

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

JÚLIO DE MESQUITA FILHO

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROTEINOGRAMA SÉRICO E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS DE PAPAGAIOS-VERDADEIRO
(*Amazona aestiva*) E ARARAS-CANINDÉ (*Ara ararauna*)
DE CATIVEIRO**

Laila Maftoum Proença

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro - 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

JÚLIO DE MESQUITA FILHO

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROTEINOGRAMA SÉRICO E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS DE PAPAGAIOS-VERDADEIRO
(*Amazona aestiva*) E ARARAS-CANINDÉ (*Ara ararauna*)
DE CATIVEIRO**

Laila Maftoum Proença

Orientador: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro - 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LAILA MAFTOUM PROENÇA – nascida em 09 de abril de 1981, em Brasília, DF, é Médica Veterinária formada pela União Pioneira de Integração Social – UPIS - Brasília, em agosto de 2004. Trabalhou como veterinária do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília no período de outubro de 2004 a dezembro de 2006. Concluiu mestrado em Biologia Animal, pela Universidade de Brasília em 2007. Ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, em nível de Doutorado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, em abril de 2007. Docente das disciplinas de Técnica Cirúrgica de Pequenos e Grandes Animais, Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas, como professora substituta, concursada, na Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, no ano de 2007. Realizou treinamento em análises hematológicas em aves silvestres no Laboratório Ambiental da ITAIPU Binacional em outubro de 2008, totalizando 40 horas. Acompanhou o serviço de clínica e cirurgia de animais exóticos da Universidade da Georgia, EUA, durante o período de outubro a dezembro de 2009, como veterinária visitante.

*Luana, Marie e Neto. A vocês, com todo meu amor, dedico mais essa etapa
concluída.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela confiança e orientação e principalmente pelo exemplo de humildade e respeito.

À Prof^a. Dr^a. Tânia de Freitas Raso, pelas amostras cedidas a esse estudo.

Aos funcionários Paulo César Silva e Renata Lemos Nagib Jorge e toda equipe do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias/ UNESP/ Câmpus de Jaboticabal, por auxiliarem na realização das análises protéicas e bioquímicas séricas.

À médica veterinária Denise Salgado, proprietária do Centro Integrado de Diagnósticos Veterinários – CID-Vet – Brasília – DF, pela estrutura cedida para as análises hematológicas.

À bióloga, Leonilda dos Santos Corrêa, do Laboratório Ambiental da ITAIPU Binacional, pelo exemplo, incentivo e treinamento em análises clínicas de aves silvestres.

Às alunas Stefanie Bertti Celho e Clarisse Machado, pelo auxílio na execução dos testes laboratoriais.

À Fundação Jardim Zoológico de Brasília, CETAS DF, IBAMA, APOENA, Chapada Imperial e seus respectivos funcionários e técnicos, por cederem os animais utilizados nesse estudo, viabilizando a colheita das amostras.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, UNESP, Jaboticabal, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida.

À minha família e amigos, pelo apoio, paciência e auxílio.

Ao Stephen, pelo amor, apoio, auxílio e compreensão. Obrigada.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Obtenção das amostras de sangue e soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) e araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>).....	16
4.2. Colheita, processamento e armazenamento das amostras de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) e araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>).....	18
4.3 Grupos experimentais.....	19
4.4 Análises laboratoriais.....	19
4.4.1 Local de realização dos exames laboratoriais.....	19
4.4.2 Hemograma.....	19
4.4.3 Perfil bioquímico sérico.....	20
4.4.4 Determinação do proteinograma sérico.....	20
4.5 Análises Estatísticas.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Hemograma.....	23
5.2 Perfil bioquímico sérico.....	26
5.3 Proteinograma sérico de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona</i>	

<i>aestiva</i>) e araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>), de cativoiro, adultos, clinicamente saudáveis.....	28
5.4 Proteinograma (SDS-PAGE) de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>C. psittaci</i>	31
5.5 Proteinograma (SDS-PAGE) de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) positivas ou negativas para <i>C. psittaci</i>	38
6. CONCLUSÕES.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Relação de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) previamente testados quanto à infecção por <i>C. psittaci</i> por meio da detecção de antígeno e anticorpo.....	17
Tabela 2.	Resultados dos testes de detecção de antígeno e de anticorpo em amostras de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) positivas ou negativas para <i>C. psittaci</i>	18
Tabela 3.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de parâmetros hematológicos de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) de cativoiro, clinicamente saudáveis.....	23
Tabela 4.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de parâmetros hematológicos de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) de cativoiro, clinicamente saudáveis.....	23
Tabela 5.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de componentes do soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) de cativoiro, clinicamente saudáveis.....	27
Tabela 6.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de componentes do soro sanguíneo de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) de cativoiro, clinicamente saudáveis.....	27
Tabela 7.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) de cativoiro, clinicamente saudáveis.....	29
Tabela 8.	Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) de cativoiro, clinicamente saudáveis.....	29

Tabela 9.	Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>Chlamydophila psittaci</i>	31
Tabela 10.	Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>Chlamydophila psittaci</i> e papagaios-verdadeiro clinicamente saudáveis.....	35
Tabela 11.	Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) positivas ou negativas para <i>Chlamydophila psittaci</i>	39
Tabela 12.	Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) positivas ou negativas para <i>Chlamydophila psittaci</i>	41

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) das proteínas de peso molecular 275 kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>Chlamydophila psittaci</i>	32
Figura 2.	Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) das proteínas imunoglobulina G (IgG), transferrina e albumina de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>Chlamydophila psittaci</i>	33
Figura 3.	Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de proteínas de pesos moleculares 275kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>Chlamydophila psittaci</i> e papagaios-verdadeiro clinicamente saudáveis.....	36
Figura 4.	Representação gráfica das concentrações séricas de proteína de peso molecular 23kDa, transferrina, albumina e imunoglobulina G (IgG) de papagaios-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) positivos ou negativos para <i>Chlamydophila psittaci</i> e papagaios-verdadeiro clinicamente saudáveis.	37
Figura 5.	Representação gráfica das concentrações séricas de (mg/dL) de proteínas de pesos moleculares 275kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de araras-canindé (<i>Ara ararauna</i>) positivas ou negativas para <i>Chlamydophila psittaci</i>	39

- Figura 6. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de transferrina, albumina e imunoglobulina G (IgG) de araras-canindé (*Ara araruna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci*..... 40
- Figura 7. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de proteínas de pesos moleculares 275kDa, 34 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de araras-canindé (*Ara araruna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci* e araras-canindé clinicamente saudáveis..... 42
- Figura 8. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de proteína de peso molecular 23kDa, transferrina, albumina e imunoglobulina G (IgG) de araras-canindé (*Ara araruna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci* e araras-canindé clinicamente saudáveis..... 43

PROTEINOGRAMA SÉRICO E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PAPAGAIOS-VERDADEIRO (*Amazona aestiva*) E ARARAS-CANINDÉ (*Ara ararauna*) DE CATIVEIRO

RESUMO – Os Psittaciformes representam uma das ordens de aves mais comumente criadas como animais de companhia. A identificação de doenças em aves de companhia pode representar um desafio diagnóstico. A carência de dados a respeito de perfis normais para psitacídeos, como hemograma e perfil bioquímico sérico, são notórias no país. Pesquisas dessa natureza podem contribuir no diagnóstico e prognóstico de importantes doenças de aves criadas em cativeiro e de vida livre, dentre elas a clamidiose, zoonose de alta prevalência e com diagnóstico definitivo relativamente difícil, devido à complexa fisiopatogenia da infecção causada por *Chlamydophila psittaci*. Este estudo objetivou a realização do hemograma e o perfil bioquímico, inclusive as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, clinicamente saudáveis e o proteinograma em SDS-PAGE de papagaios-verdadeiro e araras-canindé de cativeiro positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci*. Os valores hematológicos, incluindo o hemograma e bioquímica sérica, foram determinados para ambas as espécies, demonstrando estar entre os intervalos de referência para as mesmas. O proteinograma sérico em SDS-PAGE permitiu a detecção de até 33 proteínas no traçado eletroforético de papagaios-verdadeiro sadios, e até 29 proteínas no traçado eletroforético de araras-canindé sadias. O proteinograma permitiu visualizar diferenças biologicamente importantes nas concentrações das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de papagaios-verdadeiro e araras-canindé positivos e negativos para *C. psittaci*, principalmente quanto a evidência da proteína de peso molecular 21 kDa, presente somente em papagaios-verdadeiro positivos para clamidiose.

Palavras chave: *Amazona aestiva*, *Ara ararauna*, clamidiose, proteinograma, hemograma, bioquímica sérica.

**SERUM PROTEINOGRAM AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF CAPTIVE
BLUE FRONTED AMAZON PARROTS (*Amazona aestiva*) AND BLUE AND GOLD
MACAWS (*Ara ararauna*)**

SUMMARY – Psittaciformes represent one of the most common orders of birds bred as pets. Disease identification in birds can represent a diagnostic challenge. The lack of data about normal ranges for psittacines, like hemogram and serum biochemistry are notorious in this country. Research regarding this subject can contribute to the diagnosis and prognosis of important diseases in captive and free-range birds. One of these diseases is clamidiosis, a zoonotic disease with high prevalence and with definitive diagnosis relatively difficult, because of the complex fisiopatogeny of the infection caused by *Chlamydophila psittaci*. The objective of this study was to determine the hemogram and serum biochemistry, including serum acute phase proteins and imunoglobulins using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), of clinically healthy, adult, captive blue fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) and blue and gold macaws (*Ara ararauna*) and the SDS-PAGE proteinograma of blue fronted amazon parrots and blue and gold macaws testing positive and negative for clamidiosis. The hematological values, including hemogram and serum biochemistry, were determined for both species, showing to be between the normal reference ranges. The SDS-PAGE proteinogram allowed visualization of up to 33 proteins of healthy blue fronted amazon and up to 29 proteins of healthy blue and gold macaws. The proteinogram allowed visualization of important biological differences in the concentrations of acute phase proteins and imunoglobulins of blue fronted amazon parrots and blue and gold macaws, testing positive and negative for clamidiosis. Present only in parrots positive for clamidiosis was the molecular weight 21 kDa protein.

Keywords: *Amazona aestiva*, *Ara ararauna*, Clamidiosis, proteinogram, hemogram, serum biochemistry.

1. INTRODUÇÃO

Os Psittaciformes compõem uma das ordens de aves mais almejada como animais de companhia, pois oferecem atrativos como cor, beleza, interatividade e possuem a capacidade de “imitar” vozes humanas. Dentre os psitacídeos da fauna brasileira, o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e a arara-canindé (*Ara ararauna*) são aqueles mais comumente encontrados em cativeiro.

A identificação de doenças em aves de companhia pode representar um desafio diagnóstico. Veterinários usualmente recorrem ao uso de testes complementares para avaliarem o estado de saúde de seus pacientes. Para tanto, priorizar os testes diagnósticos com maior probabilidade em identificar o real estado de saúde e possíveis doenças em aves torna-se imperativo. A carência de dados a respeito de perfis normais para psitacídeos, como hemograma e perfil bioquímico sérico, são notórias no país.

Outro importante exame complementar, ainda subutilizado na medicina veterinária, é a avaliação da concentração das proteínas séricas, principalmente as proteínas de fase aguda e imunoglobulinas. A realização de estudos nessa área é imprescindível, uma vez que não há informação sobre valores de proteinograma, em especial de proteínas de fase aguda, obtido pela técnica SDS–PAGE, em aves de companhia. Pesquisas dessa natureza podem contribuir no diagnóstico e prognóstico de importantes doenças de aves criadas em cativeiro e de vida livre, dentre elas a clamidiose, zoonose de alta prevalência e com diagnóstico definitivo relativamente difícil, devido à complexa fisiopatogenia da infecção causada por *Chlamydophila psittaci*.

O presente estudo objetivou realizar o hemograma e o perfil bioquímico, inclusive as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, clinicamente saudáveis. Ademais, objetivou realizar o proteinograma sérico, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*) de

cativeiro, assintomáticos, previamente testados, positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci*.

Esse estudo foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO, sob número 17595-1, expedido em 26 de setembro de 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os Psittaciformes representam uma das ordens de aves mais frequentemente criada em cativeiro, no Brasil e no mundo. Suas cores e interatividade cativam e encantam, levando-os a ser um dos grupos da fauna silvestre mais sujeitos ao tráfico. Existem cerca de 78 gêneros e 332 espécies de Psittaciformes. Dessas, quase 80 ocorrem no Brasil, motivo pelo qual o país foi conhecido em sua descoberta como “Terra dos papagaios” (*Brasília sive terra papagallorum*) (COOLAR, 1997; SICK, 1997).

Dentre os psitacídeos, o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é uma das espécies mais utilizada como animal de estimação, principalmente pela sua capacidade de imitar vozes humanas. Está distribuído desde o noroeste do Brasil, sul do Paraguai, norte da Argentina e leste da Bolívia (FORSHAW, 1997).

As espécies do gênero *Ara*, dentre elas a arara-canindé (*Ara ararauna*), representam um dos maiores psitacídeos, medindo 50 a 90 cm de comprimento. As araras-canindé possuem plumagem verde, amarela, azul, branca e preta, cores representativas da bandeira brasileira. Ocorrem da América Central ao Brasil, à Bolívia e Paraguai (FORSHAW, 1997; SICK, 1997).

À semelhança do que acontece nas outras espécies animais, situações que favorecem o estresse e a consequente baixa de imunidade nas aves contribuem para a ocorrência de doenças infecciosas. No Brasil, problemas relacionados a manejo inadequado são notórios, como má nutrição e saneamento deficiente, superpopulação, comércio, tráfico e falha na quarentena; associados à exposição a microrganismos infecciosos podem favorecer o desenvolvimento de doenças nas aves (RASO et al., 2002; RASO, 2004).

A identificação de doenças em aves de companhia pode representar um desafio ao diagnóstico. As aves frequentemente mascaram os sinais clínicos das doenças, na tentativa de permanecerem visualmente saudáveis frente a potenciais predadores (POLO et al., 1998; BRISCOE et al., 2010). Veterinários usualmente recorrem ao uso de testes complementares para avaliarem o estado de saúde de seus pacientes. Para

tanto, priorizar os testes diagnósticos com maior probabilidade em identificar o real estado de saúde e possíveis doenças em aves torna-se imperativo. Outra consideração importante na escolha de testes complementares concerne à colheita de material biológico, principalmente amostras de sangue. O volume sanguíneo que pode ser coletado de uma ave é muitas vezes limitado, em função do tamanho do animal (BRISCOE et al., 2010).

O hemograma é o principal exame de triagem. Uma simples amostra sanguínea analisada em laboratório pode mostrar a situação de um indivíduo em determinado momento. O teste expressa características quantitativas e qualitativas dos diversos elementos celulares presentes no sangue (GOULART, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2007).

Assim como os exames de sangue total, os exames bioquímicos são comumente utilizados para avaliar a sanidade de animais. Diferenças anatômicas e fisiológicas das aves, em comparação com os mamíferos, implicam em avaliação e interpretação diferenciada desses testes nas aves (POLO et al., 1998; HARR, 2002).

A avaliação da função renal em aves baseia-se na dosagem das concentrações de ácido úrico e dos eletrólitos plasmáticos potássio, sódio e fósforo. As aves são uricotélicas e o produto final do metabolismo nitrogenado das proteínas é o ácido úrico. Entretanto, é necessário que aproximadamente 75% dos rins estejam lesionados para que os valores séricos de ácido úrico se elevem. Em aves com insuficiência renal grave, é possível notar elevação nos teores de potássio e fósforo, assim como redução na concentração de sódio (HOCHLEITHNER, 1994; PHALEN, 2000; CAMPBELL, 2004).

A creatinina não tem valor diagnóstico em aves e a uréia possui valor limitado em relação ao ácido úrico. Esse metabólito, entretanto, pode ser um indicador de azotemia pré-renal em algumas espécies, pois é excretado por meio de filtração glomerular, que depende do estado de hidratação da ave (HOCHLEITHNER, 1994; PHALEN, 2000; CAMPBELL, 2004).

Os testes enzimáticos empregados para avaliar a função hepática de mamíferos podem ser usados em aves. Entretanto, é preciso verificar a sensibilidade e a especificidade nas várias espécies (ALMOSNY & MONTEIRO, 2007). A enzima

aspartato aminotransferase (AST) tem elevada atividade no fígado de aves, mas também nos músculos, no cérebro e nos rins. A alanina aminotransferase (ALT), também uma enzima, não é específica em aves onívoras, podendo apresentar atividade mais elevada no fígado de aves carnívoras e piscívoras (HOCHLEITHNER, 1994; FUDGE, 2000; CAMPBELL, 2004). Assim como a ALT, a fosfatase alcalina (ALP) não é bom indicador de hepatopatias de aves, mas se eleva no caso de hiperparatireoidismo renal secundário e na consolidação de fraturas, em razão de sua atividade nos osteoblastos (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2004).

As concentrações séricas de colesterol se elevam na colestase, nas hepatopatias crônicas e no hipotireoidismo e se reduzem na doença hepática terminal. A creatinocinase (CK) é uma enzima específica para avaliação de lesão muscular e pode auxiliar na interpretação do aumento na concentração sérica de AST de origem hepática (HOCHLEITHNER, 1994; FUDGE, 2000, CAMPBELL, 2004). Os triglicerídeos representam a principal forma de estocagem de lipídeos no organismo e a avaliação de seus valores em aves tem sido insuficientemente pesquisada (HOCHLEITHNER, 1994).

A determinação da calcemia é utilizada no diagnóstico e no acompanhamento de animais com anormalidades no metabolismo de cálcio e fósforo. A fração metabolicamente ativa do cálcio sérico é o cálcio ionizado. Seus valores séricos pouco oscilam em função da concentração de proteínas (HOCHLEITHNER, 1994; FUDGE, 2000; CAMPBELL, 2004).

Na literatura nacional, as informações a respeito de valores hematológicos, inclusive bioquímicos, de aves de cativeiro são parcas. SANTOS (1999) relatou valores de referência para várias espécies de animais silvestres. GOULART (2006) descreveu os valores hematológicos de referência para *A. aestiva* de cativeiro. VALLE et al. (2008) avaliaram o perfil bioquímico de araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro no Rio Grande do Sul.

Grande parte dos estudos atualmente disponíveis, como aqueles de POLO et al. (1998), CAMPBELL (2000) e HARR (2002), que compilaram e avaliaram, dados hematológicos e bioquímicos de psitacídeos de cativeiro, têm origem no exterior, onde o clima e o manejo divergem, na maioria das vezes, daqueles do nosso país. A

escassez de dados clínicos e epidemiológicos e de exames complementares limita o diagnóstico de doenças em espécies de cativeiro (VALLE et al., 2008).

Outro importante exame complementar, ainda pouco utilizado em medicina veterinária, é a avaliação da concentração das proteínas séricas, principalmente as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas (BRISCOE et al., 2010). A primeira reação do organismo frente ao estresse imunológico é a resposta inespecífica de fase aguda, que precede as reações imunes específicas. A resposta de fase aguda é uma reação do organismo frente a anormalidades locais ou sistêmicas da homeostase, causadas por infecções, lesão tecidual, trauma, cirurgia, crescimento tumoral e doenças imunes. No local da invasão do microrganismo uma série de respostas se inicia, liberando citocinas pró-inflamatórias, que ativam o sistema vascular e as células inflamatórias (GRUYS et al., 2005).

A resposta de fase aguda é caracterizada por várias reações sistêmicas, que incluem febre, leucocitose, aumento da concentração sanguínea de cortisol, alterações metabólicas (lipólise, gliconeogênese, catabolismo protéico) e diminuição nas concentrações séricas de ferro e zinco. A resposta também inclui alterações nas concentrações de proteínas plasmáticas denominadas proteínas de fase aguda, cujos teores podem aumentar ou diminuir por isso, são conhecidas como proteínas de fase aguda positivas ou negativas, respectivamente. Isso ocorre na tentativa de proteger o organismo, restabelecendo a homeostase e prevenindo o crescimento bacteriano (KUSHNER & MACKIEWICZ, 1993; ECKERSALL, 1995).

Após um único estímulo inflamatório as concentrações séricas de algumas proteínas de fase aguda (PFAs) se elevam e decrescem rapidamente. Todavia, quando há um estímulo persistente os teores de PFAs podem permanecer altos e podem ser utilizados para fins de diagnóstico, inclusive como biomarcadores de determinada doença (GRUYS et al., 2005).

A resposta de fase aguda é muito rápida e desenvolve-se antes mesmo do estímulo imune específico e, em muitos casos, antes do início dos sinais clínicos, podendo ser considerada um marcador precoce para doença inflamatória (KUSHNER &

MACKIEWICZ, 1993; KAJIKAWA et al., 1999; PETERSEN et al., 2004; MURATA et al., 2004; CERÓN et al., 2005).

O fracionamento eletroforético é um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação das proteínas dos fluidos corporais (KANEKO et al., 1997). A eletroforese é uma técnica amplamente aplicada em medicina humana como teste auxiliar de diagnóstico; no entanto, em medicina veterinária começou apenas há pouco tempo a ser explorada em todo seu potencial, e ainda são poucos estudos relacionados às proteínas obtidas em gel de poliacrilamida (CRAY & TATUM, 1998).

Em aves, o proteinograma representa uma importante ferramenta na avaliação do estado de saúde de um indivíduo ou de populações; permite definir se a doença é aguda ou crônica e discernir se um paciente possui ou não uma doença inflamatória (ROSETHAL, 2000). A técnica mostra-se efetiva na definição de prognóstico e no acompanhamento e determinação da eficácia de tratamentos. Além disso, o proteinograma permite detectar enfermidades em aves, nem sempre passíveis de diagnóstico pelos testes bioquímicos séricos de rotina (CRAY & TATUM, 1998).

Apenas seis frações protéicas são reconhecidas no plasma de psitacídeos - pré-albumina, albumina, alfa1, alfa2, beta e gamaglobulina, em gel de agarose (CRAY & TATUM, 1998; CRAY et al., 2007). Diferenças no proteinograma de aves e mamíferos são notáveis. Na maioria dos mamíferos, a pré-albumina é inexistente. Em aves, os valores da pré-albumina variam de acordo com a espécie, podendo representar 10 a 75% do valor total de albumina, ou mesmo estar ausente. A transferrina, uma proteína de fase aguda negativa em mamíferos, reage como proteína positiva em aves (CRAY & TATUM, 1998; CRAY et al., 2007).

Alterações nos resultados do traçado eletroforético podem ser encontradas em aproximadamente 30% de aves aparentemente saudáveis, que mostram discreta ou nenhuma alteração em exames de rotina (CRAY apud CRAY & TATUM, 1998).

Há várias técnicas de fracionamento protéico. Os sistemas mais comuns utilizam como matriz filme de agarose ou fita de acetato de celulose, cujo valor diagnóstico é limitado, pois permite o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas (SANTANA et al., 2008).

GORDON (1995) indica o uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que possibilita a detecção de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, utilizando microquantidade de amostra (<25 µL). Não há relato de valores do proteinograma de aves obtido em SDS-PAGE. Estudos em outras espécies mostram resultados superiores desta técnica, quando comparada à técnica que emprega, como matriz, gel de agarose ou fita de acetato de celulose (SANTANA et al., 2008; FAGLIARI et al., 2008).

Vale ressaltar que a inexistência de valores de referência para aves dificulta a utilização do método como auxiliar no diagnóstico laboratorial de enfermidades. Pesquisas dessa natureza podem contribuir no diagnóstico e prognóstico de importantes doenças de aves criadas em cativeiro e de vida livre, dentre elas a clamidiose.

A clamidiose ou ornitose, causada pela bactéria *Chlamydophila psittaci*, é uma das principais doenças infecciosas que acomete as aves da Ordem Psittaciforme. KALETA & TADAY (2003) compilaram dados de *C. psittaci* em 460 espécies aviárias, e apontaram a ordem Psittaciforme com o maior percentual de espécies positivas (45%). Trata-se de uma das principais zoonoses aviárias, com ocorrência esporádica em humanos (RASO, 2004).

Em razão do contato cada vez mais próximo das aves com as pessoas, as doenças de caráter zoonótico desse grupo tornam-se cada vez mais preocupantes. TELFER et al. (2005) compilaram dados sobre o grupo de risco para a doença, que compreende pessoas com contato próximo com aves, como proprietários de aves de companhia, veterinários, funcionários de criadouros e abatedouros de aves e indivíduos que trabalham em lojas que comercializam aves. Estudo de RASO (2004) mostra o potencial zoonótico da doença em grupos de veterinários autônomos e funcionários de parques zoológicos, com resultados variando de 4,7% (17/365) a 23,8% (87/365) de pessoas sororreagentes ao agente.

De acordo com a *National Association of State Public Health Veterinarians* (NASPHV, 2010), nos Estados Unidos, 66 casos da doença foram registrados em

peessoas, de 2005 a 2009. Casos fatais ocorrem em até 25% dos pacientes não tratados e em menos de 1% dos pacientes tratados corretamente. A dificuldade e a demora em reconhecer e tratar a doença são considerados fatores de risco em pacientes humanos (MOSCHIONI et al., 2001; PETROVAY & BALLA, 2008; NASPHV, 2010).

A transmissão da *C. psittaci* às pessoas ocorre principalmente pela inalação do microrganismo presente em fezes secas ou em secreção respiratória de aves infectadas (NASPHV, 2010). A enfermidade em humanos é descrita como uma doença de início insidioso, com sintomas brandos e inespecíficos, assemelhando-se a infecções de vias aéreas superiores (MOSCHIONI et al., 2001).

No Brasil, poucos são os relatos de casos clínicos e estudos de clamidiose em aves. RASO (1999) e RASO (2002) ao estudar a doença entre aves do gênero *Amazona* de cativeiro no Brasil, revelou que 16,5 a 56,1% dos papagaios aparentemente saudáveis excretavam o microrganismo e apresentaram soropositividade variando de 60 a 100%. A autora relata ainda seus resultados de 6,3% (2/32) de amostras de ninhego de *A. aestiva* de vida-livre positivas para *C. psittaci* e 29,5% de psitacídeos de cativeiro positivos para o microrganismo. PROENÇA et al. (2010) descreve a prevalência de 32% (40/123) de clamidiose em aves de companhia atendidas no Distrito Federal, sendo que dessas, 87% (35/40) das aves eram calopsitas (*Nymphicus hollandicus*).

Agente etiológico da clamidiose em aves e de psitacose em humanos, a *Chlamydophila psittaci* é atualmente classificada como uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória (EVERETT et al., 1999; VANROMPAY, 2000; NASPHV, 2010).

A família Chlamydiaceae possui um ciclo de desenvolvimento bifásico único, caracterizado por três formas morfológicas distintas: corpo elementar (CE), corpo intermediário (CI) e corpo reticular (CR). O CE representa a forma infecciosa, extracelular. É pequeno (0,3 µm) e metabolicamente inativo. O CR (0,5 - 1,6 µm) é a forma intracelular, metabolicamente ativa e não infecciosa (MOULDER, 1991; ANDERSEN & VANROMPAY, 2003).

O ciclo de desenvolvimento inicia-se com a endocitose do CE pelas células eucarióticas. Os corpos elementares (CEs) permanecem no interior de inclusões intracitoplasmáticas, sofrem transformação para a forma ativa (CR) e se multiplicam por

divisão binária. Nesse momento passam por um processo de maturação para novos CE e são classificados como CI (0,3-1,0 μm). Após 24 – 48 horas novas formas infectantes (CEs) podem ser liberadas por ruptura celular e iniciam um novo ciclo em uma nova célula (MOULDER, 1991; ANDERSEN & VANROMPAY, 2003; LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Chlamydophila psittaci é cosmopolita. Acomete aves, mamíferos e répteis (EVERETT et al. 1999). Em aves, a transmissão ocorre principalmente por via aerógena, mediante a inalação de excretas secas e secreções nasal e ocular de aves infectadas. Outras vias de transmissão incluem ingestão de fezes contaminadas e por via oral quando os pais alimentam os filhotes no ninho (PAGE, 1959; ANDERSEN & VANROMPAY, 2003; RASO, 2004). Há evidências de transmissão vertical da bactéria pelo ovo e, menos frequentemente, por picada de insetos (VANROMPAY et al., 1995; SHEWEN, 1980). Várias espécies de aves de vida livre são fonte potencial de transmissão e seu contato com aves cativas deve ser evitado (PAGE & ERICKSON, 1969; RASO, 2004). Calopsitas são portadores frequentes de *C.psittaci* e podem excretar a bactéria por mais de um ano após a infecção ativa (GERLACH, 1994).

O período de incubação da clamidiose pode variar de dias a semanas, dependendo da espécie, da virulência do agente, da idade e da condição da ave. A doença clínica é induzida sob ação de fatores estressantes, associados ao manejo impróprio, como má nutrição, excesso populacional, transporte inadequado e remoção do habitat natural (FUDGE, 1996; RASO, 1999; NASPHV, 2010). Em estudo experimental com calopsitas, GUZMAN et al. (2010) detectaram o antígeno em animais infectados com a bactéria apenas no 16º dia após sua inoculação, período no qual surgiram os sinais clínicos. PAGE (1959), em estudo com perus infectados experimentalmente por meio de aerosol contaminado com *C. psittaci*, detectou a bactéria no sistema respiratório após 4 horas; no sangue, rins, fígado e baço após 48 horas; e nas fezes depois de 72 horas, com sinais clínicos aparentes apenas 5 a 10 dias após a infecção.

Os sinais clínicos podem ser agudos, subagudos, crônicos ou inaparentes, dependendo do estado imunológico da ave, da espécie hospedeira, da patogenicidade do microrganismo, do grau de exposição à bactéria, da porta de entrada e da presença

de outras doenças concomitantes. As formas subaguda ou crônica são típicas de espécies com baixa suscetibilidade ou infectadas com uma cepa de virulência moderada (GERLACH, 1994).

Os sinais da doença são inespecíficos e incluem depressão, plumagem eriçada, tremores, letargia, anorexia, desidratação, blefarite, ceratoconjuntivite, sinais respiratórios, digestórios, urinários, neurológicos, entre outros. Emaciação, desidratação, urato verde-amarelado (típico de envolvimento hepático) também podem ser notados. Conjuntivite, muitas vezes recorrente, pode ser em alguns casos o único sinal clínico aparente (GERLACH, 1994; GODOY, 2007; NASPHV, 2010).

A forma inaparente ou subclínica é caracterizada pela ausência de sinais clínicos evidentes, representando muitas vezes um desafio diagnóstico. É comum em aves adultas expostas a cepas de média e baixa virulência. Nesta condição as aves permanecem como portadoras, podendo eliminar o agente de forma intermitente (GERLACH, 1994).

A taxa de morbidade varia de acordo com a virulência da cepa envolvida, de 50 a 80% e de 5 a 20%, em cepas muito e pouco virulentas, respectivamente. O mesmo ocorre com a taxa de mortalidade, que pode variar de 10 a 30%, quando a cepa é muito virulenta, e de 1 a 4% no caso de cepa menos virulenta (ANDERSEN & VANROMPAY, 2003).

O diagnóstico de clamidiose em aves é dificultado pela ausência de sinais clínicos patognomônicos, os quais, associados aos exames complementares (radiológico, hematológico e bioquímico), são apenas sugestivos da doença (FUDGE, 1996; RASO, 2004). Porém um diagnóstico rápido e definitivo é necessário devido ao potencial zoonótico da infecção (LONGBOTTOM & COULTER, 2003). Aumento na contagem de leucócitos, alterações nas atividades de enzimas hepáticas, imagens radiográficas demonstrando aumento de fígado e baço, bem como alteração em sacos aéreos, são indicativos da infecção por *C. psittaci* (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

O isolamento da bactéria é o método recomendado para o diagnóstico de microrganismos da Família *Chlamydiaceae*. Em se tratando de uma bactéria intracelular obrigatória, há necessidade de cultivo celular. Técnicas que utilizam cultura em ovos

embrionados ou linhagens celulares são necessárias para avaliar a viabilidade da bactéria; ademais, facilitam sua posterior caracterização por meio de técnicas moleculares e bioquímicas. Porém, os cuidados referentes à coleta da amostra, a fim de evitar contaminações, e a necessidade de transporte adequado, somados à necessidade de laboratórios com biossegurança nível três para a manipulação da *C. psittaci*, dificultam a realização do procedimento na rotina clínica (LEY et al., 1993; FUDGE, 1996; SACHSE et al., 2009).

Em razão das dificuldades inerentes à cultura e ao isolamento do microrganismo, outras técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas. Há duas principais abordagens para o diagnóstico de uma infecção por *Chlamydophila* spp. A primeira envolve a detecção direta da bactéria e a segunda implica na detecção de anticorpos anti-*Chlamydophila* spp (SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010).

Os testes de detecção direta do microrganismo são testes rápidos e não necessitam de organismos viáveis. Entretanto, resultados falso-positivos podem ocorrer por reações cruzadas com outros agentes. Falso-negativos são possíveis quando a quantidade de antígeno é insuficiente ou no caso de excreção intermitente da bactéria. Os testes rotineiramente utilizados são ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de fluorescência direta (SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010).

O ELISA foi primeiramente desenvolvido para a detecção de *Chlamydia trachomatis* em humanos; no entanto, como se baseia no antígeno LPS da membrana clamidial, em teoria é também aplicável à infecção em animais. Os testes de fluorescência são baseados nos antígenos MOMP e LPS da membrana da bactéria e têm as mesmas vantagens e desvantagens citadas anteriormente (SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010).

O diagnóstico por detecção do DNA, através da PCR com sequências específicas, para detecção do agente etiológico, já está disponível em laboratórios especializados, apresentando alta sensibilidade e especificidade. Porém, a excreção intermitente do microrganismo pode prejudicar o emprego dos métodos de detecção, uma vez que a ave pode não estar eliminando o agente no momento da coleta, favorecendo a ocorrência de falso-negativos (RASO, 2004; GODOY, 2007).

O diagnóstico sorológico é um procedimento auxiliar aos testes de detecção de *Chlamydophila*. Os anticorpos anti-*C. psittaci* são regularmente produzidos pelo hospedeiro infectado, embora tenham pouco ou nenhum fator protetor, onde os CEs podem ser liberados mesmo na presença de alto título de anticorpos (RASO, 2004; NASPHV, 2010). Um resultado positivo é evidência de que a ave foi infectada com a bactéria em um dado momento, mas não indica, necessariamente, que a ave tenha uma infecção ativa (RASO, 2004; NASPHV, 2010). Resultados falso-negativos podem ocorrer em infecções agudas ou iniciais, em que ainda não houve tempo para soroconversão. Sorologia negativa pode, ainda, ser verificada em aves jovens ou com imunossupressão. Tratamentos com antimicrobianos podem diminuir a resposta imune. Vale ressaltar que o título de IgG pode permanecer elevado mesmo após tratamento bem sucedido (RASO, 2004; SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010).

A sorologia é mais segura quando associada ao histórico, sinais clínicos e exames complementares. Porém, é considerada diagnóstica quando a titulação encontra-se aumentada quatro vezes em amostras pareadas (com intervalo de duas a quatro semanas entre coletas) ou quando associada à presença do antígeno, mesmo em animais assintomáticos (NASPHV, 2010).

Os principais testes sorológicos para clamidiose incluem o teste de aglutinação dos corpos elementares, teste da imunofluorescência indireta, ELISA e teste de fixação do complemento direto e modificado. Este último é o teste sorológico padrão para *Chlamydophila*, sendo o modificado o mais sensível; porém, falso-negativos são descritos em algumas espécies de aves (ANDERSEN & VANROMPAY, 2003; RASO, 2004; SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010). No Brasil, não há disponibilidade de testes sorológicos no comércio.

O diagnóstico da clamidiose pode ser muito difícil, principalmente na ausência de sinais clínicos. O uso combinado de mais de uma técnica diagnóstica torna-se necessário, principalmente no exame de um único indivíduo (NASPHV, 2010). Outros métodos de auxílio diagnóstico para a clamidiose vêm sendo investigado e mostram-se bastante promissores. Dentre eles destaca-se a avaliação das proteínas de fase aguda (CRAY & TATUM, 1998).

CRAY & TATUM (1998) fazem alusão a estudos próprios, com o uso do proteinograma em aves com doenças infecciosas, e citam dados que mostram alterações únicas no proteinograma de psitacídeos positivos para clamidiose. Tais alterações são descritas como uma diminuição moderada a severa na concentração de albumina, moderado aumento de betaglobulina e um moderado a marcante aumento na fração gamaglobulina. Alterações no perfil eletroforético são descritas ainda em estudo de IVEY (2000) e CRAY et al. (2005) em aves positivas para aspergilose e sarcosporidiose, respectivamente, demonstrando a eficácia do uso da técnica em aves com doenças infecciosas. Estes autores não utilizaram a técnica SDS-PAGE, mas sim eletroforese em gel de agarose.

O proteinograma pode, ainda, auxiliar na interpretação de testes para diagnóstico de clamidiose. Na fase aguda da infecção (< duas semanas), o exame sorológico frequentemente é negativo, enquanto no proteinograma é possível notar alterações relevantes, em especial quanto às PFAs. O mesmo ocorre após o tratamento efetivo da infecção bacteriana, quando o resultado sorológico permanece positivo e o proteinograma se normaliza, em aves (CRAY & TATUM, 1998).

A realização de estudos nessa área é importante, uma vez que não há informação a respeito de valores de proteinograma, em especial de proteínas de fase aguda, obtido pela técnica SDS-PAGE, em aves de companhia. Pesquisas dessa natureza podem contribuir no diagnóstico e prognóstico de importantes doenças de aves criadas em cativeiro e de vida livre, dentre elas a clamidiose.

3. OBJETIVOS

3.1 Realizar o hemograma e o perfil bioquímico, inclusive as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, clinicamente saudáveis.

3.2 Realizar o proteinograma sérico, em especial as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro, assintomáticos, previamente testados, positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras de sangue e soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*)

Para a realização do hemograma e o perfil bioquímico, inclusive as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e de araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro, clinicamente saudáveis, foram utilizadas 51 amostras de sangue de papagaios-verdadeiro, e 52 amostras de sangue de araras-canindé.

Todos os animais eram adultos, provenientes de quatro criadouros distintos situados no Distrito Federal, Fundação Jardim Zoológico de Brasília, Centro de Triagem de Animais Silvestres, criatório comercial APOENA e o criatório conservacionista Chapada Imperial. As aves apresentavam aparência saudável e recebiam alimentação à base de ração extrusada ou peletizada para a espécie e mistura de sementes e frutas variadas. As colheitas de sangue foram realizadas nos meses de fevereiro e março de 2009

Para realização do proteinograma sérico de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro, assintomáticos, previamente testados, positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci*, foram utilizadas 24 amostras de soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro e dez amostras de soro de araras-canindé.

Todos os animais eram adultos, provenientes de cativeiro e assintomáticos para a doença. Estas amostras foram previamente colhidas, testadas, armazenadas (a -20°C) e gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Tânia de Freitas Raso, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram considerados positivos os indivíduos que apresentassem titulação elevada (no mínimo em quatro vezes) na pesquisa de anticorpos anti-*C. psittaci* e/ou que fossem positivos na pesquisa do agente etiológico (Tabelas 1 e 2).

Tabela1. Relação de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) previamente testados quanto à infecção por *C. psittaci* por meio da detecção de antígeno e anticorpo.

Amostra	Detecção de antígeno*	Detecção de anticorpo**
1	Positivo	Positivo
2	Negativo	Positivo
3	Positivo	Negativo
4	Negativo	Positivo
5	Positivo	Negativo
6	Positivo	Negativo
7	Positivo	Negativo
8	Positivo	Negativo
9	Positivo	Negativo
10	Negativo	Positivo
11	Positivo	Negativo
12	Negativo	Positivo
13	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo

* Teste de Imunofluorescência direta (IFD) ou Reação em cadeia pela polimerase (PCR).

** Teste Imunoenzimático (ELISA) ou Reação de Fixação de Complemento (RFC).

Tabela 2. Resultados dos testes de detecção de antígeno e de anticorpo em amostras de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas ou negativas para *C. psittaci*.

Amostra	Detecção de antígeno*	Detecção de anticorpo**
1	Positivo	Negativo
2	Positivo	Negativo
3	Negativo	Positivo
4	Positivo	Positivo
5	Negativo	Positivo
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo

* Teste de Imunofluorescência direta (IFD) ou Reação em cadeia pela polimerase (PCR).

** Teste Imunoenzimático (ELISA) ou Reação de Fixação de Complemento (RFC).

4.2. Colheita, processamento e armazenamento das amostras de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*)

Após contenção física das aves, foram colhidas amostras de sangue por meio de punção da veia jugular ou da veia braquial, em volume correspondente a, no máximo, 1% do peso do animal. Parte da amostra obtida (no mínimo 1 mL) foi armazenada em tubos contendo o anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e o restante armazenado em tubos sem anticoagulante. Esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas no momento da colheita e armazenados em recipiente apropriado para seu transporte. As amostras colhidas com e sem anticoagulante foram transportadas sob refrigeração até o laboratório. Ato contínuo, as amostras sem EDTA foram centrifugadas a 1.000 g durante 10 minutos, obtendo-se alíquotas de soro, as quais foram armazenadas em microtubos, previamente identificados, e congeladas à temperatura de -20°C. As amostras de sangue obtidas em frascos com EDTA foram mantidas refrigeradas até realização de hemograma.

4.3 Grupos experimentais

Grupo 1: 51 amostras de sangue de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) adultos, clinicamente saudáveis.

Grupo 2: 52 amostras de sangue de araras-canindé (*Ara ararauna*) adultas, clinicamente saudáveis.

Grupo 3: Doze amostras de soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*), adultos, positivos para *C. psittaci*.

Grupo 4: Doze amostras de soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*), adultos, negativos para *C. psittaci*.

Grupo 5: Cinco amostras de soro sanguíneo de araras-canindé (*Ara ararauna*), adultas, positivas para *C. psittaci*.

Grupo 6: Cinco amostras de soro sanguíneo de araras-canindé (*Ara ararauna*), adultas, negativas para *C. psittaci*.

4.4 Análises laboratoriais

4.4.1 Local de realização dos exames laboratoriais

Os hemogramas foram realizados no Centro Integrado de Diagnóstico Veterinário – CID Vet – Brasília, DF. As análises bioquímicas, inclusive o proteinograma sérico, foram realizadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP/Câmpus de Jaboticabal.

4.4.2 Hemograma

As amostras de sangue colhidas em frascos contendo o anticoagulante EDTA, foram submetidas às contagens de hemácias, em câmara de Neubauer, após diluição 1/200 em solução fisiológica. Foram contados 5/25 do milímetro central do retículo de Neubauer e o resultado final multiplicado por 10.000, expressando-se a contagem em número de hemácias/ μ L de sangue, conforme recomendação de SANTOS (1999). As

contagens de leucócitos também foram realizadas em câmara de Neubauer, após diluição de 1/20 em solução fisiológica acrescida de corante azul cresil brilhante⁶, na proporção de 50 µL de corante para 100 mL do diluente, segundo recomendação de SANTOS (1999). Foram contados os leucócitos contidos nos quatro milímetros angulares da câmara e o resultado final multiplicado por 50, expressando-se a contagem em número de leucócitos/µL de sangue. A partir do esfregaço sanguíneo, corado com o corante de Rosenfeld, obteve-se a contagem diferencial de leucócitos.

A concentração de hemoglobina foi obtida em espectrofotômetro semi-automático², empregando-se o método da cianometahemoglobina. O volume globular foi obtido pela técnica do microhematócrito, em microtubos de 50 µL submetidos à centrifugação a 13.000 g, durante 5 minutos.

Os índices hematimétricos foram obtidos a partir de equações matemáticas simples, com base nas contagens de hemácias, no volume globular ou hematócrito e na concentração de hemoglobina, de acordo com a recomendação de SANTOS (1999).

4.4.3 Perfil bioquímico sérico

As amostras de soro foram submetidas à determinação dos teores séricos de ácido úrico (método enzimático de Trinder), creatinina (método Labtest), ureia (método enzimático UV), colesterol e triglicerídeos (método enzimático de Trinder), cálcio total (método CPC), cálcio iônico⁷, sódio e potássio (método do íon seletivo), fósforo (método Daly e Ertingshausen modificado), e das atividades de aspartato aminotransferase (método cinético UV-IFCC), creatinocinase (método IFCC), fosfatase alcalina (método Bowers e Mc Comb modificado) e alanina aminotransferase (método cinético UV - IFCC).

4.4.4 Determinação do proteinograma sérico

O teor sérico de proteína total foi obtido pelo método do biureto, utilizando-se conjunto de reagentes comercial¹; a leitura do teste foi realizada em espectrofotômetro semi-automático².

1 – Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil

2 – Labquest, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil

6- Labor – Ribeirão Preto- SP

7- 9180 Electrolyte Analyzer, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

O fracionamento protéico foi obtido por meio da técnica de eletroforese recomendada por WEBER & OSBOURN (1969), em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel que serviu de matriz para a separação das proteínas foi preparado a partir da mistura de:

15,0 mL de água destilada estéril;

3,0 mL de tris-base³ 2M/glicina 1 M, pH 9,0;

7,5 mL de acrilamida a 40%;

1,5 mL de bis-acrilamida a 2%;

1,5 mL de glicerol;

0,6 mL de ácido acético etilenodiaminotetraacético 0,5 M, pH 8,3;

0,6 mL de dodecil sulfato de sódio.

A polimerização do gel deu-se pela adição de 15,0 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED) e 0,3 mL de persulfato de amônia 10%.

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado⁴, em contato com uma cuba superior contendo solução tampão com pH 8,5, constituída de 36,3 g de tris-base, 112,5 g de glicina, 10 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar 1 litro de solução. A parte superior da cuba foi preenchida com solução tampão com pH 8,5, constituída de 18,15 g de tris-base, 46,25 g de glicina, 10 g de SDS, em 1 litro de água destilada estéril.

A amostra para fracionamento protéico foi preparada utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo, diluídos em 40 µL de tampão fosfato (PBS) e 10 µL de gel mix. Uma alíquota de 5 µL dessa amostra foi depositada no gel e, então, submetida à corrente elétrica de 50 mA, em fonte apropriada⁴. Terminada a separação, a fonte elétrica foi imediatamente desligada e o gel retirado da placa para ser corado, durante 10 minutos, em 200 mL de solução de azul de comassie, consistindo de álcool metílico (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de comassie (0,25%). Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético glacial 7% para a retirada do excesso de corante, até que as frações apresentassem-se nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados mediante densitometria⁵. Para a identificação das

2 – Labquest, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil

3 – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

4- Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX-USA

5- Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

proteínas foram utilizados marcadores de amplo espectro de pesos moleculares, bem como as proteínas purificadas haptoglobina, transferina, antitripsina e ceruloplasmina.

4.5 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas dos resultados do hemograma e o perfil bioquímico, inclusive as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativo, clinicamente saudáveis, foi utilizado o programa *Statistical Analysis System* – SAS, obtendo-se média, desvio padrão, coeficiente de variação, valores máximo e mínimo e análise de variância. Constatando-se diferença as médias eram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Para as análises estatísticas dos resultados do proteinograma sérico, em especial as concentrações de imunoglobulinas e de proteínas de fase aguda, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativo, assintomáticos, previamente testados, positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci*, foi utilizado o programa estatístico R. Os resultados foram primeiramente normalizados, segundo DUNN & CLARK (2009), para identificação dos valores extremos (observações que tiveram seus valores menores que -2 ou maiores que 2 na normalização), os quais foram excluídos. Após a exclusão dos valores extremos, obteve-se média, valor mínimo e máximo de cada observação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Hemograma

Os resultados do hemograma de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, adultos, clinicamente saudáveis estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de parâmetros hematológicos de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) de cativeiro, clinicamente saudáveis.

Parâmetros	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Volume globular (%)	51	44,96±4,87	36	58
Hemoglobina (g/dL)	51	22,44±5,75	11	36,71
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	51	3,04±0,63	1,67	4,5
Leucócitos (x 10 ³ /μL)	51	9,32±6,28	1,25	35
Heterófilos (%)	51	46,86±20,40	5	87
Eosinófilos (%)	51	6,69±9,19	0	43
Linfócitos (%)	51	39,65±17,36	6	76
Monócitos (%)	51	4,88±4,83	0	19
Basófilos (%)	51	1,92±1,86	0	7
Heterófilos (/μL)	51	4.884±5.395	237	30.450
Eosinófilos (/μL)	51	652±1.065	0	6.235
Linfócitos (/μL)	51	3.150±1.810	525	7.215
Monócitos (/μL)	51	432±494	0	2.000
Basófilos (/μL)	51	198±299	0	1.400
CHCM (g/dL)	51	50,49±14,74	25,58	85,37
VCM (fl)	51	154±40,14	29,18	95,35
HCM (pg)	51	77,68±28,37	171	262

n - número de animais.

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média.

VCM – volume corpuscular médio.

HCM – hemoglobina corpuscular média.

DP – desvio padrão.

Tabela 4. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos de parâmetros hematológicos de araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro, clinicamente saudáveis.

Parâmetros	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Volume globular (%)	52	39,29±4,26	30	47
Hemoglobina (g/dL)	52	17,61±2,53	11,08	23,22
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	52	2,94±0,68	1,23	4,4
Leucócitos (x 10 ³ /μL)	52	8,17±4,61	2,75	27,75
Heterófilos (%)	52	51,87±14,21	14	87
Eosinófilos (%)	52	4,15±5,71	0	28
Linfócitos (%)	52	34,94±11,55	5	61
Monócitos (%)	52	5,48±4,87	0	22
Basófilos (%)	52	3,63±2,54	0	10
Heterófilos (/μL)	52	4.472±3.684	825	24.142
Eosinófilos (/μL)	52	253±291	0	1.275
Linfócitos (/μL)	52	2.692±1.560	537	7.650
Monócitos (/μL)	52	486±501	0	2.040
Basófilos (/μL)	52	274±232	0	967
CHCM (g/dL)	52	45,00±5,87	32,31	58,55
VCM (fl)	52	141±40,99	78,53	310
HCM (pg)	52	63,00±16,09	29,01	116

n - número de animais.

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média.

VCM – volume corpuscular médio.

HCM – hemoglobina corpuscular média.

DP – desvio padrão.

Em geral os valores obtidos no hemograma de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) situam-se nos intervalos de referência para espécie proposto por SANTOS (1999), com exceção aos valores de hemácias (1,25-2,23 x 10⁶/μL), hemoglobina (11,6-14,3 g/dL), CHCM (26-32 g/dL) e valores absolutos e relativos de eosinófilos (0%), basófilos (0%) e valor relativo de monócitos (0,5 %), os quais foram mais elevados no presente estudo. O valor de VCM (206-346 fL) foi menor neste estudo.

Vale ressaltar que os valores propostos pela autora basearam-se em um número amostral de apenas dez animais, submetidos ao mesmo manejo, todos oriundos do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, em Foz do Iguaçu, PR.

GOULART (2006), ao realizar estudo hematológico em 58 papagaios-verdadeiros de cativeiro, em Minas Gerais, constatou valores menores para contagem total de hemácias (2,09-2,99 x 10⁶/μL), teor de hemoglobina (15,15-17,41 g/dL), HCM (57,35-

73,65 pg), valor de CHCM (33,61-39,41 g/dL) e de contagens absolutas de eosinófilos (0-70/ μ L), monócitos (1-315/ μ L) e basófilos (80-117/ μ L), quando comparados aos valores demonstrados em nossa pesquisa.

Em comparação aos dados reunidos por GODOY (2007), que inclui literatura internacional, os valores de hemoglobina (11-17,6 g/dL), CHCM (22-35,8 g/dL), HCM (28-55 pg) e os valores relativos de eosinófilos (0-1%), monócitos (0-3%) e basófilos (0-1%) para papagaios-verdadeiro foram maiores no presente estudo, enquanto o valor relativo de heterófilos (55-80%) foi menor. Os valores absolutos dos diferentes tipos de leucócitos não são descritos pela autora e, portanto, não foi possível a comparação.

Com base nas informações compiladas por CAMPBELL (2000) os valores obtidos encontram-se dentro dos limites normais para a espécie, com exceção dos teores de hemoglobina (16-18,4 g/dL), do valor de CHCM (31,7-37,8 g/dL) e das contagens relativas de eosinófilos (0-1%), monócitos (1-3,1%) e basófilos (0-1%), os quais foram menores. Os valores de VCM (163-209 fL) e a contagem relativa de linfócitos (52,4-83,5%) mostraram-se menores no presente estudo. Valores absolutos dos diferentes tipos de leucócitos não foram relatados pela autora.

Em se tratando de valores de referência para o hemograma de araras-canindé (*Ara ararauna*), SANTOS (1999), utilizando amostras de 13 animais de cativeiro, descreveu valores para contagem total de hemácias ($1,76-2,66 \times 10^6/\mu$ L) e de leucócitos ($1,4-7,5 \times 10^3/\mu$ L), valor de CHCM (31-34 g/dL) e contagens absolutas de eosinófilos (0-38,2 / μ L), linfócitos (98-2.138/ μ L) e monócitos (0-94/ μ L) menores do que os resultados encontrados no presente estudo. Valores mais elevados para hematócrito (43-51%) e VCM (185-258 fL) são citados pela referida autora. Os valores absolutos e relativos de basófilos não são descritos no estudo.

Em comparação aos dados reunidos por GODOY (2007), os teores de hemoglobina (11-16 g/dL), o valor de CHCM (23-32 g/dL) e de HCM (27-53 pg) e as contagens relativas de eosinófilos (0-1%), monócitos (0-3%) e basófilos (0-1%) para araras-canindé foram maiores no presente estudo, enquanto os valores relativos de heterófilos (58-78%) foram menores. As contagens absolutas dos diferentes tipos de leucócitos não foram relatados pela autora.

Concentrações superiores para hemoglobina (11,7-17,0 g/dL), valor de CHCM (28,1-43,5 g/dL) e contagens relativas de monócitos (0-2%), basófilos (0-1,2%) e eosinófilos (0-2%) foram constatados neste estudo, quando comparados aos dados descritos por CAMPBELL (2000). Por outro lado, foram notados valores relativos inferiores de linfócitos (35,5-84,4%).

As concentrações de hemoglobina foram maiores quando comparadas com valores de outros trabalhos. Neste, os teores de hemoglobina foram obtidos empregando-se o método da cianometahemoglobina, que, de acordo com SANTOS (1999), pode apresentar resultados insatisfatórios devido à presença de hemácias nucleadas. Com isso, os resultados para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) podem ter sido influenciados pelo valor alterado da hemoglobina plasmática.

Diante do exposto é possível notar a grande variação nos intervalos de referência descritos para os valores hematológicos de papagaios-verdadeiros e araras-canindé nas diferentes fontes consultadas, inclusive em relação ao número amostral. Estudos nacionais utilizando animais da fauna brasileira, mantidos sob variáveis presentes no país, como temperatura, manejo nutricional e de cativeiro são escassos, e dificultam a interpretação e comparação dos resultados obtidos.

5.2 Perfil bioquímico sérico

As concentrações séricas de ácido úrico, creatinina, uréia, colesterol, triglicerídeos, cálcio total, cálcio iônico, sódio, potássio e fósforo e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST), creatinocinase (CK), fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) do soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, adultos, aparentemente saudáveis, são apresentadas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de componentes do soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) de cativeiro, clinicamente saudáveis.

Componente	Unidade	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
ALT	U/L	27	18,23±12,92	5,23	47,14
AST	U/L	39	260±165	0,00	853
Creatinina	mg/dL	23	0,21±0,11	0,10	0,50
ALP	U/L	38	135±135	8,29	530
Ureia	mg/dL	38	2,55±2,02	0,63	12,72
Colesterol	mg/dL	41	279±52,68	191	386
PT	mg/dL	41	3,36±0,66	1,78	5,20
CK	U/L	41	256±210	58,62	1.172
Cálcio	mg/dL	40	9,52±1,71	7,54	14,16
Fósforo	mg/dL	39	4,24±1,69	2,30	9,20
Sódio	mmol/L	38	150±7,68	112	163
Potássio	mmol/L	38	4,73±1,48	2,50	9,90
Ácido úrico	mg/dl	41	3,35±2,22	0,70	11,40
Triglicerídeos	mg/dl	40	163±60,05	62,36	323
Cálcio iônico	mmol/L	38	0,96±0,18	0,55	1,25

n - número de animais; ALT - alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; ALP – fosfatase alcalina; PT- proteína total; CK – creatinocinase; DP - desvio padrão.

Tabela 6. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações de componentes do soro sanguíneo de araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro, clinicamente saudáveis.

Componente	Unidade	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
ALT	U/L	37	11,2±9,6	2,2	36,7
AST	U/L	44	133±49,5	41,9	288,1
Creatinina	mg/dL	34	0,2±0,1	0,1	0,4
ALP	U/L	41	372±291	82,9	1.542
Ureia	mg/dL	42	2,7±1,5	0,6	6,9
Colesterol	mg/dL	42	198±39,7	95,8	285
PT	mg/dL	44	3,4±0,7	2,0	5,3
CK	U/L	44	203±234	39,1	1.404
Cálcio	mg/dL	43	10,0±1,3	6,9	14,6
Fósforo	mg/dL	42	5,6±1,7	3,0	11,1
Sódio	mmol/L	42	146±4,2	136	157
Potássio	mmol/L	42	4,6±1,0	2,3	6,9
Ácido úrico	mg/dl	44	3,2±2,6	0,7	13,1
Triglicerídeos	mg/dl	42	124±73,7	57,0	473
Cálcio iônico	mmol/L	42	0,8±0,2	0,4	1,1

n - número de animais; ALT - alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; ALP – fosfatase alcalina; PT- proteína total; CK – creatinocinase; DP – desvio padrão.

Os resultados dos valores bioquímicos apresentados nesse estudo encontram-se dentro dos intervalos normais de referência para papagaios-verdadeiros e araras-canindé mencionados na revisão realizada por GODOY (2007), exceto para os teores de ALT (5-11 U/L) e ALP (45-55 U/L) em papagaios-verdadeiro, mais elevados no presente estudo, e as concentrações de proteínas totais (4,3-5,6) em araras-canindé, com resultados menores. Entretanto, a autora não relata valores normais para ureia, fósforo, sódio, potássio, triglicerídeos e cálcio iônico.

Em comparação ao trabalho de VALLE et al. (2008), utilizando 24 araras-canindé de cativeiro adultas, notou-se diferença nas atividades séricas de AST (111,6-130 U/L), ALP (223,3-362 U/L) e cálcio (0,1-9,8 mg/dL), cujos valores foram maiores no presente estudo. A concentração de ureia (5-6,5 mg/dL) foi menor neste estudo. Os teores de ALT, creatinina, CK, sódio, potássio, triglicerídeos e cálcio iônico não foram descritos pelos autores.

SANTOS (1999) relatou apenas concentrações de cálcio e proteínas totais para papagaios-verdadeiro, e não descreve resultados bioquímicos para araras-canindé. Os valores descritos pela autora corroboram com os achados desse estudo.

Comparando os resultados aqui descritos com os dados compilados por FUDGE (2000) para papagaios-verdadeiro, nota-se valores divergentes somente para colesterol (100-270 mg/dL) e proteínas totais (3,5-6,5 mg/dL), maior e menor, respectivamente, em comparação ao presente estudo. Em relação às araras-canindé, os valores constatados em nosso estudo encontraram-se dentro dos intervalos de referência descritos pelo autor para a espécie. Os teores de ALT, creatinina, ALP, ureia, fósforo, sódio, potássio, triglicerídeos e cálcio iônico não foram descritos pelo autor.

5.3 Proteinograma sérico de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, adultos, clinicamente saudáveis

A análise densitométrica do proteinograma permitiu visualizar até 33 proteínas no soro de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e até 29 proteínas no soro de araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativeiro, adultos, clinicamente saudáveis. Em razão do

grande número de proteínas, optou-se pela análise das proteínas de interesse clínico, entre elas as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas.

Os valores dos proteinogramas, obtidos pela técnica SDS-PAGE, estão representados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) de cativeiro, clinicamente saudáveis.

Proteína	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Proteína de 275 kDa	44	10,47±9,08	0	38,66
IgA	44	51,22±45,28	2,87	249
Ceruloplasmina	44	80,98±69,06	3,09	302
Transferrina	44	118±41,79	26,79	213
Albumina	44	1.854±417	888	2.798
Haptoglobina	44	3,70±6,07	0	31,32
α ₁ -glicoproteína	44	16,52±36,56	0	194
Proteína de 34 kDa	44	7,48±24,00	0	148
Proteína de 23 kDa	44	555±200	15,64	1.057
Proteína de 21 kDa	44	5,65±20,34	0	111
IgG	44	408±430	13,38	2.139

n - número de animais.

DP – desvio padrão.

Tabela 8. Médias, desvio padrão e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de araras-canindé (*Ararauna*) de cativeiro, clinicamente saudáveis.

Proteína	n	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Proteína de 275 kDa	44	19,09±25,61	1,78	146
IgA	44	60,46±22,74	24,93	130
Ceruloplasmina	44	47,66±19,10	0	82,63
Transferrina	44	158±477	9,07	3.249
Albumina	44	2.406±661	116	3.804
Haptoglobina	44	2,26±9,82	0	47,55
α ₁ -glicoproteína	44	8,84±21,53	0	133
Proteína de 34 kDa	44	0,22±0,86	0	4,01
Proteína de 23 kDa	44	386±139	0	655
Proteína de 21 kDa	44	0,20±0,94	0	5,25
IgG	44	194±120	62,51	608

n - número de animais.

DP – desvio padrão.

O uso do proteinograma como ferramenta na avaliação do estado de saúde de um indivíduo ou de populações é descrito e notório (ROSETHAL, 2000; SANTANA et al., 2008). Porém, a utilização de sistemas comuns de fracionamento eletroforético, utilizando como matriz filme de agarose ou fita de acetato de celulose, limitam seu valor diagnóstico porque permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas (SANTANA et al., 2008).

Em aves, estudos conduzidos por CRAY e TATUM (1998) e CRAY ET al. (2007), utilizando técnicas convencionais de fracionamento eletroforético, demonstraram apenas seis frações protéicas no plasma de psitacídeos, sendo elas pré-albumina, albumina, α_1 , α_2 , beta e gamaglobulina.

No presente estudo, o uso da técnica de eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), proposta por GORDON (1995), possibilitou identificar até 33 proteínas no soro de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e até 29 proteínas no soro de araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativo, adultos, clinicamente saudáveis.

Dentre elas destacam-se onze proteínas de interesse clínico como as proteínas de fase aguda albumina, ceruloplasmina, haptoglobina, α_1 -glicoproteína, transferrina e as proteínas de peso moleculares 275 kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa, além das imunoglobulinas IgA e IgG.

Vale ressaltar, que além de utilizarem técnica eletroforética diferente da utilizada nesta pesquisa, os estudos de CRAY e TATUM (1998) e CRAY et al. (2007), utilizaram como amostra o plasma de psitacídeos, enquanto no presente estudo utilizou-se soro sanguíneo. Segundo os autores, há diferenças nos resultados do proteinograma utilizando plasma e soro, especialmente na fração betaglobulina, para onde normalmente ocorrer a migração do fibrinogênio.

O proteinograma mostrou-se uma técnica espécie específica, onde foram notórias as diferenças entre o proteinograma em SDS-PAGE de papagaios-verdadeiro e araras-canindé. Tais alterações concernem às diferenças nas concentrações séricas de albumina, ceruloplasmina, α_1 -glicoproteína, proteínas de pesos moleculares 275 kDa, 34 kDa e 21 kDa e de IgG. No soro de araras-canindé todas as proteínas supracitadas

encontraram-se em menor concentração, exceto a proteína de peso molecular 275 kDa, quando comparadas as proteínas séricas de papagaios-verdadeiro.

A inexistência de trabalhos utilizando a técnica de SDS-PAGE impossibilita a comparação de nossos dados a dados pré-existentes, ou a resultados de proteinograma utilizando técnicas eletroforéticas diferentes.

5.4 Proteinograma (SDS-PAGE) de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *C. psittaci*

A análise densitométrica do proteinograma permitiu visualizar até 27 proteínas no soro de papagaios-verdadeiro positivos para *C. psittaci* e, no máximo, 19 proteínas no soro de papagaios negativos para a bactéria. Em razão do grande número de proteínas, optou-se pela análise das proteínas de interesse clínico, entre elas as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas.

Os valores dos proteinogramas do soro sanguíneo de papagaios-verdadeiro positivos ou negativos para *C. psittaci* são apresentados na Tabela 9 e nas Figuras 1 e 2.

Tabela 9. Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *Chlamydothila psittaci*.

Proteína	Positivos	Negativos
Proteína de 275 kDa	11,44 (0-30,2)	7,38 (0-33,57)
IgA	15,66 (3,28-61,6)	15,42 (5,07-33,33)
Ceruloplasmina	15,07 (1,58-36,43)	18,38 (3,98-39,4)
Transferrina	357 (117-830)	385 (94,7-732)
Albumina	1.561 (746-2.688)	1.880 (1.372-2.234)
Haptoglobina	5,55 (0-18,18)	2,86 (0-19,74)
α_1 -glicoproteína	3,23 (0-13,33)	1,24 (0-10,26)
Proteína de 34 kDa	1,01 (0-4,16)	0,29 (0-3,49)
Proteína de 23 kDa	39,06 (2,7-194)	31,86 (0-185)
Proteína de 21 kDa	2,75 (0-11,92)	0
IgG	403 (70,29-938)	466 (196-1.232)

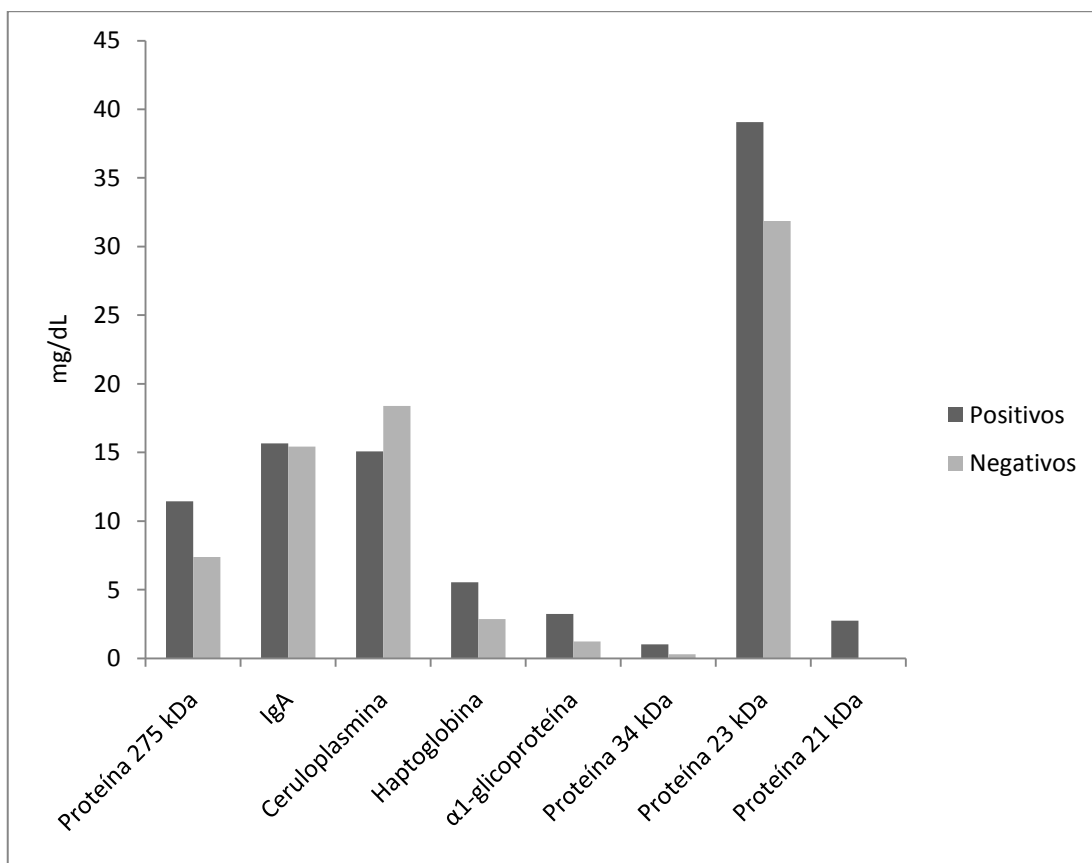


Figura 1. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) das proteínas de peso molecular 275 kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *Chlamydoiphila psittaci*.

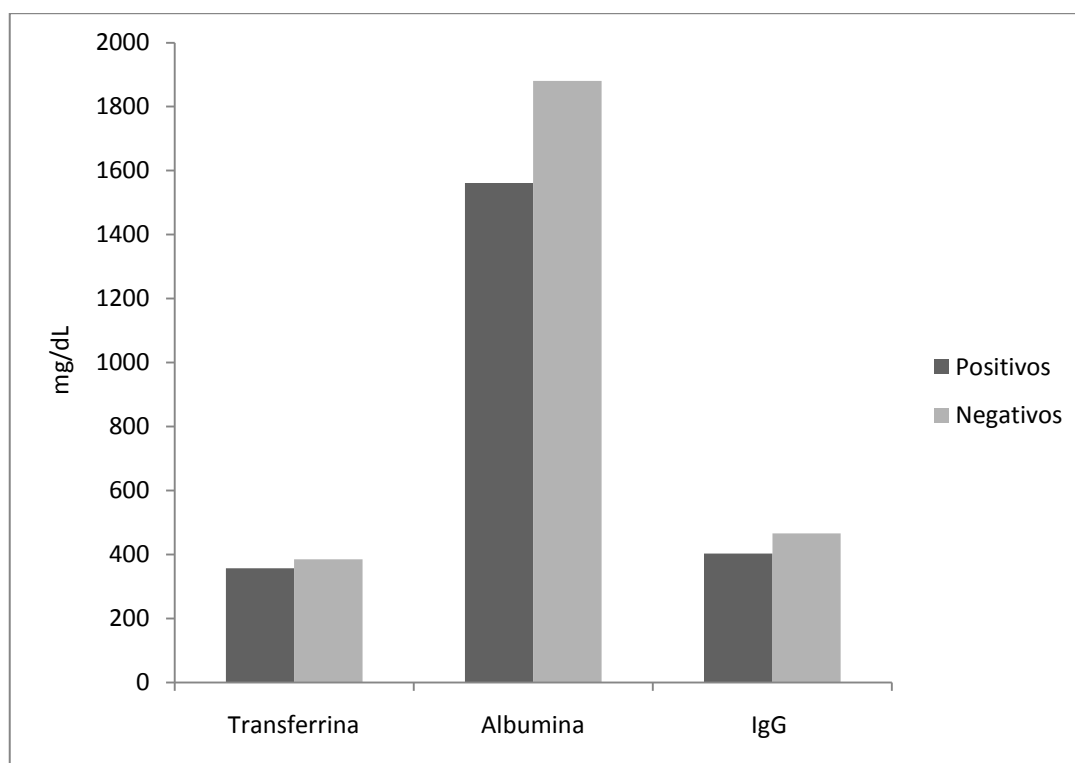


Figura 2. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) das proteínas imunoglobulina G (IgG), transferrina e albumina de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci*.

No proteinograma, observaram-se teores séricos elevados de haptoglobina, α_1 -glicoproteína e das proteínas de pesos moleculares 275 kDa, 34 kDa e 21 kDa no soro de animais positivos para *C. psittaci*, em comparação aos animais negativos para a bactéria. Vale ressaltar que apenas os papagaios positivos para *C. psittaci* apresentaram, em seu traçado densitométrico, a proteína de peso molecular 21 kDa, possivelmente importante indicador deste estado positivo.

MURATA et al. (2004) e CÉRON et al. (2005) descrevem as funções biológicas das proteínas de fase aguda haptoglobina e α_1 -glicoproteína e suas aplicações diagnósticas. De acordo com os autores, a haptoglobina inibe a atividade bacteriana e a avaliação de sua concentração sérica tem sido útil no diagnóstico de lesão tecidual e de infecções, na diferenciação de inflamações agudas e crônicas e na detecção de enfermidades subclínicas, corroborando com os achados descritos neste estudo, no

qual as aves eram positivas para *C. psittaci*, mas não apresentavam sinais clínicos da doença.

Segundo os trabalhos supracitados a α_1 -glicoproteína auxilia na manutenção da homeostase e atua como imunomodulador. Elevações nas concentrações de α_1 -glicoproteína têm sido observadas em galinhas infectadas com várias infecções virais e bacterianas, como no presente estudo onde as aves infectadas com a bactéria *C. psittaci* apresentaram valores mais elevados de α_1 -glicoproteína, em comparação as aves não infectadas.

As proteínas de peso moleculares 275 kDa e 34 kDa mostraram-se elevadas em papagaios positivos para *C. psittaci* quando comparadas aos animais negativos para a bactéria. Vale ressaltar que estudos utilizando a técnica SDS-PAGE são inexistentes na espécie, conseqüentemente tais proteínas ainda não haviam sido descritas. Em papagaios-verdadeiro, os teores séricos superiores dessas proteínas parecem ser importantes indicadores biológicos para a identificação de indivíduos positivos.

Também, a proteína de peso molecular 21 kDa mostrou potencial biomarcador para clamidiose em papagaios-verdadeiro, uma vez que foi constatada apenas no grupo de papagaios positivos para clamidiose. Pode, ainda, auxiliar na interpretação dos testes diagnósticos tradicionais para a doença, em situações onde o diagnóstico definitivo não seja possível.

Utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose, CRAY & TATUM (1998) descrevem alterações no proteinograma de uma cacatua sororreagente para clamidiose, com a forma aguda da doença. Tais alterações são descritas como uma diminuição moderada a severa na concentração de albumina, moderado aumento de betaglobulina e um moderado a marcante aumento na fração globulina.

Contudo, neste estudo não foi possível observar diferenças significativas nos valores de albumina, na fração betaglobulina, representada pela proteína transferrina e na fração globulina, representada pelos valores de IgG, entre os animais positivos e negativos para *C. psittaci*. Porém, vale ressaltar que os animais avaliados neste estudo pertenciam a outro gênero (*Amazona*), não apresentavam sinais clínicos para a doença

e a técnica para fracionamento eletroforético utilizada, SDS-PAGE, difere da técnica utilizada pelos referidos autores.

Os valores encontrados para as concentrações séricas das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de papagaios positivos e negativos para *C. psittaci*, foram ainda compilados de maneira a compará-los com os valores descritos para as aves do Grupo 1, os papagaios-verdadeiro tidos como clinicamente saudáveis (Tabela 10, Figuras 3 e 4).

Tabela 10. Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci* e papagaios-verdadeiro clinicamente saudáveis.

Proteína	Positivos	Negativos	Clinicamente saudáveis
Proteína de 275 kDa	11,44 (0-30,2)	7,38 (0-33,57)	10,47(0-38,66)
IgA	15,66 (3,28-61,6)	15,42 (5,07-33,33)	51,22(2,87-249)
Ceruloplasmina	15,07 (1,58-36,43)	18,38 (3,98-39,4)	80,98(3,09-302)
Transferrina	357 (117-830)	385 (94,7-732)	118(26,79-213)
Albumina	1.561 (746-2.688)	1.880 (1.372-2.234)	1.854(888-2.798)
Haptoglobina	5,55 (0-18,18)	2,86 (0-19,74)	3,70(0-31,32)
α_1 -glicoproteína	3,23 (0-13,33)	1,24 (0-10,26)	16,52(0-194)
Proteína de 34 kDa	1,01 (0-4,16)	0,29 (0-3,49)	7,48(0-148)
Proteína de 23 kDa	39,06 (2,7-194)	31,86 (0-185)	555(15,64-1.057)
Proteína de 21 kDa	2,75 (0-11,92)	0	5,65(0-111)
IgG	403 (70,29-938)	466 (196-1.232)	408(13,38-2.139)

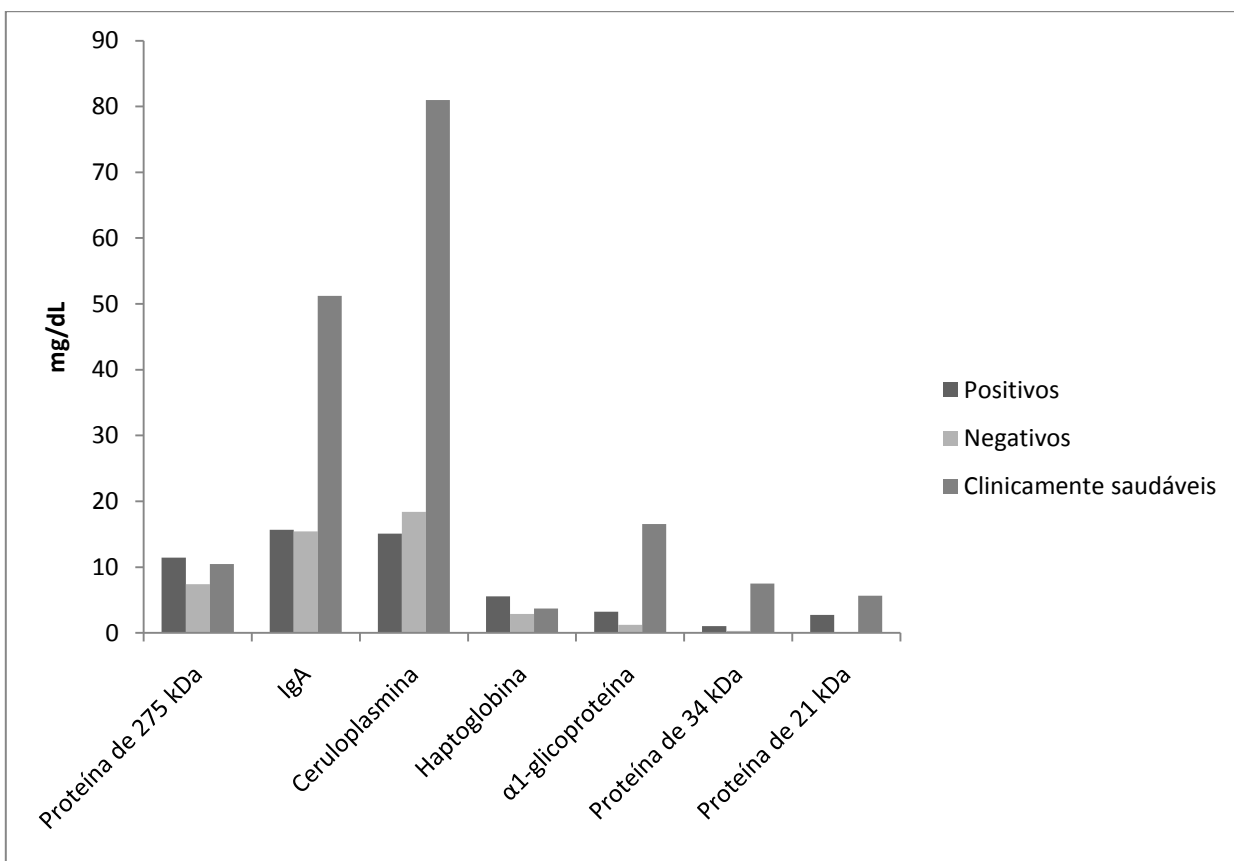


Figura 3. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de proteínas de pesos moleculares 275kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci* e papagaios-verdadeiro clinicamente saudáveis.

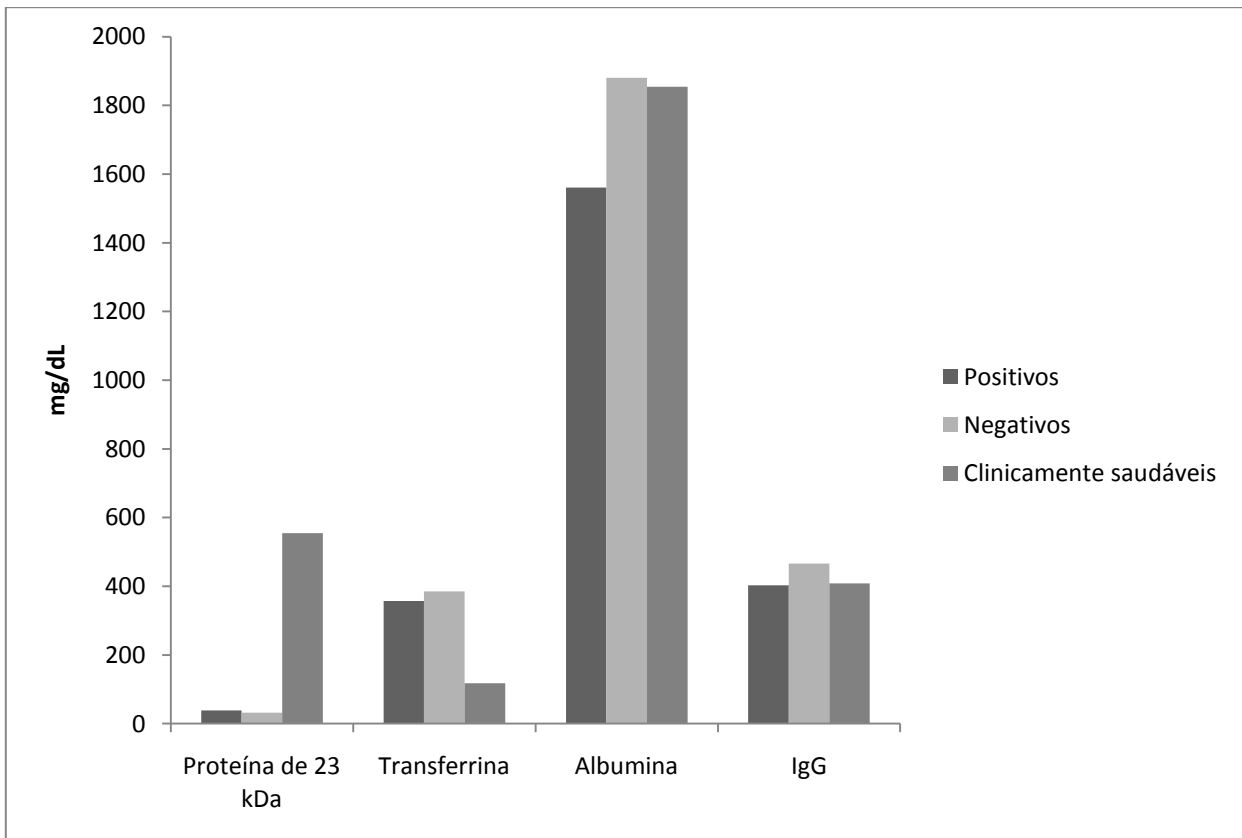


Figura 4. Representação gráfica das concentrações séricas de proteína de peso molecular 23kDa, transferrina, albumina e imunoglobulina G (IgG) de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) positivos ou negativos para *Chlamydophila psittaci* e papagaios-verdadeiro clinicamente saudáveis.

No proteinograma dos animais do Grupo 1, observaram-se teores séricos elevados de IgA, ceruloplasmina e da proteína de peso molecular 23 kDa, quando comparados aos Grupos 3 e 4, papagaios positivos e negativos para *C. psittaci*, respectivamente. Nestes grupos, 3 e 4, as concentrações séricas dessas proteínas, não apresentaram diferenças biologicamente importantes entre si.

As concentrações séricas de albumina e IgG foram semelhantes entre os três grupos. Apesar de apresentar diferença biologicamente significativa entre os Grupos 3 e 4, o valor médio de haptoglobina do Grupo 1 foi intermediário, quando comparado aos Grupos 3 e 4.

As proteínas de peso moleculares 21 kDa e 34 kDa e α_1 -glicoproteína mostraram-se significativamente mais elevadas no grupo dos papagaios tidos clinicamente saudáveis, em comparação aos Grupos 3 e 4. Vale ressaltar, no entanto, que os animais do Grupo 1 não foram testados quanto a presença de qualquer doença, inclusive a clamidiose. A classificação quanto ao estado de aparentemente saudável, deveu-se ao exame físico no momento da colheita das amostras.

Novas pesquisas para determinação de valores normais para as concentrações séricas de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas, utilizando a técnica de SDS-PAGE, são de suma importância para a validação dos resultados obtidos nesse estudo e estabelecimento de valores de referência para espécie em questão.

5.5 Proteinograma (SDS-PAGE) de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas ou negativas para *C. psittaci*

A análise densitométrica do proteinograma permitiu visualizar até 27 proteínas no soro de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas para *C. psittaci* e, no máximo, 24 proteínas no soro de araras-canindé negativas para *C. psittaci*. Em razão do grande número de proteínas, optou-se pela análise das proteínas de interesse clínico, entre elas as proteínas de fase aguda e as imunoglobulinas.

Os valores dos proteinogramas do soro sanguíneo de araras-canindé positivas ou negativas para *C. psittaci* são apresentados Tabela 11 e Figuras 5 e 6.

Tabela 11. Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci*.

Proteína	Positivas	Negativas
Proteína de 275 kDa	9,35 (6,8-11,42)	12,01 (10,36-13,95)
IgA	18,34 (6,32-33,39)	21,14 (17,4-25,05)
Ceruloplasmina	3,77 (2,27-4,64)	3,91 (2,56-5,69)
Transferrina	492 (242-637)	522 (392-682)
Albumina	2.181 (1.246-2.934)	2.816 (1.983-3.511)
Haptoglobina	16,77 (3,81-23,8)	13,81 (7,02-26,58)
α_1 -glicoproteína	10,41 (3,78-13,72)	10,54 (9,24-12,24)
Proteína de 34 kDa	4,19 (0-7,56)	1,31 (0-3,65)
Proteína de 23 kDa	11,31 (8,65-13,2)	11,33 (5,4-16,09)
Proteína de 21 kDa	7,30 (0-10,79)	6,84 (0-12,75)
IgG	220 (102-377)	257 (138-360)

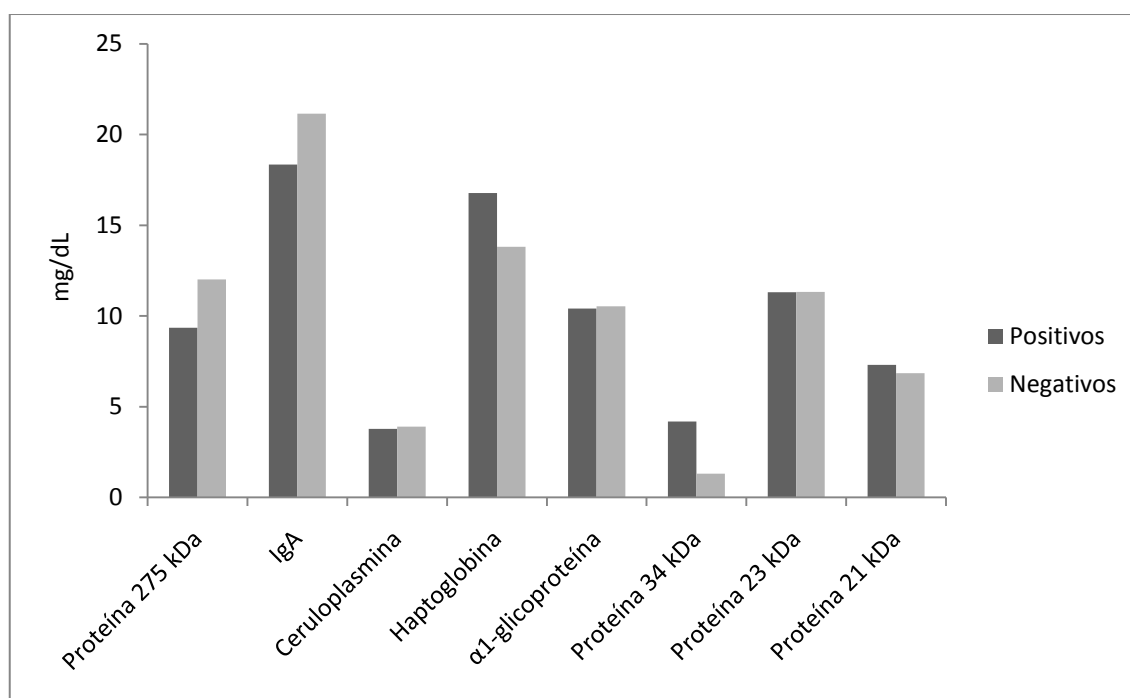


Figura 5. Representação gráfica das concentrações séricas de (mg/dL) de proteínas de pesos moleculares 275kDa, 34 kDa, 23 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci*.

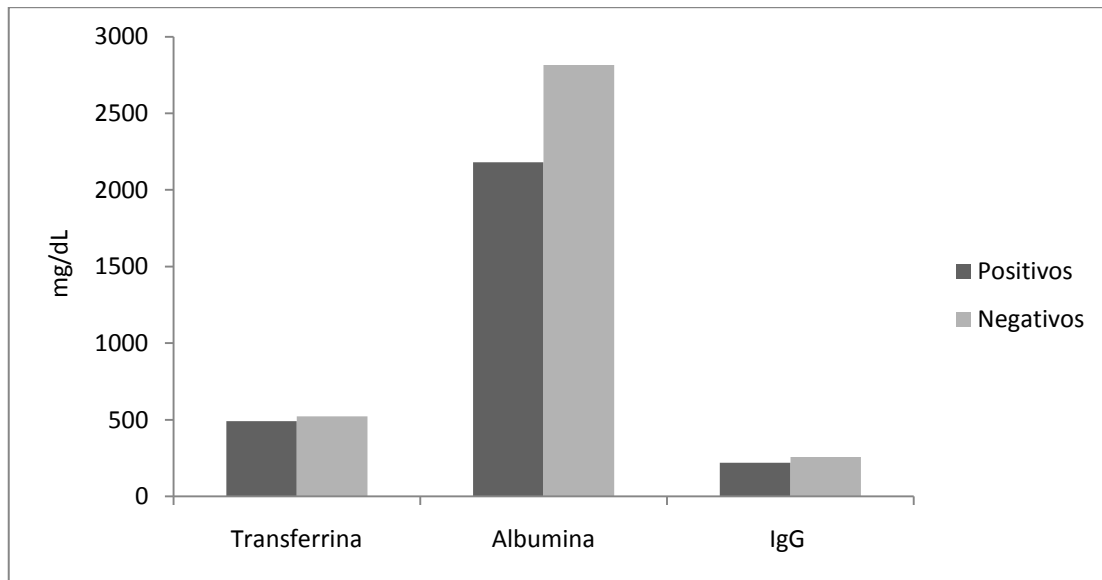


Figura 6. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de transferrina, albumina e imunoglobulina G (IgG) de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci*.

No proteinograma de araras-canindé positivas ou negativas para *C. psittaci*, observou-se teor sérico elevado da proteína de peso molecular 34 kDa no soro de animais positivos para *C. psittaci*, em comparação às aves negativas para a bactéria. Nessa espécie, a proteína de peso molecular 21 kDa foi evidenciada tanto nos indivíduos positivos quanto nos negativos para clamidiose, porém sem diferenças biologicamente importantes em suas concentrações. As demais alterações, notadas no traçado densitométrico de papagaios-verdadeiro positivos para clamidiose, não foram visibilizadas no proteinograma de araras-canindé positivas, sugerindo a especificidade do teste quanto à espécie.

As alterações sugeridas por CRAY & TATUM (1998) no proteinograma de uma cacatua positiva para clamidiose também não foram observadas no proteinograma de araras-canindé positivas para a doença. No entanto, assim como anteriormente citado, a espécie, técnica utilizada e forma de apresentação da doença são diferentes entre os estudos.

Os valores encontrados nesse estudo, para as concentrações séricas das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de araras positivas e negativas para *C. psittaci*, foram

ainda compilados de maneira a compará-los com os valores descritos para as aves do Grupo 2, os araras-canindé tidas como clinicamente saudáveis (Tabela 12, Figuras 7 e 8).

Tabela 12. Médias e valores mínimos e máximos das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) de araras-canindé (*Ara ararauna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci*.

Proteína	Positivas	Negativas	Clinicamente saudáveis
Proteína de 275 kDa	9,35 (6,8-11,42)	12,01 (10,36-13,95)	19,09(1,78-146)
IgA	18,34 (6,32–33,39)	21,14 (17,4-25,05)	60,46(24,93-130)
Ceruloplasmina	3,77 (2,27–4,64)	3,91 (2,56-5,69)	47,66(0-82,63)
Transferrina	492 (242–637)	522 (392-682)	158(9,07-3.249)
Albumina	2.181 (1.246-2.934)	2.816 (1.983-3.511)	2.406(116-3.804)
Haptoglobina	16,77 (3,81–23,8)	13,81 (7,02-26,58)	2,26(0-47,55)
α_1 -glicoproteína	10,41 (3,78–13,72)	10,54 (9,24-12,24)	8,84(0-133)
Proteína de 34 kDa	4,19 (0–7,56)	1,31 (0-3,65)	0,22(0-4,01)
Proteína de 23 kDa	11,31 (8,65–13,2)	11,33 (5,4-16,09)	386 (0-655)
Proteína de 21 kDa	7,30 (0–10,79)	6,84 (0-12,75)	0,20(0-5,25)
IgG	220 (102–377)	257 (138-360)	194(62,51-608)

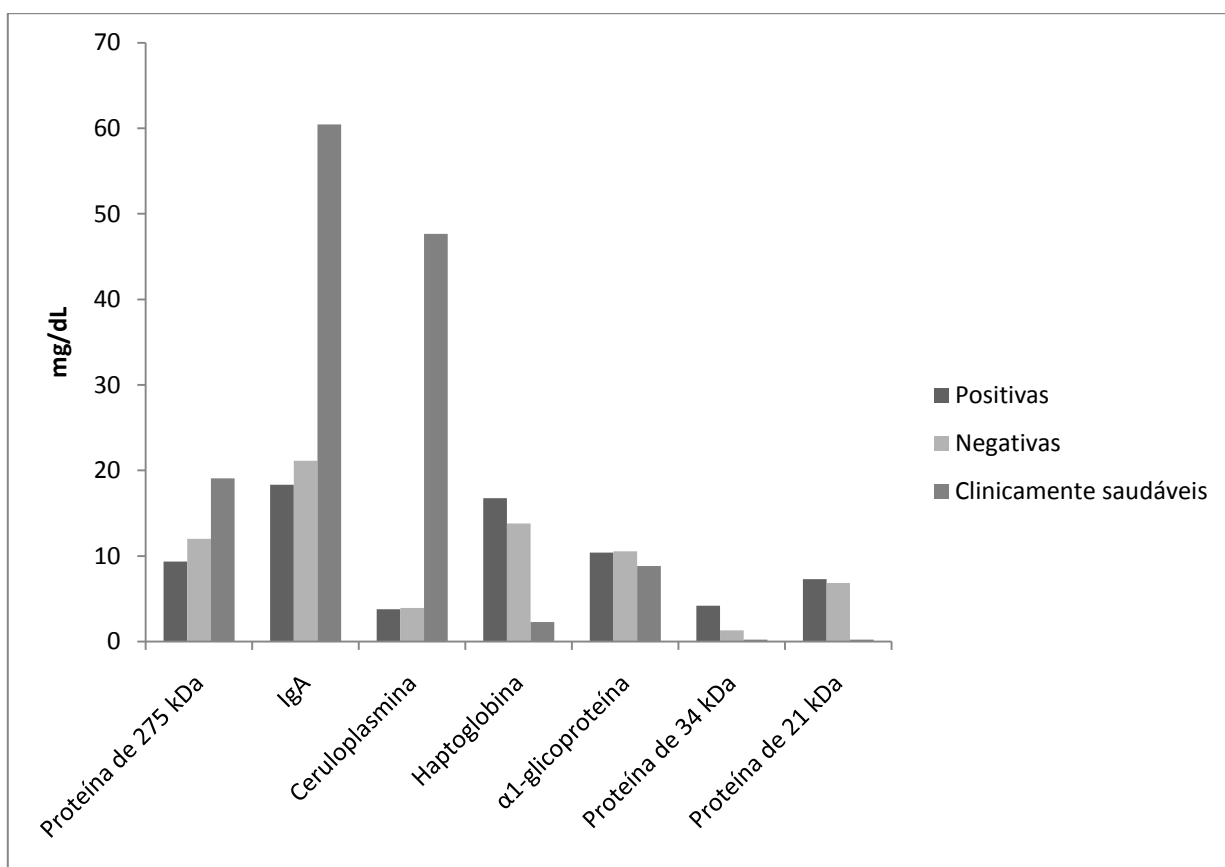


Figura 7. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de proteínas de pesos moleculares 275kDa, 34 kDa e 21 kDa e de imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, haptoglobina e α_1 -glicoproteína de araras-canindé (*Ara araruna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci* e araras-canindé clinicamente saudáveis.

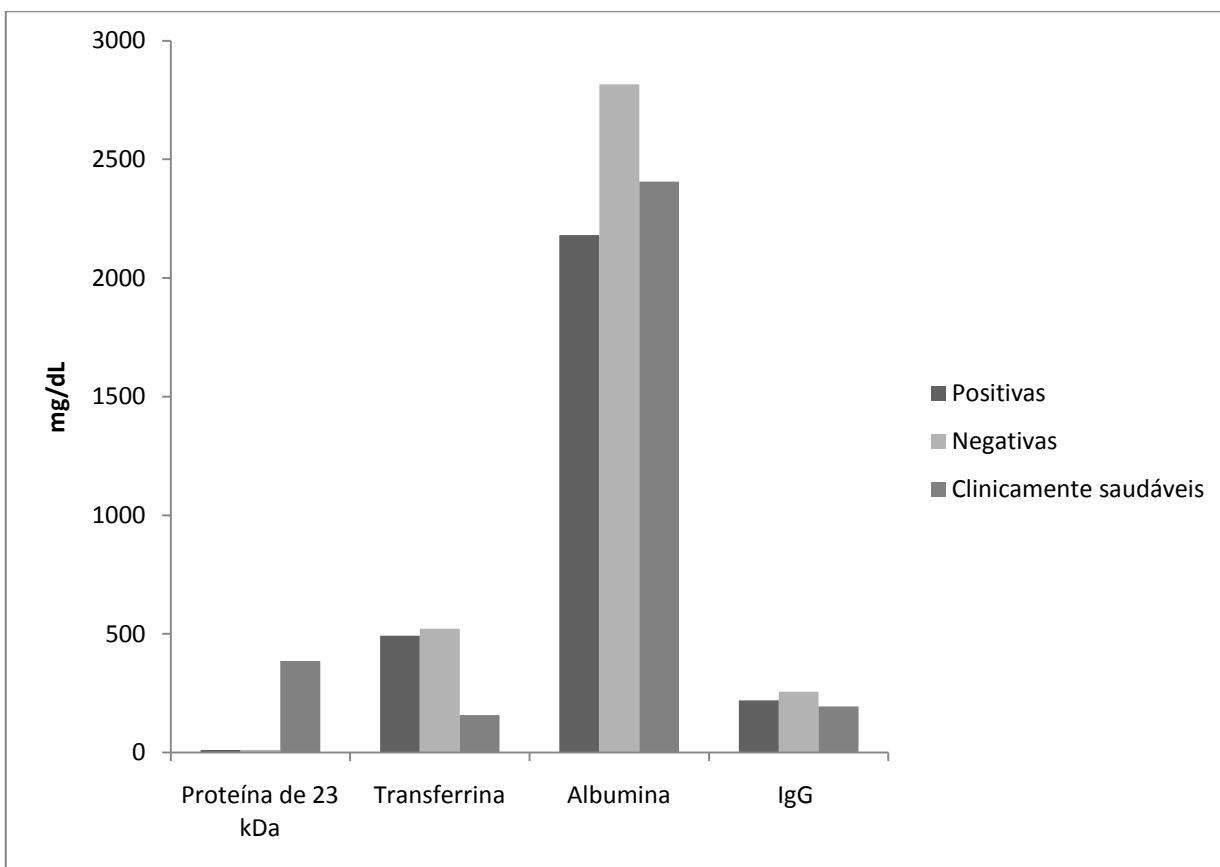


Figura 8. Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de proteína de peso molecular 23kDa, transferrina, albumina e imunoglobulina G (IgG) de araras-canindé (*Ara araruna*) positivas ou negativas para *Chlamydophila psittaci* e araras-canindé clinicamente saudáveis.

No proteinograma dos animais do Grupo 2, observaram-se teores séricos elevados de IgA, ceruloplasmina e da proteína de peso molecular 23 kDa e 275 kDa, quando comparados aos Grupos 5 e 6, araras positivas e negativas para *C. psittaci*, respectivamente. Nestes grupos, 5 e 6, as concentrações séricas dessas proteínas, não apresentaram diferenças biologicamente importantes entre si.

As concentrações séricas de albumina, IgG e α_1 -glicoproteína foram semelhantes entre os três grupos. Apesar de apresentar diferença biologicamente significativa entre os Grupos 5 e 6, o valor médio da proteína de 34 kDa do Grupo 2 foi significativamente menor, quando comparado aos Grupos 5 e 6.

As proteínas haptoglobina, transferrina e a proteína de peso moleculares 21 mostraram-se significativamente menores no grupo das araras tidas como clinicamente saudáveis, em comparação aos Grupos 5 e 6. Vale ressaltar, no entanto, que os animais do Grupo 2 não foram testados quanto a presença de qualquer doença, inclusive a clamidiose. A classificação quanto ao estado de aparentemente saudável, deveu-se ao exame físico no momento da colheita das amostras.

Novas pesquisas para determinação de valores normais para as concentrações séricas de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas, utilizando a técnica de SDS-PAGE, são de suma importância para a validação dos resultados obtidos nesse estudo e estabelecimento de valores de referência para a espécie em questão.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no hemograma e bioquímica sérica de papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*), de cativo, clinicamente saudáveis, situaram-se dentro dos intervalos de referência para espécie, citados na literatura nacional e internacional.

O proteinograma sérico obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) permitiu a detecção de até 33 proteínas no traçado eletroforético de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) sadios, e até 29 proteínas no traçado eletroforético de araras-canindé (*Ara ararauna*) sadias. No proteinograma sérico de papagaios-verdadeiro positivos para clamidiose foram constatadas até 27 proteínas no traçado eletroforético; vale ressaltar a constatação da proteína de peso molecular 21 kDa apenas no traçado de papagaios-verdadeiro positivos à doença, podendo esta ser considerada um biomarcador deste estado de positividade à clamidiose. No proteinograma sérico de araras-canindé positivas para clamidiose foram constatadas até 27 proteínas no traçado eletroforético.

7. REFERÊNCIAS

ALMOSNY, N. R. P & MONTEIRO, A. O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S. et al. **Tratado de animais selvagens. medicina veterinária**. São Paulo: Ed. Roca, 2007. p.939-966.

ANDERSEN, A. A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In : SAYF, Y. M. **Disease of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 863-879.

BRISCOE. J.A; ROSENTHAL, K.L.; SHOFER, F. S. Selected Complete Blood Count and Plasma Protein Electrophoresis Parameters in Pet Psittacine Birds Evaluated for Illness. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Washington, v. 24, p. 131-137, 2010.

CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M. A. et. al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Iowa: Ed. Blackwell Publishing, 2004. p. 479-492.

CAMPBELL, T. W. Normal Hematology of Psittacines. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Veterinary Hematology**. 5th ed. Iowa: Ed. Blackwell Publishing, 2000. p. 1155-1160.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 34, p. 85-99, 2005.

COOLAR, N. J. Family Psittacidae (parrots). In: DEL HOYO, J. et al. **Handbook of the Birds of the World**. Barcelona: lynx Press, 1997. v.4, p. 280-447.

CRAY, C. et al. Serologic Diagnosis of Sarcocystosis in Psittacine Birds: 16 cases. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Washington, v. 19, p. 208-215, 2005.

CRAY, C.; RODRIGUEZ, M.; ZAIAS, J. Protein electrophoresis of psittacine plasma. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 36 , n.1, p. 64-72, 2007.

CRAY, C.; TATUM, L. M. Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Washington, v. 12, p. 4-10, 1998.

DUNN, O. J.; CLARK, V. A. Measures of location and variability. In: DUNN, O. J. ; CLARK, V. A. **Basic statistics: a primer for the biomedical sciences**. 4th ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2009. p. 49-62.

ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. **Comparative Haematology International**, Harrow, v. 5, p. 93-97, 1995.

EVERETT, K. D.; BUSH, R. M.; ANDERSEN, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Smkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 49, p. 15-440, 1999.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; PEREIRA, G. T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.2, p. 322-328, 2008.

FORSHAW, J. M. **Parrots of the world**. New Jersey: T.F.H. Publications, 1997. 584p.

FUDGE, A. M. Avian Chlamydiosis. In: ROSSKOPE, W. J. **Diseases of cage and aviary birds**. Baltimore: Williams & Williams Press, 1996. p. 572-585.

FUDGE, A. M. Avian Liver and Gastrointestinal Testing. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p.47-55.

FUDGE, A. M. Avian Metabolic Disorders. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p.56-60.

FUDGE, A. M. Laboratory Reference Ranges for Selected Avian, Mammalian, and Reptilian Species. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 375-400.

GERLACH, H. *Chlamydia*. In: RICHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and application**. Gainesville: Wingers Publishing, 1994. p. 984-996.

GODOY, S. N. Psittaciformes (Araras, papagaios, periquito). In: CUBAS, Z. S. et al. **Tratado de animais selvagens. medicina veterinária**. São Paulo: Ed. Roca, 2007. p. 222-251.

GORDON, A. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: Elsevier Publisher Company, 1995. 213p.

GOULART, C. E. S. **Valores hematológicos de referência para papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva* – Psittacidae) mantidos em cativeiro**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J.; NIEWOLD, T. A. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 6B, p. 1045-1056, 2005.

GUZMAN, D. S.; DIAZ-FIGUEROA, O.; TULLY JR, T. Evaluating 21-day Doxycycline and Azithromycin Treatments for Experimental *Chlamydophila psittaci* Infection in Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Washington v. 24 , n., p. 35-45, 2010.

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

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RICHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and application**. Gainesville: Wingers Publishing, 1994. p. 223-245.

IVEY, E. S. Serologic and Plasma Protein Electrophoretic Findings in 7 Psittacine Birds With Aspergillosis. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Washington, v. 14, n.2, p. 103-106, 2000.

KAJIKAWA, T. et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha-1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induce inflammation and surgery. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 68, p. 91-98, 1999.

KALETA, E. F.; TADAY, M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. **Avian Pathology**, Berkshire, v. 32, n.5, p. 435-462, 2003.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRISS, M. C. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KUSHNER, I.; MACKIEWICZ, A. The acute phase response: an overview. In: MACKIEWICZ, A. et al. **Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications**. London: CRC Press, 1993. p. 3-19.

LEY, D. H.; FLAMMER, K.; COWEN, P.; WHITT, D. Performance characteristics of diagnostic testes for avian chlamydiosis. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, Weatherford, v. 7, p. 203-207, 1993.

Longbottom, D.; Coulter, L. J. Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications. **Journal of Comparative Pathology**, Amsterdam, v. 128, p. 217-244, 2003.

MOSCHIONI, C. et al. Pneumonia grave por *Chlamydia psittaci*. **Journal Pneumology**, São Paulo, v. 27, n.4, , p. 219-222, 2001.

MOULDER, J. W. Interaction of chlamidiae and host cells in vitro. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v. 55, p. 143-190, 1991.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 168, p. 28-40, 2004.

NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among Humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis)**. 2010. Disponível em: <<http://avma.org/pubhlth/psittacosis.asp..>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

OLSON, B. J.; TREUTING, W. L. An epidemic of a severe pneumonitis in the Bayou Region of Louisiana. IV. A preliminary note on cytology. **Public Health Report**, Louisiana, v. 59, p. 1299-1311, 1994.

PAGE, L. A. Experimental ornithosis in turkeys. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 3, p. 51-66, 1959.

PAGE, L. A.; ERICKSON, K. Serologic evidence of natural and experimental Transfers of *Chlamydia psittaci* between wild and domestic animals. **Proceedings Annual Conference - Bulletin Wildlife Disease Association**, Lawrence, v. 5, p. 284-290, 1969.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAAERD, P. M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, Santiago, v. 35, p. 163-1807, 2004.

- PETROVAY, F.; BALLA, E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydothra psittaci*. **Journal of Medical Microbiology**, Spencer Wood, v. 57, p. 1296-1298, 2008.
- PHALEN, D. N. Avian Renal Disorders. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 61-68.
- POLO, F. J. et al. Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. **Avian disease**, Jacksonville, v. 42, p. 523-535, 1998.
- PROENÇA, L. M et al. Estudo epidemiológico e avaliação de diferentes protocolos de tratamento para *Chlamydothra psittaci* em aves de companhia no Distrito Federal. **Anais do XIII Congresso da ABRAVAS**, Campos de Jordão, 2010. Disponível em: www.abravas.com.br. Acesso em 11 dez de 2010.
- RASO, T. F. **Avaliação da ocorrência de *Chlamydia psittaci* em papagaios do gênero *Amazona* mantidos em cativeiro**. 1999. 61f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.
- RASO, T. F. ***Chlamydothra psittaci* em psitacídeos de vida livre e cativeiro e suas implicações à saúde pública**. 2004. 79f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- RASO, T. F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PINTO, A. A. Evidence of *Chlamydothra psittaci* infection in captive amazon parrots in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Washington D.C., v. 32,n.2, p. 118-121, 2002.
- ROSETHAL, K. L. Avian protein disorders. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p. 171-184.
- SACHSE, K. et al. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 135, p. 2-21, 2009.
- SANTANA, A. M.; FAGLIARI, J. J.; CAMARGO, C. M. Proteinograma sérico de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) criados em cativeiro obtido por eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida (SDS PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, p. 1560-1563, 2008.
- SANTOS, L. C. **Laboratório ambiental**. Cascavel: Ed. Edunoeste, 1999. 323p.
- SHEWEN, P. E. Chlamydial infection in animals: a review. **Canadian Veterinary Journal**, Bethesda, v. 21, p. 2-11, 1980.

- SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 1997. p. 351-382.
- TELFER, B. L. et al. Probable Psittacosis Outbreak Linked to Wild Birds. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 1, n.3, p. 391-397, 2005.
- VALLE, S. F.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, R. A. Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Arara Canindé (*Ara ararauna*) saudáveis mantidas em criatório comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38 , n.3, p. 711-716, 2008.
- VANROMPAY, D. Avian Chlamydial Diagnostics. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p. 99-110.
- VANROMPAY, D.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Chlamydia psittacci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 45, p. 93-119, 1995.
- WEBER, K.; OSBOURNE, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. **Journal of Biologic Chemistry**, Bethesda, v. 244 , n.16, p. 4406-4412, 1969.