a falta de padronização da colheita das amostras sangüíneas, tendo alguns autores utilizados a heparina (PALOMEQUE et al., 1991; MUSHI et al., 1999), outros citrato (RAUKAR; SIMPRAGA, 2005) ou EDTA (BEN ROMDHANE et al., 2000; DURGUN et al., 2005).

Na ausência de dados nacionais e da divergência observada nos estudos estrangeiros, decidiu-se estabelecer os valores eritrocitários de referência para avestruzes criados em sistema de produção comercial na região de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais e delineamento: Utilizaram-se 240 avestruzes (132 fêmeas e 108 machos) criados em oito diferentes fazendas comerciais da região de São José do Rio Preto (SJRP), São Paulo, Brasil. A região de SJRP está localizada a 489m acima do nível do mar, apresenta solo de arenito Podsol e Latsol (fase arenosa), vegetação de cerrado, clima é tropical, com temperatura média de 25.4°C e pluviosidade de 200 mm no período que vai de outubro a março (BOLSONI, 2006). O manejo das aves de todas as propriedades era similar: ração balanceada em cocho, piquetes de crescimento de 15 x 50 m com lotação máxima de 60 aves; piquetes de engorda de 15 x 50 m com lotação máxima de 30 aves. As fêmeas adultas se encontravam fora do período de postura. Para inclusão de aves no experimento utilizaram-se os critérios de boa condição clínica e corpórea no momento da colheita das amostras. As aves foram agrupadas de acordo com o sexo em três faixas etárias diferentes: 4 – 13 meses (92 aves); 13 – 23 meses (80 aves) e 23 – 30 meses (68 aves).

Colheita, conservação e processamento das amostras: Para minimizar o estresse da contenção e colheita do sangue, os olhos das aves foram vedados com capuz de lã com o auxílio dos tratadores da propriedade. Utilizando-se agulhas descartáveis (0,70 x 25 mm) e tubos siliconizados e heparinizados¹¹, de acordo com a faixa etária de cada ave, por flebocentese da jugular, braquial ou radial externa obtiveram-se dez mililitros de sangue. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas (4°C) até o momento de seu processamento laboratorial que variou de duas a cinco horas. O hematócrito foi determinado pelo método de micro-hematócrito, conforme preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), utilizando-se tempo de centrifugação de cinco minutos e força de centrifugação de 11827 g. A concentração de hemoglobina foi determinada em duplicata pelo método da cianohemiglobina, utilizando-se um conjunto reativo de Drabkin comercial¹² e leitura em espectrofotômetro¹³ com comprimento de onda de 540 nm. A fim de evitar interferência, a leitura da reação de hemoglobina foi realizada após a separação por centrifugação do material nuclear suspenso. A contagem dos eritrócitos foi realizada manualmente em câmara de Neubauer utilizando líquido diluidor de Natt-Herrick, conforme preconizado por THRALL (2004). A coloração dos esfregaços sangüíneos foi realizada utilizando-se um conjunto de reativo panótico rápido comercial¹⁴. A morfometria dos eritrócitos de todas as amostras das aves foi realizada com imagens obtidas por sistema de microscopia óptica¹⁵ (aumento 400X) acoplado à câmera de captura digital¹⁶ e analisadas por programa computadorizado de análise de imagem¹⁷ configurado para o cálculo automático de diâmetros máximo e mínimo de estruturas elípticas. Os parâmetros

¹¹ Vacutainer, BD, São Paulo, SP.

¹² Líquido de Drabkin, Newprov, Maringá-PR.

¹³ Espectrofotômetro CELM E205D, São Paulo-SP.

¹⁴ Instant Newprov, Maringá-PR.

¹⁵ LEICA DMLS, Wetzlar, Germany.

¹⁶ LEICA DC 300, Heerbrugg, Schweiz.

¹⁷ Image-Pro® Plus, version 4.1, Media Cybernetics, Maryland, USA.

morfométricos de cada grupo sexual e etário foram determinados a partir da análise de no mínimo 2000 eritrócitos (100 eritrócitos / ave).

Análise estatística: Partindo-se de um nível de significância mínimo de 5% e utilizando-se um programa estatístico computadorizado¹⁸, após a confirmação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados dos diferentes grupos experimentais foram submetidos à ANOVA e a significância das diferenças entre os grupos calculadas pelo teste Tukey-Kramer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Refletindo as diferenças geográficas, climáticas, de manejo, de amostragem, de metodologia de colheita e processamento laboratorial das amostras; os valores eritrocitários registrados na Tabela 1 em grande parte divergem dos obtidos em estudos anteriores. A comparação dos resultados ficou comprometida porque nos estudos anteriores os autores não consideraram o sexo das aves.

Os valores de eritrócitos e hemoglobina do presente estudo foram inferiores aos obtidos por PALOMEQUE et al. (1991) para avestruzes com cinco a doze meses e o hematócrito, apenas em relação aos animais de doze meses, enquanto que o VCM, HCM e CHCM foram superiores.

Os valores de eritrócitos foram semelhantes aos obtidos por MUSHI et al. (1999) para avestruzes com idade entre um e dez meses, enquanto que o hematócrito e o VCM foram superiores, o HCM e CHCM foram inferiores. Comparando com aves entre onze e dezoito meses estudadas por MUSHI et al. (1999), todos os parâmetros eritrocitários, exceto o VCM, foram superiores ao do presente estudo.

¹⁸ SAS/Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA

Os valores de eritrócitos, hematócrito e VCM foram semelhantes aos obtidos por BEM ROMDHANE et al. (2000) em estudo realizado com avestruzes com idade entre dez e sessenta meses, entretanto estes autores encontraram uma taxa de hemoglobina, HCM e CHCM superior.

Observou-se ainda proximidade dos resultados de eritrócitos, hematócrito e VCM com os descritos por DURGUN et al. (2005) para avestruzes de ambos os sexos e idade entre dois e oito meses. A concentração de hemoglobina, HCM e CHCM foram maiores que os obtidos por DURGUN et al. (2005).

Embora tenha sido verificado um aumento do número de eritrócito, hemoglobina e hematócrito com a idade, nenhum valor do eritrograma dos avestruzes machos apresentou diferença ($p < 0,05$) em relação às diferentes faixas etárias estudadas. Já as aves fêmeas com menos de treze meses de idade apresentaram taxa de hemoglobina, VCM e CHCM significativamente menores do que as fêmeas de maior idade (13-30 meses), enquanto o HCM apresentou valores maiores. O hematócrito das aves fêmeas com até vinte e dois meses de idade foram significativamente ($p < 0,05$) superiores aos do grupo de machos mais jovens. O efeito do sexo sobre os parâmetros eritrocitários não foi alvo de investigação em estudos anteriores, não permitindo comparações com outros achados na literatura. Já os menores valores eritrocitários observado em avestruzes jovens do que em adultos coincide com os achados de PALOMEQUE et al. (1991); MUSHI et al. (1999) e DURGUN et al. (2005). Acredita-se que o aumento do número de eritrócitos e da hemoglobina com a idade, esteja relacionado a uma maior demanda de oxigênio do avestruz durante a fase de crescimento (DURGUN et al., 2005). No presente estudo, entretanto, os valores de eritrócitos das fêmeas mais jovens foram significativamente maiores, quando comparada com as aves mais velhas. É possível que o maior número de eritrócito seja uma

compensação à menor taxa de hemoglobina observada nos avestruzes fêmeas jovens. De fato, as fêmeas mais jovens de avestruzes apresentaram CHCM significativamente inferior a todas as demais faixas etária de ambos os sexos.

Os valores de diâmetro maior e menor obtidos por DURGUN et al. (2005) foram inferiores aos do presente estudo. É possível que essa diferença quanto ao diâmetro esteja em parte relacionada ao fato de que esses pesquisadores utilizaram o EDTA como anticoagulante. Recentemente, nossa equipe (dados não publicados) demonstrou que amostras de sangue de avestruzes colhidas com EDTA apresentam eritrócitos com maior diâmetro e área, quando comparada com amostras colhidas com heparina, confirmando estudos anteriores realizados com outras espécies de aves e répteis (HATTING; SMITH, 1976). Outros fatores, além do anticoagulante, devem contribuir para diferenças na morfometria dos eritrócitos, uma vez que PALOMEQUE et al. (1991), à semelhança deste estudo, utilizou a heparina e obteve valores de diâmetros eritrócitários menores.

Os valores de diâmetro maior dos eritrócitos foram semelhantes aos obtidos por MUSHI et al. (1999), enquanto que o diâmetro menor foi inferior aos descritos por esses autores. Deve ser ressaltado que PALOMEQUE et al. (1991); MUSHI et al. (1999) e DURGUN et al. (2005) não diferenciaram o sexo dos animais estudados e analisaram comparativamente, um menor número de células a partir de uma metodologia morfométrica manual, sujeita a um maior erro que a mensuração computadorizada adotada no presente estudo. Tais diferenças metodológicas, além das relacionadas com raça, clima e manejo podem justificar as divergências de resultados em relação aos dados morfométricos de avestruzes.

O diâmetro maior dos eritrócitos dos avestruzes apresentou diferenças significativas em relação ao sexo e à idade. Avestruzes fêmeas apresentaram eritrócitos mais alongados do

que os machos, tendo sido observado que a média do diâmetro maior de machos com idade de treze até vinte e dois meses (15,68 μ m), foi significativamente inferior a todas as demais faixas etárias de ambos os sexos. Já os eritrócitos de fêmeas com vinte e dois meses ou mais, apresentaram os eritrócitos mais alongados (16,54 μ m). O diâmetro menor dos eritrócitos dos avestruzes apresentou também diferenças significativas, sendo maior nas fêmeas do que nos machos. Com o avanço da idade, diferentemente dos machos, as fêmeas revelaram uma elevação significativa do diâmetro menor dos eritrócitos. Eritrócitos mais largos (maior diâmetro menor) foram observados em avestruzes fêmeas com mais de vinte e dois meses de idade (9,98 μ m), enquanto que, eritrócitos mais estreitos (9,20 μ m) ocorreram em machos com treze meses e menos de vinte e dois meses de idade. As diferenças de diâmetro dos eritrócitos quanto sexo e idade, embora estatisticamente significativos, não são passíveis de serem detectadas na avaliação microscópica de rotina. Entretanto, estas pequenas variações de diâmetro eritrocitário, quando considerado o número total de eritrócitos, certamente contribuem para diferenças significativas do hematócrito, VCM e CHCM quanto ao sexo e idade.

Conclui-se que os parâmetros eritrocitários de avestruzes da Região de São José do Rio Preto apresentam valores particulares, que diferem dos valores citados na literatura de outras aves criadas em diferentes condições geoclimáticas e de manejo. Foi possível confirmar a hipótese de que os parâmetros eritrocitários de avestruzes sofrem a influência do sexo e da faixa etária (fêmeas), sendo de fundamental importância considerar esses fatores, com destaque quanto ao número de eritrócitos e a dosagem de hemoglobina, para adequada interpretação clínica do eritrograma.

Agradecimentos: Médicos Veterinários Residentes do Laboratório Clínico Veterinário do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP – Campus de Araçatuba.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE AVESTRUZ DO BRASIL (ACAB). *Estrutiocultura*. São Paulo, Disponível em: <
<http://www.acab.org.br/?md=estatico&pag=estrutiocultura/index>>. Acesso em: 25 julho 2005.

BEN ROMDHANE, S.; ROMDANE, M. N.; MHIRI, S.; BEN MILED, M. A.; KORTAS, M. Les paramètres biochimiques et hématologiques chez l'autruche (*Struthio camelus*) dans un élevage tunisien. *Révue de Médecine Vétérinaire*, Toulouse. v. 3, n. 151, p. 231 – 238, 2000.

BOLSONI, O (Coord.) São José do Rio Preto: Secretaria Municipal de Planejamento e Gestão Estratégica. *Conjuntura econômica de São José do Rio Preto*. 2006. 94 p. Disponível em:
<<http://www.riopreto.sp.gov.br/externos/smplanejamento/conjunturaeconomica/2006.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2007.

DURGUN, Z.; KESKIN, E.; ÇÖL, E.; ATALAY, B. Selected haematological and biochemical values in ostrich chicks and grows. *Archiv fuer Gefluegelkunde*, Baskida, v. 69, n. 2, p. 62 – 66, 2005.

HATTING, J.; SMITH, E. M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflugers Archives*, Berlin, v. 363, n. 3, p. 267 - 269, 1976.

MUSHI, E. Z.; BINTA, G. M.; CHABO, R. G.; ISA, J. F. W.; KAPAATA, R. W. Selected hematologic values of farmed ostriches (*Struthio camelus*) in Botswana. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. Davis. v. 11, n. 4, p. 372 – 374, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Procedure for determining packed cell volume by the microhematocrit method; Approved standard - Third Edition, v. 20, n. 18, document H7-A3, Wayne, Pa, 2000. Disponível em: < <http://www.clsi.org/source/orders/free/h7-a3.pdf> >. Acesso em: 05 mai. 2007.

PALOMEQUE, J.; PINTÓ, D., VISCOR, G. Hematologic and blood chemistry values of the masai ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Wildlife Diseases*, Ames. v. 27, n. 1, p. 34 – 40, 1991.

RAUKAR, J.; SIMPRAGA, M. Haematological parameters in the blood of one day old ostriches. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, Raanana. v. 60, n. 4, p. 112 – 116, 2005.

THRALL, M.A. Hematology of birds. In:___ *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lea & Fabiger. cap. 17, p. 225-258, 2004.

Tabela 1 – Valores do eritrograma e morfometria dos eritrócitos de de avestruzes (*Struthio camelus*) criados em fazendas comerciais da região de São José do Rio Preto - São Paulo.
Resumo da análise estatística: Média $\pm$ Desvio-padrão e intervalo de confiança 95%.

Número de animais	57	40	35	35	40	33
Sexo	♀	♀	♀	♂	♂	♂
Idade (meses)	4 $\pm$ 13	13 $\pm$ 22	22 $\pm$ 30	4 $\pm$ 13	13 $\pm$ 22	22 $\pm$ 30
Eritrócitos ($\times 10^{12}/l$)	1,77 $\pm$ 0,35 a (1,68 - 1,89)	1,57 $\pm$ 0,21b (1,5 - 1,64)	1,58 $\pm$ 0,23b (1,5 - 1,66)	1,64 $\pm$ 0,39ab (1,5 - 1,78)	1,73 $\pm$ 0,28ab (1,64 - 1,82)	1,71 $\pm$ 0,26ab (1,62 - 1,8)
Hemoglobina (g/l)	95,86 $\pm$ 11,34a (92,8 - 98,8)	107,05 $\pm$ 12,07b (103,19 - 110,91)	109,7 $\pm$ 11,86bc (105,65 - 113,8)	100,32 $\pm$ 12,83ab (95,72 - 104,74)	103,55 $\pm$ 16,05abc (98,42 - 108,68)	107,64 $\pm$ 14,01b (102,42 - 112,61)
Hematócrito (l/l)	0,39 $\pm$ 0,03a (0,38 - 0,40)	0,40 $\pm$ 0,03a (0,39 - 0,41)	0,39 $\pm$ 0,03ab (0,38 - 0,40)	0,36 $\pm$ 0,03b (0,35 - 0,37)	0,38 $\pm$ 0,05ab (0,37 - 0,40)	0,39 $\pm$ 0,4ab (0,37 - 0,40)
VCM (fl)	227,7 $\pm$ 31,8ac (219,4 - 236)	261,7 $\pm$ 38,7b (249,3 - 274,1)	252,9 $\pm$ 39,3b (239,4 - 266,5)	234,4 $\pm$ 53,7c (216 - 252,9)	228,5 $\pm$ 37,7c (216,4 - 240,6)	233,9 $\pm$ 46,3c (217,5 - 250,4)
HCM (pg)	99,39 $\pm$ 9,64ac (92,83 - 105,95)	69,05 $\pm$ 11,46bc (65,38 - 72,72)	70,77 $\pm$ 12,51b (66,47 - 75,07)	64,64 $\pm$ 18,18c (58,39 - 70,89)	60,91 $\pm$ 13,04c (108,6 - 124,6)	64,19 $\pm$ 13,39bc (59,44 - 68,94)
CHCM (g/l)	243,1 $\pm$ 24,22a (236,68 - 248,54)	263,93 $\pm$ 23,57b (256,4 - 271,48)	279,76 $\pm$ 24,58b (271,32 - 288,22)	274,06 $\pm$ 31,31b (263,23 - 284,89)	267,12 $\pm$ 38,10b (254,94 - 279,31)	278,04 $\pm$ 49,30b (266,55 - 295,53)
Diâmetro maior (μm)	16,47 $\pm$ 1,03a (16,43 - 16,5)	16,27 $\pm$ 1,11b (16,23 - 16,3)	16,54 $\pm$ 1,17ac (16,48 - 16,6)	16,41 $\pm$ 1,08ad (16,43 - 16,5)	15,68 $\pm$ 1,24e (16,36 - 16,45)	16,0 $\pm$ 1,95e (15,9 - 16,05)
Diâmetro menor (μm)	9,75 $\pm$ 0,76a (9,72 - 9,77)	9,79 $\pm$ 0,79a (9,76 - 9,81)	9,98 $\pm$ 0,79b (9,93 - 10,02)	9,66 $\pm$ 0,75c (9,62 - 9,69)	9,20 $\pm$ 0,83d (9,16 - 9,23)	9,27 $\pm$ 1,90d (9,15 - 9,38)
Diâmetro maior/menor (μm)	1,70 $\pm$ 0,13a (1,69 - 1,70)	1,67 $\pm$ 0,14b (1,66 - 1,67)	1,67 $\pm$ 0,17c (1,66 - 1,67)	1,71 $\pm$ 0,14ad (1,70 - 1,71)	1,71 $\pm$ 0,15ad (1,70 - 1,71)	1,79 $\pm$ 0,38e (1,76 - 1,81)

* Letras não coincidentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

5 CONCLUSÃO

- a) A heparina (10U/mL sangue) preserva melhor a integridade e a morfometria dos eritrócitos do que o EDTA (2 mg/mL sangue), constituindo-se no anticoagulante mais adequado para avaliar as discrasias eritrocitárias dos avestruzes.
- b) Os parâmetros eritrocitários de avestruzes da Região de São José do Rio Preto diferem dos obtidos em outras condições geoclimáticas e de manejo.
- c) Os parâmetros eritrocitários de avestruzes sofrem a influência do sexo e da faixa etária (fêmeas), sendo importante considerar estes fatores principalmente quanto ao número de eritrócitos e a dosagem de hemoglobina para uma adequada interpretação clínica do eritrograma nesta espécie.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE AVESTRUZ DO BRASIL (ACAB). *Estrutociultura*. São Paulo, Disponível em: < <http://www.acab.org.br/?md=estatico&pag=estrutociultura/index> >. Acesso em: 25 jul. 2005.

BEN ROMDHANE, S.; ROMDANE, M. N.; MHIRI, S.; BEN MILED, M. A.; KORTAS, M. Les paramètres biochimiques et hématologiques chez l'autruche (*Struthio camelus*) dans un élevage tunisien. *Revue de Médecine Vétérinaire*, Toulouse, v. 3, n. 151, p. 231 – 238, 2000.

BLAXHALL, P. C. Error in haematocrit value produced by inadequate concentration of thilenediamine tetra-acetate. *Journal of Fish Biology*, London, v.5, n. 6, p. 767 - 769, 1973.

DEIN, F. J. *Clinical Avian Medicine and Surgery*. Philadelphia: C. J. Harrison and L. R. Harrison, 1986, pp 174 – 191.

DEOL, I.; HERNANDEZ, A. M.; PIERRE, R. V. Ethilenediaminetetraacetic acid – associated leukoagglutination. *American Journal of Cinical Pathology*, Philadelphia, v. 103, n. 3, p. 338 – 340, 1995.

DURGUN, Z.; KESKIN, E.; ÇÖL, E.; ATALAY, B. Selected haematological and biochemical values in ostrich chicks and growes. *Archiv fuer Gefluegelkunde*, Baskida, v. 69, n. 2, p. 62 – 66, 2005.

FOURIE, F. R. Effects of anticoagulants on the haematocrit, osmolarity and pH of avian blood. *Poultry Science*, Menasha, v. 56, n. 5, p. 1842 – 1846, 1977.

HATTING J.; SMITH E. M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflugers Archives*, Berlin, v. 363, n. 3, p. 267 - 269, 1976.

HAWKEY, C.; SAMOUR, J. H.; ASHTON, D. G.; HART, M. G.; CINDERY, R. N.; FINCH, J. M.; JONES, D. M. Normal and clinical hematology of captive cranes (gruiformes). *Avian Pathology*, London, v. 12, n. 1, p.73-84, 1983.

KELLY, M. P. Psittacine blood and hematology, In:___*Basics for the veterinary praticioner*, IVCVM, 1999. Disponível em: <
<http://www.vet.uga.edu/vpp/ivcvm/1999/phillips/index.php> >. Acesso em: 3 maio 2007.

LOMBARTS, A. J. P. F.; ZIJSTRA, J. J.; PETERS, R. H. M.; THOMASSON, C. G.; FRANCK, P. F. H. Accurate platelet counting in an insidious case of pseudothrombocytopenia. *Clinical and Chemical Laboratory Medicine*, Berlin, v. 37, n. 11 - 12, p. 1063 – 1066, 1999.

MUSHI, E. Z.; BINTA, G. M.; CHABO, R. G.; ISA, J. F. W.; KAPAATA, R. W. Selected hematologic values of farmed ostriches (*Struthio camelus*) in Botswana. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. Davis, v. 11, n. 4, p. 372 – 374, 1999.

PALOMEQUE, J.; PINTÓ, D.; VISCOR, G. Hematologic and blood chemistry values of the masai ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, v. 27, n. 1, p. 34 – 40, 1991.

PENNOCK, C. A; JONES, K. W. Effect of ethylene-diamine-tetracetic-acid (dipotassium salt) and heparin on the estimation of packed cell volume. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 19, n. 2, p. 196 – 199, 1966.

PINTERIC, L.; MANERY, J. F.; CHAUDRY, I. H.; MADALPALLIMATTAM, G. The effect of EDTA, cations, and various buffers on the morphology of erythrocyte membranes: an electron-microscopic study. *Blood*, Washington, v. 45, n. 5, p. 709 – 724, 1975.

RAUKAR, J.; SIMPRAGA, M. Haematological parameters in the blood of one day old ostriches. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, Raanana, v. 60, n. 4, p. 112 – 116, 2005.

SPINU, M.; SPINU, O.; DEGEN, A. A. Haematological and imunological variables in a domesticated and wild subspecies of ostrich (*Struthio camelus*). *British Poultry Science*, Edinburgh, v. 40, n. 5, p. 613 – 618, 1999.

STURKIE, P. D. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In:____ *Avian physiology*. New York: Springer-Verlag, 1976. p. 53-75.

THRALL, M.A. Hematology of birds. In:____ *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lea & Fabiger, 2004. Cap. 17, p. 225-258.

ANEXOS

ANEXO A – Normas para publicação da revista “Arquivos do Instituto Biológico.



NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A **Revista Arquivos do Instituto Biológico** aceita, para submissão, artigos originais de pesquisa científica em sanidade animal e vegetal voltados ao agronegócio e suas implicações no agroambiente, incluindo nesse escopo a qualidade e a segurança alimentar. Aceita, também, artigos sobre pragas sinantrópicas. Todos os trabalhos devem se enquadrar nas normas redatoriais.

Os trabalhos enviados para publicação deverão ser inéditos e destinados exclusivamente a esta Revista. A matéria publicada será de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Os trabalhos não aceitos para publicação serão comunicados aos autores pelo Comitê Editorial.

O Comitê Editorial fará análise dos trabalhos antes de submetê-los aos Consultores Científicos.

A publicação dos trabalhos dependerá da análise efetuada pelo Corpo de Consultores Científicos e da aprovação do Comitê Editorial.

Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

Serão considerados para publicação Artigos Científicos e Comunicações Científicas. Artigos de Revisão poderão ser aceitos a critério do Comitê Editorial.

A transcrição parcial ou total de trabalhos dos "Arquivos do Instituto Biológico" para outras revistas é permitida desde que citada a origem.

O original deve ser submetido apenas na forma eletrônica através do e-mail arquivos@biologico.sp.gov.br. O arquivo não deverá exceder 2Mb. No e-mail de encaminhamento deverá constar nome por extenso, endereço completo (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, endereço postal), endereço eletrônico e CPF de todos os autores.

Eventuais dúvidas podem ser encaminhadas ao editor da Revista "Arquivos do Instituto Biológico", Dra. Sílvia Regina Galleti, Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP - Fone: (11) 5087-1749 - E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br.

A versão imprensa da revista será publicada exclusivamente em preto e branco. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para consulta e download

gratuitos no site da revista (www.biologico.sp.gov.br/arquivos).

Taxa para publicação na revista "Arquivos do Instituto Biológico": estamos aguardando publicação no Diário Oficial do Estado. A taxa deverá ser de R\$ 25,00 (vinte e cinco reais) por página diagramada. Após o aceite do trabalho, comunicado pelo editor responsável, os autores deverão efetuar o depósito do valor correspondente à publicação em nome do Fundo de Despesa do Instituto Biológico (Banco Nossa Caixa, Agência 0374, Conta Corrente 13-000022-1). Enviar comprovante de depósito, via carta, fax ou e-mail, mencionando o número do trabalho, para o seguinte endereço: Revista "Arquivos do Instituto Biológico". Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP – Fax: (11) 5087-1790 – E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br

Forma de apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em sequência. As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página. O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo de revisão: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Comunicação científica: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, espanhol ou inglês. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

Título: embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

Endereço(s) do(s) autor(es): abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

Resumo: deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

Palavras-chave: abaixo do resumo e separado por um espaço. citar no máximo cinco

palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

Abstract: apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

Material e Métodos: apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

Resultados: apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

Tabelas e Figuras: incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada quando estiver entre parêntese - ex.: (Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

Agradecimentos: poderão ser incluídos a pessoas ou instituições.

Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (Junqueira, comunicação pessoal), (Junqueira, informação verbal). A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versalete, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores - LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE *et al.* (1990) ou (BESSE *et al.*, 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). Nas referências seguir as recomendações da Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); as referências deverão estar em ordem alfabética de primeiro autor e serem apresentadas em folha à parte. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.

Seguem exemplos que servirão de diretriz para a formatação e apresentação das referências:

a) Artigo de periódico

ANDRÉA, M.M. & PETTINELLI JÚNIOR, A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.67, n.2, p.223-228, 2000.

Suplemento ou número especial

HENNEN, J.F.; HENNEN, M.M.; FIGUEIREDO, M.B. Índice das ferrugens (Uredinales) do

Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.49, p.1-201, 1982. Suplemento 1.

b) Artigo de periódico em meio eletrônico

FELÍCIO, J.D.; SANTOS, R. da S.; GONÇALES, E. Componentes químicos de *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.47-50, 2001. Disponível em: <http://www.biologico.br/arquivos/v68_1/9>. Acesso em: 5 mar. 2002.

c) Dissertações, Teses e Trabalhos Acadêmicos

PERES, T.B. *Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do 14C-Paration Metílico*. 2000. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.

SIMONI, I.C. *Utilização de diferentes linhagens celulares para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa*. 2001. 77f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular - Área de Microbiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

AZEVEDO, L.A. *Produção gráfica: tecnologia, processos e aplicações*. 1989. 20f. Trabalho de Graduação (Disciplina Projeto de Produto IV) – Curso de Desenho Industrial, Setor de Ciências Humanas, Letras e Artes, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.

Obs.: A primeira data nas dissertações e teses corresponde ao ano de depósito e a segunda ao ano da defesa.

d) Dissertação/Tese, em meio eletrônico

BATISTA, A.S. *Saccharomices cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas*. 2001. 96p. Dissertação (Mestrado – Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 28 jun. 2005.

e) Livros no todo, folhetos etc.

BECKMANN, N. (Ed.). *Carbon-13 NMR spectroscopy of biological systems*. San Diego: Academic Press, 1995. 334p.

f) Livro em meio eletrônico

SULLIVAN, J.T. *Electronic atlas of parasitology*. New York: McGraw Hill, 2000. 1 CD-ROM.

g) Parte de livro (capítulo, trecho, fragmento etc.)

Capítulo ou parte sem autoria específica – autor da parte é o mesmo autor da obra

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: _____. *Molecular biology of the cell*. 3th.ed. New York: Garland Publications, 1994. 1294p. Chap. 19.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. *Controle microbiano dos insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-370.

Parte com autoria específica

BANIJAMALI, A. Thyroid function and thyroid drugs. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. (Eds). *Principles of medicinal chemistry*. 4th.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995. chap.30, p.688-704.

Sem autoria e título da parte

PUPO, N.I.H. *Pastagens e forrageiras: pragas, doenças, plantas invasoras e tóxicas, controles*. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1977. p.166-167.

h) Trabalhos apresentados em eventos (Congressos, Reuniões etc.)

ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B.; MATOS, M.F.; CHAGAS, C.M.A. Tobamovirus in commercial impatiens. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 7., 1994, São Lourenço, MG. *Resumos*. São Lourenço: 1994. p.14.

i) Trabalhos apresentados em eventos, divulgados em periódicos

RIVAS, E.B.; ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L.; GALLETI, S.R. Infecção natural de "dasheen mosaic virus" em *Dieffenbachia* sp. *Summa Phytopathologica*, v.24, n.1, p.71, 1998. Trabalho apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21., 1998, Botucatu. Resumos.

j) Trabalhos apresentados em eventos, divulgados em suplemento de revistas

BRAGGIO, M.M.; FÁVARO, O.C.N.; OLIVEIRA, M.M. Atividade antineoplásica da ficocianina. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.57, p.65, 1990. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 3, 1990, São Paulo. Resumo 096.

l) Trabalho apresentado em evento e divulgado em meio eletrônico

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPe, 4., 1996, Recife. Anais. Recife: UFPe, 1996. Disponível em: <<http://www.propes.ufpe.br/anais/educ/ceo4.htm>>. Acesso em: 21 jan. 1997.

GALLETI, S.R.; MIYAI, T.; DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B.; ALEXANDRE, M.A.V. Aspectos ultraestruturais dos mitocôndrios de *Eucharis* sp. (Amaryllidaceae) infectada por um Potyviridae. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, 2001. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo. Resumo 47. 1 CD_ROM.

MENDES, M.C.; BRAGGIO, M.M.; HARAGUCHI, M. Eficácia do extrato etanólico da leguminosa *Sesbania sesban* em fêmeas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, 2001. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo. Resumo 110. Disponível em: <http://www.biologico.br/arquivos/v68_suplemento/index.htm>. Acesso em: 24 mar. 2002.

m) Proceedings com título próprio e editoria

ARNASON, J.T.; MATA, R.; ROMEO J.T. (Eds.). *Phytochemistry of medicinal plants*. Proceedings of the 34th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America of Medicinal Plants, 1994, Mexico city, Mexico. New York: Plenum Press, 1995. 364p. (Recent Advances in Phytochemistry, 29)

n) Citação de citação (apud) (Menção a documento ao qual não se teve acesso direto, por inacessibilidade ou dificuldade de tradução)

TAKACS, A.P. & RAUSCHER, E. [Virus infection of potato tubers showing necrotizing rings.] Gyurusnekrozist mutato burgonyagumok virusfertozottsegenek vizsgalata. *Novenytermeles*, v.49, n.3, p.221-225, 2000. apud *CAB Abstracts* on CD-ROM, 2000/08-2002/01.

o) Trabalho no prelo (todos os dados devem estar presentes na referência)

ALMEIDA, M.M.G. O enfermeiro no planejamento familiar. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v.38, n.3, p.215-230, 1985. [No prelo].