

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA MARA CORAIOLA

INDICADORES CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
TOXICOLÓGICOS NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-
MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) NO SUL DO BRASIL

CURITIBA

2012

ANGELA MARA CORAIOLA

INDICADORES CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
TOXICOLÓGICOS NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-
MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) NO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rosângela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “INDICADORES CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E TOXICOLÓGICOS NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (SPHENISCUS MAGELLANICUS) NO SUL DO BRASIL” apresentada pela Mestranda ANGELA MARA CORAIOLA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 28 de Março de 2012

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientador

Professora Dra. Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas
Membro

Professor Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani
Membro

*Dedico este trabalho às pessoas que
mais amo. Minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, o Ser Supremo a quem devo quem sou, onde estou e o que tenho.

À minha família, que está ao meu lado, aconteça o que acontecer. Meus pais, **José Alberto** e **Natalia**, meus ídolos, meu apoio, meu refúgio, as pessoas que seriam capazes de dar a vida por mim. E minha irmã, **Sheyla**, minha inspiração melhor amiga, alma-gêmea, quem está ao meu lado desde sempre e pra sempre. Amo vocês, obrigada por serem meu suporte maior.

À minha orientadora, **Prof. Rosangela**, por todo o conhecimento transmitido e pela real orientação desde os tempos da faculdade. Agradeço muito por todas as oportunidades ao seu lado, boa parte da profissional que sou se deve a você. Saiba que lhe admiro muito.

Ao meu co-orientador, **Paulinho**, que me inspirou a entrar no mundo da Medicina da Conservação, e quem primeiro ajudou nessa pesquisa, antes mesmo de a idéia existir. Obrigada por ser o amigo e exemplo de profissional que você é.

À minha co-orientadora, **Prof. Helena**, que me guiou pelo mundo da Toxicologia. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos e pela infinita paciência. A sua competência e dedicação são exemplos de vida.

Aos colegas e professores da **UFPR** que me ajudaram direta ou indiretamente durante esse período.

Ao **Prof. Ricardo Krul**, responsável pelo PROAMAR, que desde o início abriu as portas e contribuiu para o desenvolvimento do projeto. Obrigada pela oportunidade, pela amizade e pelos pinguins.

À **Cristiane Kolesnikovas**, veterinária do CETAS-SC, que “salvou” o projeto ao dispor os animais à avaliação. Obrigada pela ajuda durante o projeto e por ter aceitado fazer parte da banca. O seu trabalho é excepcional, admiro muito você.

A todos que ajudaram na contenção dos pinguins, em especial à **Elise** e à **Ana Luiza**. Obrigada pela disposição e força (muita força).

À **Cris**, do Laboratório de Toxicologia Ambiental, por ajudar nas análises das colinesterases, e ficar tão surpresa quanto eu com os resultados. Você foi essencial.

Ao pessoal da minha segunda casa, o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, em especial ao **Olaire**, pelas dosagens dos bioquímicos e por todas as

dicas e ajuda. E ao **Bruno** e à **Marília**, pela disposição e por todas as trocas de idéias. Muito obrigada pessoal, sentirei falta de vocês.

Às amigas do mestrado, **Ana Laura** e **Andréa** (da família Dittrich), **Michelly**, **Raquel**, **Suellen** e **Carol**. A amizade de vocês tornou o processo todo bem mais leve e divertido. Obrigada meninas.

Aos meus companheiros de quatro patas, **Grazi**, **Oliver**, **Amèlie**, **Luigi**, **Pitanga**, **Willy** e **Toddy**, pelas lambidas e amor incondicional.

E a todos os **Pinguins** que participaram desse estudo, mesmo demonstrando energicamente que não queriam. Graças a eles isso tudo foi possível.

*“Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é
Mas porque a amo, e amo-a por isso
Porque quem ama nunca sabe o que ama
Nem por que ama, nem o que é amar”*

(Alberto Caeiro)

RESUMO

Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) são frequentemente observados no litoral do sul do Brasil e Uruguai no inverno e geralmente chegam debilitados, muitas vezes contaminados por óleo. Existem poucos estudos incluindo hematologia, bioquímica sérica e toxicologia em pinguins-de-magalhães. Os exames hematológicos e bioquímicos fornecem informações para avaliação da saúde e diagnóstico de doenças nas aves. As colinesterases (ChE), que são tradicionalmente consideradas biomarcadores para organofosforados e carbamatos, podem ser utilizadas em casos de intoxicação por petróleo. O presente trabalho está dividido em três capítulos. O capítulo I descreve o estudo relacionado ao perfil hematológico, de proteína plasmática total e fibrinogênio de pinguins-de-magalhães no PROAMAR e no CETAS-SC. Foram avaliados 14 animais na pré e oito na pós-reabilitação no Paraná e 29 animais em Santa Catarina após a reabilitação. Antes da reabilitação observou-se anemia em 83% dos pinguins que foram a óbito e em 50% dos que sobreviveram e a relação heterófilos/linfócitos (H/L) foi de $3,87 \pm 0,57$ nos animais que foram a óbito, significativamente maior que a média de $2,20 \pm 0,30$ dos animais que sobreviveram, sendo esses dois parâmetros importantes na avaliação da saúde dos animais. No capítulo II está descrito o estudo da determinação dos níveis séricos de ácido úrico, uréia, proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, colesterol, γ -glutamyl transferase (GGT), aspartato amino transferase (AST), creatina quinase (CK), fosfatase alcalina (FA) e lactato desidrogenase (LDH). No Paraná, foram avaliados 10 pinguins na pré e sete na pós-reabilitação e em Santa Catarina, 29 animais após a reabilitação. Na pré-reabilitação os valores de uréia estavam elevados e os de proteínas totais reduzidos, o que indica desidratação e desnutrição, condição importante a ser monitorada. Os parâmetros hematológicos dos animais após a reabilitação e os bioquímicos dos animais do CETAS-SC foram semelhantes aos de outros animais da família Spheniscidae, podendo ser utilizados como valores de referência. O capítulo III aborda o estudo da determinação da atividade das ChE no músculo de pinguins-de-magalhães que vieram a óbito no PROAMAR. Foram avaliados 14 animais no ano de 2010 e seis em 2011, sendo que nenhum apresentava sinais externos de contaminação por óleo. Na musculatura desses animais, ocorreu a hidrólise dos três tipos de substratos (iodetos de acetiltiocolina, de propioniltiocolina e de butiriltiocolina), indicando a presença de acetilcolinesterase e de pseudocolinesterase. O escore corporal apresentou correlação negativa com as atividades enzimáticas. Para animais encontrados na costa paranaense sem sinais externos de contaminação por óleo, os valores obtidos no presente estudo podem servir como referência. Os resultados obtidos nesse estudo confirmam a importância da utilização dos exames laboratoriais durante o período de reabilitação de pinguins-de-magalhães no Brasil, sendo a desnutrição, a desidratação e o estresse os principais aspectos a serem considerados.

Palavras-chave: aves marinhas; bioquímicos; colinesterases; hemograma; pinguim.

ABSTRACT

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) are frequently observed on the coast of southern Brazil and Uruguay in the winter and usually arrive debilitated, many times contaminated by oil. There are few studies including hematology, serum biochemistry and toxicology of Magellanic penguins. The hematological and biochemical tests provide information about health and diagnosis of diseases in birds. The cholinesterase (ChE), which is traditionally regarded as biomarker for organophosphates and carbamates may be used in cases of oil intoxication. This work is divided into three chapters. Chapter I describes the study related to the hematologic, total plasma protein and fibrinogen profiles of Magellanic penguins in PROAMAR and CETAS-SC. 14 animals were evaluated in pre- and eight in post-rehabilitation in Parana and 29 animals in Santa Catarina after rehabilitation. Before rehabilitation anemia was observed in 83% of the penguins that died and 50% of those who survived, and the heterophil/lymphocyte ratio (H/L) was 3.87 ± 0.57 in animals that died, significantly higher than the average of 2.20 ± 0.30 of animals which survived, and these two parameters are important in the animal health evaluation. In Chapter II the study of the determination of serum uric acid, urea, total protein, albumin, globulin, glucose, cholesterol, γ -glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) is described. In Paraná, 10 penguins were evaluated in pre- and seven in post-rehabilitation, and in Santa Catarina, 29 animals after rehabilitation. In pre-rehabilitation the urea values were increased and the total protein were reduced, indicating dehydration and malnutrition, an important condition to be monitored. Hematologic parameters of the animals post-rehabilitation and the biochemical values of the animals of CETAS-SC were similar to those of other animals from Family Spheniscidae and can be used as reference values. Chapter III discusses the determining of the ChE activity in the muscle of Magellanic penguins that died in PROAMAR. 14 animals were evaluated in 2010 and six in 2011, and none showed external signs of oil contamination. In the muscles of these animals, the hydrolysis of the three substrates (acetylthiocholine, propionylthiocholine, and butyrylthiocholine, all as the iodides) had occurred, indicating the presence of acetylcholinesterase and pseudo cholinesterase. The body condition score was negatively correlated with enzyme activities. For animals found off the coast of Paraná with no external signs of oil contamination, the values obtained in this study can serve as a reference. This study results confirm the importance of the use of laboratory tests during the rehabilitation of Magellanic penguins in Brazil, with malnutrition, dehydration and stress the main issues to be considered.

Key-words: seabirds; biochemicals; cholinesterases; hemogram; penguin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E HEMATÓCRITO NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) NO PROAMAR.....	30
FIGURA 2 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT) NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) NO PROAMAR.....	30
FIGURA 3 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E RELAÇÃO H/L NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) NO PROAMAR.....	30
FIGURA 4 – MASSA CORPORAL NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) JOVENS E ADULTOS NO PARANÁ E EM SANTA CATARINA.....	54
FIGURA 5 – VALORES MÉDIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COLINESTERASES PARA OS DIFERENTES SUBSTRATOS EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) RECEBIDOS NO PROAMAR NOS ANOS DE 2010 (n=14) E 2011 (n=6).....	69
FIGURA 6 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE O SUBSTRATO AcSCh EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	70
FIGURA 7 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE O SUBSTRATO BuSCh EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	70
FIGURA 8 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE O SUBSTRATO PrSCh EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO, ESCORE E MASSA CORPORAL NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) QUE VIERAM A ÓBITO E QUE SOBREVIVERAM NO PROAMAR.	28
TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO E MASSA CORPORAL NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) RECEBIDOS NO PROAMAR.	29
TABELA 3 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO E MASSA CORPORAL NA PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) JOVENS E ADULTOS RECEBIDOS NO PROAMAR E NO CETAS-SC.	31
TABELA 4 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO E MASSA CORPORAL NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) QUE SOBREVIVERAM NO PROAMAR.	32
TABELA 5 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS DE BIOQUÍMICA SÉRICA NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) JOVENS E ADULTOS RECEBIDOS NO PROAMAR E NO CETAS-SC.	53
TABELA 6 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COLINESTERASES PARA DIFERENTES SUBSTRATOS EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) RECEBIDOS NO PROAMAR NOS ANOS DE 2010 E 2011.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	– Graus Celsius
µL	– microlitro
AChE	– Acetilcolinesterase
AcSCh	– Iodeto de acetiltiocolina
ANE/100	– Anormalidades nucleares eritrocitárias em 100 eritrócitos
AST	– Aspartato amino transferase
BChE	– Butirilcolinesterase
BuSCh	– Iodeto de butiriltiocolina
CEMAVE	– Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres
CETAS-SC	– Centro de Triagem de Animais Silvestres de Santa Catarina
ChE	– Colinesterase
CHGM	– Concentração de hemoglobina globular média
CK	– Creatina quinase
CRAM	– Centro de Reabilitação de Animais Marinhos
DTNB	– 5,5 - Ditio-bis-2-nitrobenzoato
FA	– Fosfatase alcalina
fL	– Fentolitro
g/dL	– Grama por decilitro
GGT	– γ-glutamil transferase
H/L	– Relação entre heterófilos e linfócitos
HPA	– Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IBAMA	– Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	– Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IFAW	– International Found for Animal Welfare
IUCN	– International Union for Conservation of Nature/União Internacional para a Conservação da Natureza
Kg	– Quilograma
LDH	– Lactato desidrogenase
M	– Molar
mg/dL	– Miligramas por decilitro
min	– Minuto
mL	– Mililitros
mM	– Milimolar
nmol	– Nanomol
PPT	– Proteína plasmática total
PROAMAR	– Projeto de Estudos e Recuperação de Aves, Mamíferos e Répteis
PrSCh	– Iodeto de propioniltiocolina
RPM	– Rotações por minuto
U/L	– Unidade por litro
VGM	– Volume globular médio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
CAPÍTULO I – PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL E FIBRINOGENIO EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 LOCAIS E ANIMAIS.....	24
2.2 EXAME FÍSICO E COLETA DE AMOSTRAS.....	26
2.3 EXAMES LABORATORIAIS	26
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
3 RESULTADOS.....	27
4 DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO II – PARÂMETROS CLÍNICOS E DE BIOQUÍMICA SÉRICA DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) PRÉ E PÓS- REABILITAÇÃO	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 LOCAIS E ANIMAIS.....	50
2.2 EXAME FÍSICO E COLETA DE AMOSTRAS.....	51
2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	52

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
3 RESULTADOS.....	52
4 DISCUSSÃO.....	54
5 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO III – COLINESTERASE MUSCULAR EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	63
RESUMO.....	63
ABSTRACT.....	64
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 LOCAL E ANIMAIS.....	67
2.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	67
2.3 ANÁLISE LABORATORIAL.....	67
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
3 RESULTADOS.....	68
4 DISCUSSÃO.....	71
5 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
CONCLUSÃO.....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO 1 – CERTIFICADO CONCEDIDO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA SCA DA UFPR.....	88
ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA CONCEDIDA PELO SISBIO/MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE.....	89
ANEXO 3 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PINGUINS-DE- MAGALHÃES.....	92

ANEXO 4 – VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA PINGUINS-DE-MAGALHÃES JOVENS E ADULTOS EM CATIVEIRO.....	95
ANEXO 5 – VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA PINGUINS-DE-MAGALHÃES JOVENS E ADULTOS EM CATIVEIRO.....	96
ANEXO 6 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COLINESTERASES PARA DIFERENTES SUBSTRATOS EM TECIDO MUSCULAR DOS INDIVÍDUOS DA ESPÉCIE <i>S. magellanicus</i> RECEBIDOS NO PROAMAR.....	97

INTRODUÇÃO GERAL

Os pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* – Forster, 1781) são aves pelágicas, totalmente adaptadas ao ambiente marinho. São exímios nadadores e podem permanecer no mar por meses, porém, como todas as aves, retornam a terra para postura e incubação de seus ovos, concentrando-se em extensas colônias (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006).

Pinguins possuem diversas adaptações para o nado e mergulho, como ossos densos e não pneumáticos, membros torácicos modificados em nadadeiras (aletas), pés com membranas interdigitais que atuam como leme e corpo fusiforme. Possuem penas modificadas, que são achatadas e uniformes em seu tamanho por todo o corpo (VON IHERING, 2002; SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006). Medem cerca de 70 cm quando adultos e pesam de 2,7 a 4,8 kg. Animais jovens apresentam plumagem acinzentada e sem definição de listras características da espécie (BERGER, 2002).

Nidificam no solo, geralmente em tocas escondidas sob a vegetação, sendo que comumente ocorre a postura de dois ovos. O macho e a fêmea constroem e cuidam do ninho e dos filhotes. Entre 60 e 70 dias de idade, os filhotes com a plumagem juvenil completa e estatura próxima à dos adultos saem do ninho e seguem para o mar sem o acompanhamento dos pais. No final do primeiro ano de vida, os animais mudam para plumagem adulta, contudo a maturidade sexual só é efetivamente atingida entre quatro e sete anos de idade (BERGER, 2002; SILVA-FILHO e RUOPPOLO 2006).

Pinguins-de-magalhães são nativos do sul da América do Sul, com pontos de reprodução no Chile, Argentina e Ilhas Malvinas (GANDINI, FRERE e BOERSMA, 1998). Durante o período reprodutivo, os animais realizam breves deslocamentos em busca de alimento, que podem durar alguns dias (PÜTZ, INGHAM e SMITH, 2000; PÜTZ, INGHAM e SMITH, 2002; BOERSMA, 2008).

Após realizar a muda de penas, no final de fevereiro, os animais jovens e adultos realizam longas migrações pelágicas (SICK, 1997; PÜTZ, INGHAM e SMITH, 2000; SCHIAVINI *et al.*, 2005; SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; PÜTZ *et al.*, 2007). Esses deslocamentos migratórios estão relacionados à busca por

alimento (STOKES, BOERSMA e DAVIS, 1998; PÜTZ, INGHAM e SMITH, 2000), que são basicamente peixes, cefalópodes e crustáceos (SCHIAVINI *et al.*, 2005).

Por procurarem alimentos a grandes distâncias das áreas de reprodução, alguns animais, em especial os jovens, podem entrar na Corrente das Malvinas chegando à costa do Brasil (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; BRASIL, 2010). Durante o inverno, essas aves são abundantes na plataforma continental do sul do Brasil e Uruguai (PÜTZ *et al.*, 2007; BRASIL, 2010). Mesmo assim, alguns estudos com pinguins-de-magalhães monitorados com transmissores de sinal via satélite mostraram que esses animais podem não atingir a costa brasileira, dependendo do seu sítio de reprodução (STOKES, BOERSMA e DAVIS, 1998; PÜTZ, INGHAM e SMITH, 2000; PÜTZ, INGHAM e SMITH, 2002). Outros relatos demonstram que esses animais podem chegar até o nordeste do Brasil (ROOS, 2008).

Os dados sobre a ocorrência dessa espécie no Brasil ainda são escassos e há necessidade de desenvolvimento de estudos para o conhecimento da dinâmica populacional durante a migração e dos possíveis impactos aos quais os animais estão expostos durante esse período.

Estima-se que a população atual esteja em torno de 1,5 milhões de pares reprodutivos, com cerca de 700 mil no Chile, 650 mil na Argentina e 150 mil nas Ilhas Malvinas (BINGHAM e HERRMANN, 2008). Segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2010), o status da espécie é de quase ameaçada. As populações de pinguim-de-magalhães têm decrescido nas últimas décadas, principalmente na maior colônia reprodutiva, localizada em Punta Tombo na Argentina (SCHIAVINI *et al.*, 2005; BOERSMA, 2008;).

Esta diminuição populacional tem ocorrido por várias razões, incluindo a destruição de habitat e o turismo desordenado, a redução da disponibilidade de alimentos devido à pesca predatória, a poluição marinha e os derramamentos de óleo ao longo da costa, a captura incidental na pesca, alterações climáticas, doenças, entre outras ameaças (GANDINI *et al.*, 1994; PETRY e FONSECA, 2002; SCHIAVINI *et al.*, 2005; GARCÍA-BORBOROGLU *et al.*, 2006; MÄDER, SANDER e CASA JR., 2010).

Como são altamente especializados para a natação e mergulho, esses animais podem refletir variações oceânicas de forma mais intensa que outras aves marinhas e também mudanças causadas por atividades antrópicas. A poluição

crônica por óleo pode tornar as espécies marinhas, incluindo o pinguim-de-magalhães, mais suscetíveis às perturbações locais e extinção (BOERSMA, 2008).

Estima-se que a contaminação crônica dos mares por descargas ilegais de petróleo mata 42 mil pinguins anualmente, apenas na costa da Argentina (CRANFIELD, 2003). No estudo de García-Borboroglu *et al.* (2006), verificou-se que a poluição por petróleo foi a principal causa de pinguins-de-magalhães serem atendidos nos 25 centros de reabilitação de fauna costeira existentes entre Salvador, no Brasil e San Antonio, na Argentina. Dos animais recebidos, a maioria (77%) tinha sinais de impacto por esta causa.

Pelanda (2007) estudou os impactos antrópicos que afetaram as aves marinhas no litoral do Paraná. Dentre os agentes estressores destacou-se a contaminação por óleo, registrada em 56% dos exemplares que apresentaram algum sinal externo de impacto. Destes, 92% eram pinguins-de-magalhães.

No Brasil é comum a ocorrência de indivíduos afetados ou não pelo petróleo (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010; MÄDER, SANDER e CASA JR., 2010). Geralmente os animais chegam fracos e cansados, em decorrência do longo percurso, dificuldade na caça e busca por alimentos, doenças e contaminação por derramamento de óleo (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010). Sabe-se que a grande maioria dos animais encontrados no litoral brasileiro são jovens, de modo que especula-se que este seria o estágio de vida mais sensível aos impactos ambientais (GARCÍA-BORBOROGLU *et al.*, 2010; MÄDER, SANDER e CASA JR., 2010).

No litoral brasileiro são realizados vários resgates de pinguins, com reabilitação nos centros de triagem e soltura dessas aves. Entre os principais centros de reabilitação nas regiões sul e sudeste do Brasil, destacam-se o Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM, Museu Oceanográfico da Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG) no Rio Grande do Sul; o Centro de Triagem de Animais Silvestres de Santa Catarina (CETAS-SC, Polícia Militar Ambiental e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, em parceria com a R3 Animal); o Projeto de Estudos e Recuperação de Aves, Mamíferos e Répteis (PROAMAR, Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná - UFPR) no Paraná; e o Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS) Lello-Unimonte em São Paulo.

A reabilitação realizada nesses centros costuma ser efetiva, contudo, não há unificação de procedimentos e muitas informações sobre aspectos clínicos, laboratoriais, de dieta, rotas de migração, dinâmicas migratórias e mecanismos determinantes para a sobrevivência neste período têm sido perdidas com a falta de metodologias compatíveis e de coletas sistemáticas de cunho científico. Sequer há estimativas acuradas da mortalidade de animais na costa, ou qual sua distribuição geográfica durante a migração (BRASIL, 2010). Devido à falta de informações, o real impacto da chegada dos pinguins na costa brasileira é desconhecido, dificultando o desenvolvimento de programas de planejamento e o conhecimento sobre a real necessidade de mais profissionais ou centros de reabilitação.

Com o intuito de minimizar esse problema, foi criado em 2010, pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE – ICMBio) em conjunto com pesquisadores da área, o “Projeto Nacional de Monitoramento do Pinguim-de-Magalhães”, que tem como objetivos ampliar o conhecimento sobre a espécie no Brasil e otimizar os esforços de pesquisa, reabilitação e monitoramento, possibilitando a contribuição e integração de iniciativas em prol da conservação (BRASIL, 2010).

Atualmente existem protocolos padronizados sugeridos para o tratamento e reabilitação de pinguins-de-magalhães afetados por petróleo no Brasil, porém, os critérios clínicos e hematológicos para liberação desses animais são provenientes de estudos com reabilitação de outras espécies (RUOPPOLO *et al.*, 2004), e não existem informações sobre parâmetros de bioquímica sérica necessários para a liberação dos animais.

Existem poucos estudos incluindo hematologia, bioquímica clínica e toxicologia em pinguins-de-magalhães. Essas informações são necessárias para o conhecimento do estado geral desses animais, diagnóstico e para decisões sobre manutenção, reabilitação ou soltura. As análises hematológicas e toxicológicas geram informações importantes sobre impactos em longo prazo da exposição e da reabilitação de aves marinhas afetadas por óleo (NEWMAN *et al.*, 2000), por isso, são ferramentas fundamentais no acompanhamento desses animais, e no desenvolvimento de protocolos eficientes para a reabilitação e soltura de pinguins-de-magalhães afetados ou não pelo petróleo.

Este trabalho está dividido em três capítulos no formato de artigos científicos, baseados nos parâmetros obtidos nos pinguins-de-magalhães e de

amostras coletadas nos centros de reabilitação. O capítulo 1 é intitulado “Parâmetros clínicos, hematológicos, de proteína plasmática total e fibrinogênio em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) pré e pós-reabilitação”. O capítulo 2, “Parâmetros clínicos e de bioquímica sérica de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) pré e pós-reabilitação”; e o capítulo 3 é intitulado “Colinesterase muscular em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*)”.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFPR (ANEXO 1) e pelo ICMBio através do SISBIO (ANEXO 2).

CAPÍTULO I

PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL E FIBRINOGENIO EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO

CLINICAL, HEMATOLOGICAL, TOTAL PLASMA PROTEIN AND FIBRINOGEN PARAMETERS OF MAGELLANIC PENGUINS (*Spheniscus magellanicus*) PRE- AND POST-REHABILITATION

RESUMO

Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) geralmente chegam fracos ao Brasil durante o inverno. A hematologia fornece informações valiosas sobre anemia e imunidade dos animais. Os objetivos do presente estudo foram determinar o perfil hematológico, de proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio de pinguins-de-magalhães jovens e adultos no PROAMAR e no CETAS-SC, relacionando esses resultados com o estado de saúde e possibilidade de sobrevivência dos animais. Foram avaliados no Paraná 14 animais na pré e oito na pós-reabilitação e 29 animais em Santa Catarina após a reabilitação. Antes da reabilitação, todos os animais apresentavam debilidade. Nos exames hematológicos desses animais, observou-se que a anemia estava presente em 83% dos pinguins que foram a óbito e em 50% dos que sobreviveram. A relação heterófilos/linfócitos (H/L) foi de $3,87 \pm 0,57$ nos animais que foram a óbito, significativamente maior que a média de $2,20 \pm 0,30$ dos animais que sobreviveram. Esses dois parâmetros são úteis na avaliação da possibilidade de sobrevivência dos animais à reabilitação. O escore corporal apresentou correlação positiva com hematócrito e PPT, e correlação negativa com relação H/L. Após a reabilitação os valores foram semelhantes aos de outros animais da família Spheniscidae, com médias variando de 1,64 a $1,90 \times 10^6$ eritrócitos/ μL ; 43,38 a 48,80% de hematócrito; 12,45 a 13,52 g/dL de hemoglobina; 8.684 a 14.011 leucócitos/ μL ; 4.767 a 8.041 heterófilos/ μL ; 3.215 a 4.951 linfócitos/ μL ; 95 a 655 eosinófilos/ μL ; 179,8 a 277,9 monócitos/ μL ; 141 a 184,9 basófilos/ μL ; e 1,26 a 1,74 de relação H/L. Esses parâmetros, portanto, podem ser utilizados como valores de referência e parâmetros para soltura para pinguins-de-magalhães jovens e adultos em cativeiro nos centros de reabilitação.

Palavras-chave: anemia; aves marinhas; hemograma; pinguim; relação H/L.

ABSTRACT

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) usually arrive weak in Brazil during the winter. Hematology provides valuable information about anemia and immunity of animals. The aims of this study were to determine the hematologic, total plasma protein (TPP) and fibrinogen profiles of young and adult Magellanic penguins in PROAMAR and CETAS-SC, relating these results with the state of health and survival possibility of the animals. In Paraná were evaluated 14 animals in pre- and eight in post-rehabilitation and 29 animals in Santa Catarina after rehabilitation. Before the rehabilitation, all animals showed weakness. In hematological exams of these animals, we found that anemia was present in 83% of the penguins that died and 50% of those which survived. The heterophils/lymphocytes (H/L) ratio was 3.87 ± 0.57 in animals that died, significantly higher than the average of 2.20 ± 0.30 for animals that survived. These two parameters are useful to assess the survival possibility of animals to rehabilitation. The body condition score was positively correlated with hematocrit and TPP, and negatively correlated with H/L ratio. After rehabilitation, the values were similar to other animals of the family Spheniscidae, with averages ranging from 1.64 to 1.90×10^6 erythrocytes/ μL ; 43.38 to 48.80% of hematocrit; 12.45 to 13.52 g/dL of hemoglobin; 8,684 to 14,011 leukocytes/ μL ; 4,767 to 8,041 heterophils/ μL ; 3,215 to 4,951 lymphocytes/ μL ; 95 to 655 eosinophils/ μL ; 179.8 to 277.9 monocytes/ μL ; 141 to 184.9 basophils/ μL ; and 1.26 to 1.74 of H/L ratio. These parameters can therefore be used as reference values and release parameters for young and adult Magellanic penguins in captivity on the rehabilitation centers.

Key-words: anemia; seabirds; hemogram; penguin; H/L ratio.

1 INTRODUÇÃO

Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* – Forster, 1781) são nativos do sul da América do Sul, com áreas de reprodução no Chile, Argentina e Ilhas Malvinas (GANDINI, FRERE e BOERSMA, 1998). Durante o inverno é comum o aparecimento de indivíduos na plataforma continental do sul do Brasil e Uruguai (PÜTZ *et al.*, 2007), sendo que geralmente chegam fracos devido ao longo percurso, dificuldade na busca por alimentos, doenças e contaminação por óleo (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010).

O exame físico nos animais recém-chegados pode fornecer informações quanto ao seu estado de saúde, porém, desordens múltiplas levam ao aparecimento de sinais clínicos inespecíficos (CAMPBELL, 2007b). Desta forma, exames laboratoriais são úteis na avaliação e diagnóstico de doenças nessas aves (COLES, 1986).

A hematologia fornece informações valiosas, especialmente sobre anemia e imunidade do animal (NEWMAN *et al.*, 2000). Na avaliação dos eritrócitos deve-se considerar tamanho, forma, cor e presença de inclusões celulares (CAMPBELL, 2007b). Alterações nucleares nos eritrócitos podem servir como bioindicador de efeito biológico precoce na avaliação da exposição a derivados do petróleo, além de serem úteis na avaliação geral da saúde dos animais (NETTO *et al.*, 2000; PINHATTI *et al.*, 2006; ROCHA, 2006).

Variações no número de leucócitos circulantes podem ocorrer por fatores fisiológicos ou patológicos (JAIN, 1986). Algumas alterações, como leucocitose com heterofilia, podem ocorrer em situações de intoxicações ou estresse (CAMPBELL, 2007b).

A relação entre heterófilos e linfócitos (H/L) reflete o estado imune das aves e é influenciada pelo estresse agudo ou crônico nos indivíduos (MALLORY *et al.*, 2010). A leucocitose induzida por corticosteróides causa heterofilia e linfopenia (CAMPBELL, 2007b).

A família Spheniscidae constitui uma das de maior carência de padrões hematológicos disponíveis na literatura, especialmente em animais da espécie *S. magellanicus* (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Dos trabalhos com animais desta família, destaca-se o realizado por Hawkey, Horsley e Keymer (1989) com pinguim-de-penacho-amarelo (*Eudyptes crestatus*), pinguim-gentoo (*Pygoscelis papua*) e pinguim-de-magalhães, em que foram avaliados parâmetros hematológicos correlacionando com cativeiro ou vida-livre, idade e processo de muda.

Villouta, Hargreaves e Rtvros (1997) avaliaram a evolução dos parâmetros hematológicos em decorrência do tempo de cativeiro em pinguim-de-humboldt (*Spheniscus humboldti*), e Wallace *et al.* (1995) determinaram parâmetros hematológicos de pinguins da mesma espécie saudáveis em vida livre na costa do Chile.

Sergent, Rogers e Cunningham (2004) determinaram os parâmetros hematológicos de pinguim-azul (*Eudyptula minor*) de vida livre, descrevendo as características hematológicas da espécie e analisando a influência de variáveis, como local de origem, estação reprodutiva, sexo e condição corporal.

Travis *et al.* (2006) avaliaram os parâmetros hematológicos em pinguim-de-galápagos (*Spheniscus mendiculus*) de vida livre e realizaram testes sorológicos

para as doenças detectadas em outras espécies de aves endêmicas das ilhas Galápagos, no Equador.

No estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2010), foi realizado o monitoramento do hematócrito e massa corporal de pinguins-de-magalhães jovens recebidos no litoral do Rio Grande do Sul, no Brasil, contaminados ou não por petróleo. Os autores concluíram que a pesagem e o hematócrito são ferramentas importantes para a avaliação da saúde dos animais e permitem determinar quais as chances de sobrevivência à reabilitação.

Os objetivos do presente estudo foram determinar o perfil hematológico, de proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio em pinguins-de-magalhães jovens e adultos, antes e após a reabilitação realizada nos centros de recuperação do Paraná e Santa Catarina, relacionando esses resultados com o estado de saúde e possibilidade de sobrevivência dos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAIS E ANIMAIS

O estudo foi realizado no município de Pontal do Paraná-PR, utilizando 14 pinguins-de-magalhães recebidos no Projeto de Estudos e Recuperação de Aves, Mamíferos e Répteis (PROAMAR), do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (UFPR) nos anos de 2010 e 2011, e em Florianópolis-SC, utilizando 29 pinguins-de-magalhães recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Santa Catarina (CETAS-SC), da Polícia Militar Ambiental e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) no ano de 2011.

Os animais do Paraná foram acompanhados durante a reabilitação, com exames físicos, pesagens e coletas de sangue no início (até dois dias após a chegada do animal) e no final do período de reabilitação. Nos animais recebidos em Santa Catarina foram realizados exames físicos, pesagens e coletas de sangue somente no final da reabilitação.

O período de reabilitação nos dois locais foi de um a dois meses. No PROAMAR foram recebidos animais nos meses de junho a outubro, sendo as coletas do início da reabilitação realizadas nesses meses, e as coletas do final da

reabilitação nos meses de agosto a outubro. No CETAS-SC, foram recebidos pinguins de junho a setembro, e as coletas do final da reabilitação foram realizadas de setembro a novembro.

O manejo dos animais durante a reabilitação é diferente nos dois locais: Nos primeiros dias os animais do PROAMAR recebem um ou dois peixes (de 40 a 70 g cada) por dia, sendo essa alimentação gradativamente aumentada até cerca de 500 g de peixes por dia. Os pinguins recebem peixes de descarte da pesca do camarão ou sardinha congelada. Há suplementação com tiamina (vitamina B1) (doses de 75 mg cinco vezes por semana) e vitaminas A (0,25 ml duas vezes por semana) e E (0,5ml uma vez por semana). Animais muito debilitados recebem alimento liquefeito com a mesma suplementação.

No CETAS-SC são fornecidas cerca de oito (500 g) sardinhas congeladas por dia para cada animal, também suplementados com tiamina (doses de 75 mg três vezes por semana). Quando debilitados, os animais podem receber até 10 sardinhas por dia, além de hidratação oral. Quando apresentam prostração intensa recebem Potenay Gold B12® (1ml) e Ferrodex® injetável (1ml) em duas doses, com intervalo de uma semana.

A vermifugação é realizada em ambos os locais somente após a estabilização dos animais. O tratamento é realizado com o vermífugo oral Drontal Plus®, em duas administrações (doses de 1/4 de comprimido de 660 mg) com intervalo de 15 dias.

O manejo sanitário é realizado de maneira semelhante nos dois centros, com limpeza diária dos recintos e da piscina com água e hipoclorito de sódio.

Os critérios para soltura após a reabilitação são diferentes para os dois locais. No PROAMAR é realizada a avaliação do estado geral dos animais, que inclui peso e condição adequada das penas (sem falhas ou lesões), postura e bom desempenho na piscina. No CETAS-SC é realizado o exame clínico completo dos animais (com ênfase na auscultação) e são utilizados os critérios da IFAW ("International Found for Animal Welfare"), que consideram o estado geral dos animais, o estado de impermeabilização das penas, o hematócrito mínimo de 38%, valor de leucócitos no tubo capilar máximo de 2% e a proteína plasmática total maior ou igual a 3 g/dL.

2.2 EXAME FÍSICO E COLETA DE AMOSTRAS

O exame físico foi realizado sob contenção física, com verificação das mucosas oral e oculares, inspeção do corpo a procura de ferimentos e marcas de óleo e palpação da musculatura peitoral para determinação do escore corporal, classificado em 1 (muito magro, quando a quilha do animal é facilmente observada, mesmo sem a palpação), 2 (magro, quando a quilha do animal não é facilmente observada mas pode ser palpada) ou 3 (normal, quando a quilha do animal não é facilmente observada ou palpada).

As coletas de sangue foram realizadas após jejum de 8 horas (PROAMAR) e de 24 horas (CETAS-SC) por punção da veia metatársica medial. Foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue de cada animal e as amostras foram acondicionadas em tubos com o anticoagulante heparina. Foi confeccionado o esfregaço sanguíneo imediatamente após a coleta, utilizando amostras sem anticoagulante.

2.3 EXAMES LABORATORIAIS

As amostras foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para processamento.

O hemograma compreendeu o eritrograma (contagem de eritrócitos, determinação do hematócrito, da hemoglobina e dos índices hematimétricos), o leucograma (contagem de leucócitos totais e contagem diferencial de leucócitos) e a estimativa de trombócitos. Além disso, foram determinadas a concentração de proteína plasmática total (PPT) e a estimativa do fibrinogênio plasmático.

As contagens dos eritrócitos e leucócitos foram realizadas em hemocítômetro (Câmara de Neubauer Improved®) com amostras de sangue diluídas a 1:100 em azul de cresil. A estimativa de trombócitos foi realizada em lâmina, avaliando-se o número de trombócitos por campo. O hematócrito foi determinado pela técnica do micro-hematócrito e centrifugação do sangue em tubos capilares, a 9000 RPM por 5 minutos (COLES, 1986). Após realização do hematócrito, o plasma foi utilizado para determinação da concentração da PPT e estimativa da concentração de fibrinogênio plasmática, ambas por refratometria (MILLAR, SIMPSON e STALKER, 1971). O método da cianometahemoglobina, com

centrifugação antes da leitura em espectrofotômetro, foi utilizado para medir a concentração da hemoglobina (COLES, 1986).

Os índices hematimétricos VGM (volume globular médio) e CHGM (concentração de hemoglobina globular média) foram calculados segundo as respectivas fórmulas (WINTROBE, 1933).

As extensões sanguíneas foram coradas com corante de Wright e a leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico. Os eritrócitos foram avaliados quanto à cor, forma, tamanho, presença de inclusões, parasitas ou células imaturas. Foram avaliados 100 eritrócitos por lâmina para determinação das anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (micronúcleos e brotamentos), obtendo-se o número de ANE/100 eritrócitos. Foi realizada a contagem diferencial de 100 leucócitos (heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) e estes foram avaliados quanto à presença de alterações tóxicas, células imaturas ou degeneradas, presença de inclusões e parasitas. Com os dados obtidos da contagem diferencial, foi calculada a relação H/L.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste T de Student e o teste de regressão linear, mediante o programa BioEstat (versão 5.0).

3 RESULTADOS

No PROAMAR foram acompanhados 14 animais (identificados como P1 a P14), sendo 13 jovens e um adulto (P14).

No exame físico dos animais antes da reabilitação verificou-se que todos apresentavam diarreia de coloração esverdeada. Seis animais apresentavam debilidade intensa e foram a óbito na primeira semana de acompanhamento. Os outros oito animais apresentavam debilidade leve a moderada e recuperaram-se em até dois meses. Dois pinguins apresentavam lesões de pele sugestivas de trauma (P1 e P12) e quatro tinham sinais de contaminação por óleo (P3, P6, P8 e P14).

Os resultados dos exames hematológicos, de PPT, fibrinogênio, escore e massa corporal dos animais antes da reabilitação no PROAMAR estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 – VALORES HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO, ESCORE E MASSA CORPORAL NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) QUE VIERAM A ÓBITO E QUE SOBREVIVERAM NO PROAMAR.

Parâmetros	Óbito						Sobrevivência							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Massa corporal (Kg)	1,645	2,26	1,84	2,64	2,2	2,2	2,375	2,825	2,46	2,03	2,015	1,93	2,2	2,96
Escore corporal	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	3
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	2,145	1,165	1,450	1,945	1,575	0,845	1,355	1,905	2,005	1,115	1,565	1,0	1,635	1,745
Hematócrito (%)	35	30	35	37	44	20	27	47	44	35	40	38	45	48
Hemoglobina (g/dL)	10,4	6,7	8,6	13	15,1	5,8	7,4	13,2	13,2	13,4	11,3	6,1	16	13,7
VGM ¹ (fL)	163,17	257,51	241,38	190,23	279,37	236,69	199,26	246,72	219,45	313,90	255,59	380,0	275,23	275,07
CHGM ² (%)	29,71	22,33	24,57	35,14	34,32	29,0	27,41	28,09	30,0	38,29	28,25	16,05	35,56	28,54
Leucócitos Totais (/μL)	31.960	13.340	10.920	28.810	18.900	16.000	15.250	11.000	10.080	2.900	6.880	28.670	9.000	22.000
Heterófilos (%)	79	85	82	78	59	72	52	71	70	62	59	78	68	54
Heterófilos (/μL)	25.248	11.339	8.954	22.472	11.151	11.520	7.930	7.810	7.056	1.798	4.059	22.363	6.120	11.880
Linfócitos (%)	21	14	17	22	26	27	46	25	28	34	34	21	26	39
Linfócitos (/μL)	6.712	1.868	1.856	6.338	4.914	4.320	7.015	2.750	2.822	986	2.339	6.021	2.340	8.580
Eosinófilos (%)	0	0	0	0	9	1	2	2	1	1	3	1	2	1
Eosinófilos (/μL)	0	0	0	0	1.701	160	305	220	101	29	206	287	180	220
Monócitos (%)	0	0	1	0	6	0	0	2	0	2	3	0	4	3
Monócitos (/μL)	0	0	109	0	1.134	0	0	220	0	58	206	0	360	660
Basófilos (%)	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3
Basófilos (/μL)	0	133	0	0	0	0	0	0	101	29	69	0	0	660
Trombócitos/campo	2,7	3,3	5,7	6,2	4,2	1	1,5	2,5	4,5	5,3	4,5	5,3	4,2	4
Policromatófilos/campo	7,1	3,9	0,4	3,8	4,1	1,3	3,6	3,5	1,8	3,5	4,2	8,2	0,3	2,8
H/L ³	3,8	6,1	4,8	3,5	2,3	2,7	1,1	2,8	2,5	1,8	1,7	3,7	2,6	1,4
ANE/100 ⁴	1	0	2	3	0	3	0	1	2	0	0	0	0	1
PPT ⁵ (g/dL)	4,0	5,0	4,2	5,2	7,2	2,8	4,2	5,8	5,4	4,0	5,6	6,0	4,8	5,6
Fibrinogênio (g/dL)	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,1	0,6	0,4	0,6	0,2

¹VGM - Volume globular médio; ²CHGM - Concentração de hemoglobina globular média; ³H/L - Relação heterófilos/linfócitos; ⁴ANE/100 - Alterações nucleares eritrocitárias em 100 eritrócitos;

⁵PPT - Proteína plasmática total.

P1 a P13 - Animais jovens; P14 - Animal adulto.

Entre os parâmetros dos animais que sobreviveram e dos que vieram a óbito, houve diferença significativa pelo teste T de Student ($p < 0,05$) para as médias dos valores relativos de heterófilos e de linfócitos e para as médias da relação H/L (TABELA 2).

TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO E MASSA CORPORAL NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) RECEBIDOS NO PROAMAR.

Parâmetros*	Óbito (n=6)	Sobrevivência (n=8)
Massa corporal (Kg)	2,13 ± 0,14 ^a	2,35 ± 0,13 ^a
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,52 ± 0,2 ^a	1,54 ± 0,13 ^a
Hematócrito (%)	33,5 ± 3,27 ^a	40,5 ± 2,5 ^a
Hemoglobina (g/dL)	9,93 ± 1,48 ^a	11,79 ± 1,19 ^a
VGM ¹ (fL)	228,1 ± 17,7 ^a	270,7 ± 19,99 ^a
CHGM ² (%)	29,18 ± 2,08 ^a	29,02 ± 2,32 ^a
Leucócitos Totais (/μL)	19.988 ± 3.486 ^a	13.223 ± 2.986 ^a
Heterófilo (%)	75,83 ± 3,81 ^a	64,25 ± 3,19 ^b
Heterófilos (/μL)	15.114 ± 2.815 ^a	8.627 ± 2.223 ^a
Linfócitos (%)	21,17 ± 2,06 ^a	31,63 ± 2,91 ^b
Linfócitos (/μL)	4.335 ± 860,8 ^a	4.107 ± 960 ^a
Eosinófilos (%)	1,67 ± 1,48 ^a	1,62 ± 0,26 ^a
Eosinófilos (/μL)	310,2 ± 279,4 ^a	193,5 ± 32,33 ^a
Monócitos (%)	1,17 ± 0,98 ^a	1,75 ± 0,56 ^a
Monócitos (/μL)	207,2 ± 186,2 ^a	188 ± 82,01 ^a
Basófilos (%)	0,17 ± 0,17 ^a	0,75 ± 0,37 ^a
Basófilos (/μL)	22,17 ± 22,17 ^a	107,4 ± 80,09 ^a
Trombócitos/campo	3,85 ± 0,79 ^a	3,97 ± 0,47 ^a
Policromatófilos/campo	3,43 ± 0,97 ^a	3,49 ± 0,8 ^a
H/L ³	3,87 ± 0,57 ^a	2,2 ± 0,3 ^b
ANE/100 ⁴	1,5 ± 0,56 ^a	0,5 ± 0,27 ^a
PPT ⁵ (g/dL)	4,73 ± 0,6 ^a	5,17 ± 0,26 ^a
Fibrinogênio (g/dL)	0,27 ± 0,04 ^a	0,36 ± 0,06 ^a

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

^{ab} Letras diferentes em uma mesma linha indicam significância estatística ($p < 0,05$).

¹VGM - Volume globular médio; ²CHGM - Concentração de hemoglobina globular média; ³H/L - Relação heterófilos/linfócitos;

⁴ANE/100 - Alterações nucleares eritrocitárias em 100 eritrócitos; ⁵PPT - Proteína plasmática total.

No teste de regressão linear houve correlação positiva entre escore corporal e hematócrito e escore corporal e PPT (FIGURAS 1 e 2). Verificou-se correlação negativa entre escore corporal e relação H/L (FIGURA 3).

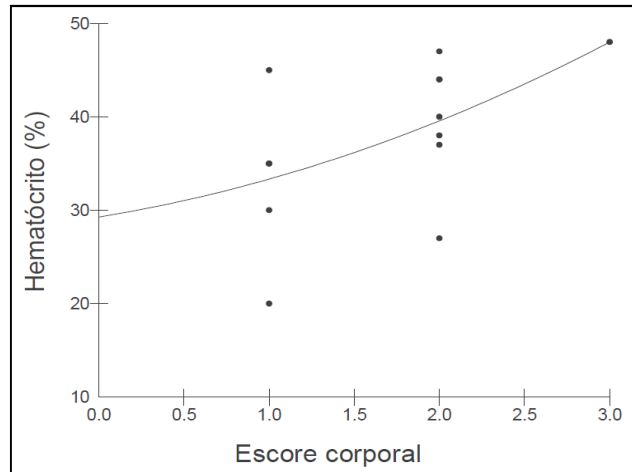


FIGURA 1 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E HEMATÓCRITO NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) NO PROAMAR.

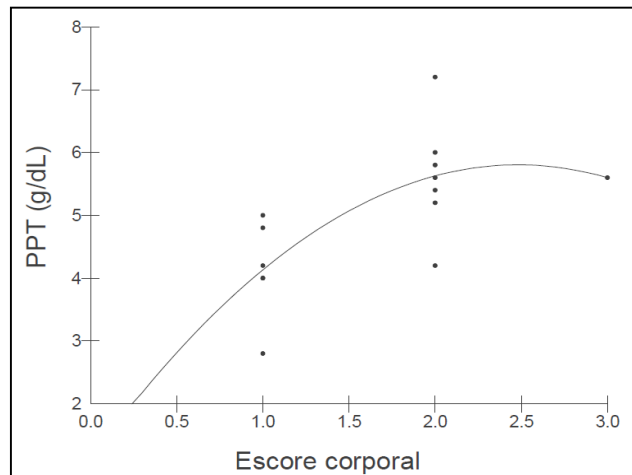


FIGURA 2 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT) NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) NO PROAMAR.

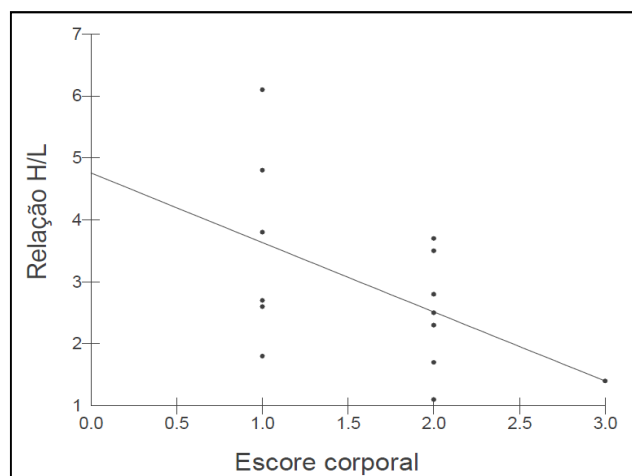


FIGURA 3 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E RELAÇÃO H/L NA PRÉ-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) NO PROAMAR.

Dos 29 pinguins-de-magalhães avaliados no CETAS-SC em 2011, 19 eram adultos e 10 eram jovens e todos estavam clinicamente saudáveis. O tempo de reabilitação desses animais foi de um a dois meses.

As médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos, de PPT, fibrinogênio e massa corporal dos animais após a reabilitação no Paraná e em Santa Catarina estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO E MASSA CORPORAL NA PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) JOVENS E ADULTOS RECEBIDOS NO PROAMAR E NO CETAS-SC.

Parâmetros*	Paraná		Santa Catarina	
	Jovens e Adulto (n=8)		Jovens (n=10)	Adultos (n=19)
Massa corporal (Kg)	2,81 ± 0,15 ^a		3,39 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,08 ^b
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,64 ± 0,07 ^a		1,90 ± 0,06 ^b	1,83 ± 0,06 ^{ab}
Hematócrito (%)	43,38 ± 1,15 ^a		48,8 ± 1,04 ^b	47,74 ± 0,71 ^b
Hemoglobina (g/dL)	12,45 ± 0,52 ^a		12,84 ± 0,42 ^{ab}	13,52 ± 0,24 ^b
VGM ¹ (fL)	266,5 ± 8,95 ^a		257,9 ± 6,9 ^a	264,1 ± 6,69 ^a
CHGM ² (%)	28,72 ± 0,97 ^a		26,3 ± 0,57 ^b	28,32 ± 0,24 ^a
Leucócitos Totais (/μL)	14.011 ± 1.100 ^a		10.100 ± 948,1 ^b	8.684 ± 868,7 ^b
Heterófilo (%)	56,75 ± 3,3 ^a		50,8 ± 3,29 ^a	54,26 ± 1,96 ^a
Heterófilos (/μL)	8.041 ± 959 ^a		5.115 ± 573,2 ^b	4.767 ± 516,1 ^b
Linfócitos (%)	36,25 ± 3,51 ^a		44,9 ± 3,52 ^a	37,26 ± 2,14 ^a
Linfócitos (/μL)	4.951 ± 496,2 ^a		4.568 ± 531,3 ^a	3.215 ± 365,2 ^b
Eosinófilos (%)	4,5 ± 1,1 ^a		1,0 ± 0,49 ^b	3,42 ± 0,69 ^a
Eosinófilos (/μL)	655 ± 175,7 ^a		95 ± 48,65 ^b	265,3 ± 51,84 ^c
Monócitos (%)	1,12 ± 0,48 ^a		1,8 ± 0,84 ^a	2,84 ± 0,57 ^a
Monócitos (/μL)	179,8 ± 87,33 ^a		181 ± 90,94 ^a	277,9 ± 78,06 ^a
Basófilos (%)	1,37 ± 0,5 ^a		1,5 ± 0,4 ^a	2,21 ± 0,44 ^a
Basófilos (/μL)	184,9 ± 59,6 ^a		141 ± 38,28 ^a	159,5 ± 26,53 ^a
Trombócitos/campo	4,75 ± 0,59		-	-
Policromatófilos/campo	3,59 ± 0,6 ^a		1,8 ± 0,33 ^b	1,45 ± 0,16 ^b
H/L ³	1,74 ± 0,26 ^a		1,26 ± 0,17 ^a	1,62 ± 0,16 ^a
ANE/100 ⁴	0,5 ± 0,19 ^a		0,7 ± 0,3 ^a	0,89 ± 0,28 ^a
PPT ⁵ (g/dL)	6,15 ± 0,28 ^a		6,96 ± 0,21 ^b	6,81 ± 0,12 ^b
Fibrinogênio (g/dL)	0,22 ± 0,04 ^a		0,28 ± 0,07 ^a	0,14 ± 0,04 ^a

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

^{abc} Letras diferentes em uma mesma linha indicam significância estatística (p<0,05).

¹VGM - Volume globular médio; ²CHGM - Concentração de hemoglobina globular média; ³H/L - Relação heterófilos/linfócitos;

⁴ANE/100 - Alterações nucleares eritrocitárias em 100 eritrócitos; ⁵PPT - Proteína plasmática total.

A contagem estimada de trombócitos não foi realizada nos animais do CETAS-SC, pois todos os esfregaços sanguíneos apresentavam agregados trombocitários.

Comparando-se os momentos pré e pós-reabilitação nos animais que sobreviveram no Paraná, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias de massa corporal, valores relativo e absoluto de eosinófilos e PPT. Os demais parâmetros foram estatisticamente semelhantes (TABELA 4).

TABELA 4 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL, FIBRINOGENIO E MASSA CORPORAL NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) QUE SOBREVIVERAM NO PROAMAR.

Parâmetro*	Pré-reabilitação (n=8)	Pós-reabilitação (n=8)
Massa corporal (Kg)	2,35 ± 0,13 ^a	2,81 ± 0,15 ^b
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,54 ± 0,13 ^a	1,64 ± 0,07 ^a
Hematócrito (%)	40,5 ± 2,5 ^a	43,38 ± 1,15 ^a
Hemoglobina (g/dL)	11,79 ± 1,19 ^a	12,45 ± 0,52 ^a
VGM ¹ (fL)	270,7 ± 19,99 ^a	266,5 ± 8,95 ^a
CHGM ² (%)	29,02 ± 2,32 ^a	28,72 ± 0,97 ^a
Leucócitos Totais (/μL)	13.223 ± 2.986 ^a	14.011 ± 1.100 ^a
Heterófilo (%)	64,25 ± 3,19 ^a	56,75 ± 3,3 ^a
Heterófilos (/μL)	8.627 ± 2.223 ^a	8.041 ± 959 ^a
Linfócitos (%)	31,63 ± 2,91 ^a	36,25 ± 3,51 ^a
Linfócitos (/μL)	4.107 ± 960 ^a	4.951 ± 496,2 ^a
Eosinófilos (%)	1,62 ± 0,26 ^a	4,5 ± 1,1 ^b
Eosinófilos (/μL)	193,5 ± 32,33 ^a	655 ± 175,7 ^b
Monócitos (%)	1,75 ± 0,56 ^a	1,12 ± 0,48 ^a
Monócitos (/μL)	188 ± 82,01 ^a	179,8 ± 87,33 ^a
Basófilos (%)	0,75 ± 0,37 ^a	1,37 ± 0,5 ^a
Basófilos (/μL)	107,4 ± 80,09 ^a	184,9 ± 59,6 ^a
Trombócitos/campo	3,97 ± 0,47 ^a	4,75 ± 0,59
Policromatófilos/campo	3,49 ± 0,80 ^a	3,59 ± 0,6 ^a
H/L ³	2,2 ± 0,3 ^a	1,74 ± 0,26 ^a
ANE/100 ⁴	0,5 ± 0,27 ^a	0,5 ± 0,19 ^a
PPT ⁵ (g/dL)	5,17 ± 0,26 ^a	6,15 ± 0,28 ^b
Fibrinogênio (g/dL)	0,36 ± 0,06 ^a	0,22 ± 0,04 ^a

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

^{ab} Letras diferentes em uma mesma linha indicam significância estatística ($p < 0,05$).

¹VGM - Volume globular médio; ²CHGM - Concentração de hemoglobina globular média; ³H/L - Relação heterófilos/linfócitos;

⁴ANE/100 - Alterações nucleares eritrocitárias em 100 eritrócitos; ⁵PPT - Proteína plasmática total.

Na avaliação da morfologia dos eritrócitos verificou-se que estas células são elípticas e nucleadas com citoplasma de coloração rósea. Havia presença de quantidades variáveis (de 0,5 a 8,2 por campo) de policromatófilos nas extensões sanguíneas de todos os animais. As ANE foram observadas em 50% dos animais na pré-reabilitação e em 45,9% na pós-reabilitação (FIGURA A – ANEXO 3).

Os heterófilos são esféricos com grânulos fusiformes, geralmente compactos e de coloração alaranjada e o núcleo é basofílico e lobulado. Não foram observadas alterações tóxicas nessas células em nenhum dos animais (FIGURA B – ANEXO 3).

Os linfócitos são arredondados, com citoplasma basofílico e núcleo ligeiramente excêntrico. Foi observada grande variação no tamanho dos linfócitos nos pinguins avaliados (FIGURAS B e C – ANEXO 3).

Os eosinófilos possuem tamanho semelhante aos heterófilos, porém os grânulos são arredondados e refratáveis. A diferenciação de heterófilos e eosinófilos em pinguins-de-magalhães é facilmente realizada devido à coloração e forma dos grânulos (FIGURA D – ANEXO 3).

Os monócitos foram os maiores leucócitos observados. Possuem grande volume citoplasmático e núcleo basofílico, com cromatina fracamente agregada e em formato amorfo (FIGURA E – ANEXO 3).

Os basófilos são menores do que heterófilos e possuem grânulos intensamente basofílicos. Os grânulos recobrem o núcleo que é dificilmente visualizado (FIGURA F – ANEXO 3).

Os trombócitos são pequenos, em formato elíptico, com núcleo excêntrico, arredondado e cromatina densamente agregada (FIGURAS B, C e E – ANEXO 3).

Não foram observadas alterações como vacúolos citoplasmáticos, ponteados basófilos e variações na localização do núcleo nas células sanguíneas dos pinguins avaliados. A presença de hemoparasitas não pôde ser confirmada.

4 DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos parâmetros de massa corporal, eritrograma, proteína plasmática total, leucograma e fibrinogênio, serão discutidos primeiramente com os dados da pré-reabilitação e em seguida da pós-reabilitação.

A massa corporal dos animais antes da reabilitação não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os que sobreviveram e os que foram a óbito, o que contrasta com o estudo de Rodrigues *et al.* (2010), que verificou que os pinguins-de-magalhães recebidos no centro de reabilitação tinham massa corporal significativamente menor na chegada, e os animais que vieram a óbito durante a reabilitação apresentavam peso inicial menor que aqueles que sobreviveram.

Após a reabilitação, a massa corporal dos animais do Paraná foi significativamente menor que a dos animais jovens e adultos de Santa Catarina. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao manejo nutricional diferente entre os dois locais. Os animais do Paraná recebiam principalmente peixes do descarte da pesca de camarão, ao contrário dos animais de Santa Catarina, que recebiam somente sardinha.

As principais espécies de peixes de descarte na região de Pontal do Paraná são *Cathorops spixii*, *Selene setapinnis*, *Cynoscion* spp., *Larimus breviceps*, *Paralichthys brasiliensis* e *Stellifer* spp. (CATTANI *et al.*, 2011). Comparando-se os níveis nutricionais das sardinhas com os de *Cynoscion* spp. e *P. brasiliensis* observa-se que as sardinhas apresentam mais proteínas e lipídeos e maior teor calórico (ANDRADE, BISPO e DRUZIAN, 2009; MARTINS e OETTERER, 2010; MINOZZO, 2010). Esse fator pode ter levado à maior massa corporal observada nos animais após a reabilitação em Santa Catarina.

No estudo de Rodrigues *et al.* (2010), pinguins-de-magalhães que sobreviveram ao período de reabilitação no Rio Grande do Sul apresentaram massa corporal semelhante aos animais do CETAS-SC na pós-reabilitação. Mesmo assim, os animais recebidos no PROAMAR tiveram ganho de peso durante a recuperação, pois a massa corporal foi significativamente maior ($p < 0,05$) após a reabilitação.

A massa corporal está altamente correlacionada com as massas dos órgãos e com depósitos lipídicos. Portanto, este é um índice eficaz para avaliar o estado nutricional e de saúde das aves (RODRIGUES *et al.*, 2010), embora isso não tenha sido evidente nos dados deste estudo.

No eritrograma dos animais na pré-reabilitação o quadro de anemia com hipoproteinemia foi mais frequente naqueles que foram a óbito (83%) do que nos que sobreviveram (50%). Da mesma forma, Rodrigues *et al.* (2010), que acompanharam pinguins-de-magalhães durante a reabilitação no Rio Grande do Sul, encontraram hematócrito significativamente menor nos animais que vieram a óbito do que nos que sobreviveram.

A anemia é evidenciada pela diminuição na contagem total de eritrócitos, do hematócrito e das concentrações de hemoglobina (CAMPBELL, 1994; FUDGE, 2000). A concentração de PPT é útil na diferenciação entre processos de eritrocitose e desidratação, além de ser influenciada pelo estado nutricional e imune (CAMPBELL, 2007b).

Apenas um dos animais que foi a óbito apresentou hematócrito normal, porém estava com a PPT aumentada. Esse pinguim, portanto, apresentava um quadro de desidratação, que levou a hemoconcentração (TVEDTEN, 2010), e hematócrito falsamente dentro dos parâmetros normais. Possivelmente esse animal estava anêmico, pois havia presença de 4,1 policromatófilos/campo. As aves apresentam rápida reciclagem de eritrócitos, por isso, mesmo em animais saudáveis, é possível observar uma pequena quantidade de policromatófilos no esfregaço sanguíneo (CAMPBELL, 1994; MITCHELL e JOHNS, 2008). Porém, quando essas células aparecem mais frequentemente, indicam resposta medular à anemia (CAMPBELL, 2007b).

Dos animais anêmicos, quatro dos que foram a óbito e um que sobreviveu apresentavam o VGM diminuído (anemia microcítica). Em aves, os eritrócitos jovens possuem o tamanho menor que os maduros, portanto, VGM abaixo dos valores normais revela presença de um fator regenerativo, especialmente quando associada à policromatofilia (ALMOSNY e MONTEIRO, 2006).

O CHGM foi baixo em dois pinguins anêmicos que foram a óbito e em um que sobreviveu. O valor reduzido do CHGM indica anemia por deficiência nutricional, que resulta em insuficiência de fatores hematopoiéticos (KRAUTWALD-JUNGHANN, 2007). Possivelmente esses animais apresentavam deficiência nutricional devido ao período de jejum antes da chegada ao PROAMAR.

O escore corporal dos animais antes da reabilitação apresentou correlação positiva com hematócrito e PPT, indicando que o estado nutricional pode influenciar esses parâmetros. Em pinguins-de-magalhães recebidos no Rio Grande do Sul, a massa corporal e o hematócrito dos animais que foram a óbito foram significativamente inferiores aos de animais que sobreviveram (RODRIGUES *et al.*, 2010), indicando também essa correlação. No estudo de Sergent, Rogers e Cunningham (2004) com pinguins-azuis, as aves com baixa condição corporal apresentaram menores valores na contagem de eritrócitos do que aquelas em boa condição corporal.

Apesar disso, segundo Fair, Whitaker e Pearson (2007), dados relacionando deficiências nutricionais e hematócrito em aves selvagens são muito escassos e não é possível concluir que o valor do hematócrito é um indicador confiável dessas deficiências nesses animais. De acordo com esses autores, apesar do hematócrito refletir algumas mudanças observadas na condição das aves, será verdadeiramente

preciso quando há desvio extremo da condição normal, o que geralmente também pode ser evidenciado pelo exame clínico.

Diversas substâncias químicas podem provocar anemia hemolítica em animais intoxicados, como alguns metais e derivados de petróleo (ZINKL, 1986). Em aves marinhas intoxicadas por petróleo, a anemia hemolítica caracteriza-se por números diminuídos de hemácias, sendo várias imaturas (CAMPBELL, 2007b). A presença de plasma ictérico ou com hemólise sugere anemia hemolítica (TVEDTEN, 2010), porém, isso não foi observado nos animais contaminados com óleo deste estudo.

Anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) em aves são geralmente atribuíveis a diseritropoiese, mas ocasionalmente ocorrem devido à aceleração na produção de eritrócitos (MITCHELL e JOHNS, 2008).

A presença dessas alterações pode servir como bioindicador de efeito biológico precoce na avaliação da exposição a hidrocarbonetos do petróleo e seus derivados (NETTO *et al.*, 2000). No presente estudo, porém, não houve relação entre a presença de ANE e contaminação por óleo.

Segundo Rocha (2006), as ANE em pinguins-de-magalhães afetados por óleo podem servir como um parâmetro sensível para avaliar efeito genotóxico deste produto e podem ser utilizados como um índice de exposição cumulativa ao petróleo. Apesar disso, deve-se considerar que o estresse físico e nutricional sofrido por esses animais em decorrência da exaustiva trajetória até a costa brasileira, também pode levar a um estresse oxidativo nessas células e, portanto, possibilitar o aparecimento dessas anormalidades.

O estudo de Pinhatti *et al.* (2006) revelou que em araras-canindé (*Ararauna*) a presença de micronúcleos foi maior em animais intoxicados por metais pesados e também em outros animais doentes, revelando esse parâmetro como um indicador geral de saúde dos animais.

Por isso, para a utilização segura desses dados, outros parâmetros precisam ser avaliados, especialmente com relação à eritropoiese, os efeitos clínicos do estresse e a relação entre heterófilos e linfócitos (H/L) (ROCHA, 2006).

Nos pinguins avaliados após a reabilitação, houve variação significativa ($p < 0,05$) de parâmetros eritrocitários conforme a idade (jovens ou adultos) e local (Paraná ou Santa Catarina). A concentração de eritrócitos totais, o hematócrito e a concentração de hemoglobina podem ser influenciados pela idade, sexo, hormônios

e outros fatores, como manejo e estado nutricional (FAIR, WHITAKER e PEARSON, 2007; MITCHELL e JOHNS, 2008).

As épocas em que foram realizadas as coletas nos dois locais foram próximas, portanto, provavelmente não ocorreu variação nos parâmetros por influência sazonal. O manejo nutricional, porém, foi diferente entre os dois locais, podendo ser a causa primária das diferenças observadas.

Os valores da contagem de eritrócitos desses animais foram semelhantes aos obtidos de outros animais da família Spheniscidae de cativeiro e de vida livre (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989; VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997; SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004), inclusive de pinguins-de-magalhães (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989).

Da mesma forma, valores de hematócrito obtidos por outros autores em animais da mesma família foram semelhantes aos dos pinguins após a reabilitação (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989; VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997; SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004), apesar dos resultados dos animais do Paraná terem sido significativamente menores ($p < 0,05$) que dos de Santa Catarina. Mesmo assim, o valor de $43,38 \pm 1,15\%$ obtido dos animais do Paraná foi semelhante ao de pinguins-de-magalhães em vida livre nas Ilhas Malvinas (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989).

A hemoglobina dos animais após a recuperação foi pouco inferior a de outros animais da família Spheniscidae (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989; VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997; SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004). No entanto, Hawkey, Horsley e Keymer (1989) encontraram hemoglobina variando de 12,1 a 15,7 g/dL para pinguins-de-magalhães de vida livre, valores próximos aos obtidos no presente estudo.

Apesar de não apresentarem anemia, os valores de VGM foram maiores e os de CHGM foram menores que os descritos na literatura para animais da família Spheniscidae (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989; VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997; SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004), incluindo pinguins-de-magalhães de vida livre, que tiveram valores de VGM de 215 ± 34 fL e de CHGM de $33,1 \pm 2,8\%$ (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989).

A PPT dos animais do Paraná foi semelhante à de pinguim-de-humboldt saudáveis em cativeiro (VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997) e pinguins-azuis saudáveis de vida livre (SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004). Os

animais de Santa Catarina apresentaram valores de PPT significativamente maiores ($p < 0,05$), possivelmente devido ao fornecimento de sardinhas aos animais.

Com relação ao leucograma dos animais na pré-reabilitação, a leucocitose foi mais frequente nos animais que vieram a óbito (66%) do que nos que sobreviveram (25%). As causas gerais de leucocitose incluem infecção (geral ou localizada), trauma, intoxicação, estresse e hemorragia (CAMPBELL, 1994).

Todos os animais que foram a óbito apresentavam heterofilia e linfopenia relativas, sendo que todos tinham heterofilia absoluta e apenas dois apresentavam linfopenia absoluta. De acordo com Hawkey, Horsley e Keymer (1989) a contagem absoluta de linfócitos é relativamente estável em aves adultas, enquanto a contagem de heterófilos é mais suscetível às variações sob a influência do estresse ou infecções microbianas. Nos pinguins com leucocitose que sobreviveram, verificou-se heterofilia e linfocitose absolutas, apesar de os números relativos desses tipos celulares em um dos animais estarem acima e abaixo do normal, respectivamente.

Dois dos animais que sobreviveram apresentavam leucopenia acentuada, com números absolutos de heterófilos e linfócitos também abaixo do normal. A leucopenia é menos comum, mas em geral associa-se ao consumo de leucócitos periféricos e/ou à diminuição da sua produção (FUDGE, 2000; CAMPBELL, 2007b).

Perfis leucocitários podem estar diretamente relacionados ao estresse e aos níveis de corticosteróides circulantes (DAVIS, MANEY e MAERZ, 2008). A leucocitose induzida por corticosteróides revela heterofilia madura (discreta a moderada) e linfopenia (CAMPBELL, 2007b). Por isso, a relação entre heterófilos e linfócitos (H/L) tem sido proposta como um índice sensível de estresse crônico em aves (SOPEZKI *et al.*, 2007).

Na pré-reabilitação, a média da relação H/L dos animais que foram a óbito foi de $3,87 \pm 0,57$, significativamente diferente ($p < 0,05$) da média de $2,20 \pm 0,30$ dos animais que sobreviveram. Além disso, esse parâmetro apresentou correlação negativa com o escore corporal dos animais. Segundo Vleck *et al.* (2000), animais que passam por longos períodos de jejum apresentam maior relação H/L.

Hawkey *et al.* (1985) verificaram que a relação H/L em pinguins-gentoo saudáveis era de 2,3, enquanto que nos animais com pododermatite era de 4,4, demonstrando a correlação desse parâmetro com o estado de doença. Dessa forma, embora a relação H/L possa fornecer informações sobre a condição de estresse dos animais, é necessário diferenciar essa situação de uma possível resposta

inflamatória (DAVIS, MANEY e MAERZ, 2008). Assim como o estresse, a resposta inflamatória pode causar heterofilia e linfopenia. Nesse caso, porém, comumente também ocorre leucocitose e/ou monocitose (JAIN, 1986; CAMPBELL, 2007b). No presente estudo, apenas um animal apresentou monocitose antes da reabilitação e a leucocitose foi mais frequente em animais que foram a óbito.

Vleck *et al.* (2000) encontraram valores da relação H/L em pinguins-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*) de vida livre variando de 0,16 a 8,09, dependendo do estado de saúde do animal, do estado nutricional, da presença de traumatismos e da época reprodutiva. Esses dados demonstram que a interpretação de mudanças nos perfis de leucócitos pode ser difícil, especialmente se o estado de infecção não é conhecido. Os dois fatores estão intimamente relacionados: o estresse é conhecido por levar a susceptibilidade a doenças e as doenças podem causar aumento do estresse (DAVIS, MANEY e MAERZ, 2008).

Antes da reabilitação, apenas um dos animais que foram a óbito apresentou eosinofilia e monocitose. A função exata dos eosinófilos nas aves não é conhecida, portanto, é difícil a interpretação de estados de eosinofilia (CAMPBELL, 2007b). O aumento no número circulante de monócitos associa-se a doenças infecciosas por agentes causadores de inflamação granulomatosa (CAMPBELL, 2007b). Possivelmente esse animal estava passando por um processo de inflamação e/ou infecção que não foi identificado.

Um dos animais que sobreviveu, apresentou leve basofilia. Nas aves, os basófilos participam da fase inicial da inflamação aguda e de reações de hipersensibilidade imediata (CAMPBELL, 2007b).

Após a reabilitação, o número de leucócitos totais dos animais no Paraná foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que dos animais jovens e adultos de Santa Catarina. O leucograma normal pode variar entre indivíduos da mesma espécie (CAMPBELL, 2007b), por fatores fisiológicos ou patológicos (JAIN, 1986).

Villouta, Hargreaves e Rtvros (1997) verificaram que o número de leucócitos totais variou conforme o tempo de cativeiro em pinguim-de-humboldt, sendo que não havia evidências de doença nos animais. Este estudo revelou que pinguins recém-capturados apresentavam em média 11.700 ± 5.600 leucócitos/ μL , com três semanas de cativeiro esse valor aumentou para 15.900 ± 4.600 leucócitos/ μL e em sete semanas de cativeiro foi de 9.800 ± 2.400 leucócitos/ μL . A variação no número de leucócitos totais observada nos animais do presente estudo

pode, portanto, ser considerada normal. Apesar disso, não é possível descartar a possibilidade de resposta inflamatória nos animais do Paraná, já que os valores de heterófilos e de linfócitos também foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nesses animais.

Na pós-reabilitação os animais apresentaram valores maiores de heterófilos que de linfócitos, o que também foi observado em pinguins-de-humboldt saudáveis em vida livre (WALLACE *et al.*, 1995) e cativo (VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997), pinguins-azuis de vida livre (SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004) e pinguins-de-galápagos de vida livre (TRAVIS *et al.*, 2006).

Hawkey, Horsley e Keymer (1989) encontraram valores relativos maiores de linfócitos do que de heterófilos em pinguim-de-penacho-amarelo, pinguim-gentoo e pinguim-de-magalhães de vida livre. Porém, no pinguim-de-penacho-amarelo e no pinguim-gentoo de cativo o valor de heterófilos foi maior que o de linfócitos. Os autores atribuem essa variação a uma maior exposição a agentes infecciosos nos animais de cativo, o que levaria à heterofilia, porém não descartam a possibilidade de linfocitose nos animais de vida livre.

A relação H/L nos animais pós-reabilitação variou de $1,26 \pm 0,17$ a $1,74 \pm 0,26$. Sopezki *et al.* (2007) encontraram valores menores ($0,99 \pm 0,29$) em pinguins-de-magalhães após a reabilitação no Rio Grande do Sul. Os valores mais baixos observados nesses animais podem ter ocorrido devido à diferente metodologia utilizada no estudo, em que foram analisadas 5000 células sanguíneas, diferenciando a quantidade de eritrócitos, heterófilos e linfócitos, para então calcular a relação H/L.

Os valores de eosinófilos variaram significativamente ($p < 0,05$) na pós-reabilitação entre os animais jovens ($95 \pm 48,65/\mu\text{L}$) e adultos ($265,3 \pm 51,84/\mu\text{L}$) recebidos em Santa Catarina e os animais do Paraná ($655 \pm 175,72/\mu\text{L}$). Esse aspecto é observado nos relatos de outros autores para animais da família Spheniscidae. Villouta, Hargreaves e Rtvros (1997) encontraram grande variação nesse tipo celular em pinguins-de-humboldt saudáveis, sendo que animais com três dias de cativo apresentaram em média 400 ± 600 eosinófilos/ μL , enquanto animais com 15 semanas de cativo tiveram 1.100 ± 900 eosinófilos/ μL . Da mesma forma, comparando-se a pré e a pós-reabilitação dos animais que sobreviveram no Paraná, houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores relativos e absolutos de eosinófilos.

Em mamíferos os eosinófilos são responsáveis por resposta a agentes parasitários e reações de hipersensibilidade imediata. Nas aves, porém, existe pouca relação entre eosinofilia e parasitismo, e essas células não parecem participar de reações de hipersensibilidade aguda. Nesse caso, a eosinofilia costuma estar associada à resposta inflamatória (MITCHELL e JOHNS, 2008). Nos animais do presente estudo, não foi evidente a relação entre resposta inflamatória e eosinofilia.

Os valores de monócitos encontrados nos animais após a reabilitação foram pouco menores, e os de basófilos foram semelhantes aos descritos na literatura para animais da família Spheniscidae (HAWKEY, HORSLEY e KEYMER, 1989; WALLACE *et al.*, 1995; VILLOUTA, HARGREAVES e RTVEROS, 1997; SERGENT, ROGERS e CUNNINGHAM, 2004; TRAVIS *et al.*, 2006).

O fibrinogênio em aves, assim como nos mamíferos, possui funções no mecanismo de coagulação do sangue e participa de reações inflamatórias agudas de maneira não específica (HARR, 2010). Antes da reabilitação, porém, não foi observada relação entre valores aumentados de fibrinogênio e resposta inflamatória dos animais avaliados.

Os níveis de fibrinogênio encontrados nos animais após a reabilitação foram menores que os observados por Villouta, Hargreaves e Rtvros (1997) em pinguins-de-humboldt saudáveis de cativeiro. Hawkey e Hart (1988) encontraram valores de fibrinogênio para pinguins-de-humboldt saudáveis de 0,2 a 0,53 g/dL e em animais da mesma espécie que apresentavam resposta inflamatória os valores foram de 0,4 a 0,55 g/dL. Segundo os autores, existe correlação entre processos inflamatórios e aumento de fibrinogênio nessas aves, entretanto esse aspecto não foi observado no presente estudo.

Análises sanguíneas, em combinação com outros métodos diagnósticos, permitem avaliar a saúde dos indivíduos e identificar os órgãos e sistemas afetados por doenças infecciosas, deficiências nutricionais e estresse crônico. Também fornecem informações sobre a hematopoiese e a imunidade do animal (NEWMAN *et al.*, 2000), sendo importantes ferramentas na avaliação do processo de reabilitação de pinguins-de-magalhães recebidos no litoral do sul do Brasil.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que os parâmetros hematológicos refletem o estado de saúde em pinguins-de-magalhães, sendo importantes na avaliação da condição de saúde e probabilidade de sobrevivência destes durante a reabilitação.

5 CONCLUSÃO

O escore corporal apresenta correlação positiva com hematócrito e PPT, e correlação negativa com relação H/L.

Presença de anemia em pinguins-de-magalhães na pré-reabilitação indica que pode haver maior chance de óbito.

Pinguins com maior relação H/L ($3,87 \pm 0,57$) antes da reabilitação possivelmente possuem mais chance de óbito do que aqueles com menor relação H/L ($2,20 \pm 0,30$).

A relação H/L é essencial para a avaliação da condição de saúde e da probabilidade de sobrevivência de pinguins-de-magalhães à reabilitação.

O fornecimento de sardinhas suplementadas para os animais durante a reabilitação parece ser mais eficaz para a devida recuperação e posterior soltura.

Os parâmetros hematológicos obtidos dos animais após a reabilitação podem ser utilizados como valores de referência para pinguins-de-magalhães em cativeiro e como parâmetros para soltura (ANEXO 4).

REFERÊNCIAS

ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. O. Patologia clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 939-966.

ANDRADE, G. Q.; BISPO, E. S.; DRUZIAN, J. I. Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 721-726, 2009.

CAMPBELL, T. W. Hematology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine - Principles and application**. 1.ed. Florida: Wingers Publishing, 1994. p. 176-198.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de aves. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007b. p. 215-247.

CATTANI, A. P. *et al.* Avaliação da ictiofauna da fauna acompanhante da pesca do camarão sete-barbas do município de Pontal do Paraná, litoral do Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 247-260, 2011.
2011

COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, Oxford, v. 22, p. 760-772, 2008.

FAIR, J.; WHITAKER, S.; PEARSON, B. Sources of variation in haematocrit in birds. **Ibis - The International Journal of Avian Science**, London, v. 149, p. 535-552, 2007.

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

GANDINI, P.; FRERE, E.; BOERSMA, P. D. Status and conservation of the magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* in Patagonia, Argentina. **Bird Conservation International**, Cambridge, v. 6, p. 307-316, 1998.

HARR, K. E. Overview of avian hemostasis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 703-708.

HAWKEY, C. M.; HART, M. G. An analysis of the incidence of hyperfibrinogenaemia in birds with bacterial infections. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 17, n. 2, p. 427-432, 1988.

HAWKEY, C. M.; HORSLEY, D. T.; KEYMER, I. F. Haematology of wild penguins (sphenisciformes) in the Falkland Islands. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 18, p. 495-502, 1989.

HAWKEY, C. M. *et al.* Haematological findings in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 14, p. 251-256, 1985.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febinger, 1986.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. Aids to diagnosis. In: COLES, B. H. **Essentials of avian medicine and surgery**. 3.ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 56-102.

MALLORY, M. L. *et al.* Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: A case for gathering multiple proxies of seabird health. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 60, p. 7-12, 2010.

MARTINS, W. S.; OETTERER, M. Correlação entre o valor nutricional e o preço de oito espécies de pescado comercializadas no estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 277-282, 2010.

MILLAR, H. T.; SIMPSON, J. G.; STALKER, A. L. An evaluation of the heat precipitation method of fibrinogen estimation. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 24, p. 827-830, 1971.

MINOZZO, M. G. **Patê de pescado: Alternativa para incremento da produção nas indústrias pesqueiras**. 206 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, p. 501-522, 2008.

NETTO, A. D. P. *et al.* Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NEWMAN, S. H. *et al.* An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated american coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. **Environmental Pollution**, Barking, v. 107, p. 295-304, 2000.

PINHATTI, V. R. *et al.* Determinação de danos basais no DNA de araras canindé (*Ara ararauna*) através do teste de micronúcleos: uma ferramenta na avaliação da saúde animal e seu uso no biomonitoramento da poluição ambiental. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 313-317, 2006.

PÜTZ, K. *et al.* Winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southernmost distributional range. **Marine Biology**, Berlin, v. 152, p. 1227-1235, 2007.

ROCHA, A. M. **Avaliação de anormalidades nucleares eritrocitárias em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* Foster)**. 40 f. Trabalho de Graduação (Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

RODRIGUES, S. C. *et al.* Surviving probability indicators of landing juvenile magellanic penguins arriving along the southern Brazilian coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 419-424, 2010.

SERGEANT, N.; ROGERS, T.; CUNNINGHAM, M. Influence of biological and ecological factors on hematological values in wild little penguins, *Eudyptula minor*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 138, Part A, p. 333-339, 2004.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (pinguim). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 309-323.

SOPEZKI, M. S. *et al.* Estudo da relação heterófilo/linfócito como marcador de estresse em pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). In: Congresso de Iniciação Científica, 16., 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPel, 2007.

TRAVIS, E. K. *et al.* Hematology, serum chemistry, and serology of galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 3, p. 625-632, 2006.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 152-161.

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

VLECK, C. M. *et al.* Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living adélie penguins. **The Condor**, New Mexico, v. 102, n. 2, p. 392-400, 2000.

WALLACE, R. S. *et al.* Hematology and plasma chemistry values in free-ranging humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. **Zoo Biology**, Brookfield, v. 14, p. 511-316, 1995.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Leipzig, v. 51, n. 31, p. 32-49, 1933.

ZINKL, J. G. Avian hematology. In: JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febinger, 1986.

CAPÍTULO II

PARÂMETROS CLÍNICOS E DE BIOQUÍMICA SÉRICA DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO

CLINICAL AND SERUM BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MAGELLANIC PENGUINS (*Spheniscus magellanicus*) PRE- AND POST-REHABILITATION

RESUMO

Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) são frequentes na plataforma continental do sul do Brasil e Uruguai durante o inverno e geralmente chegam fracos e debilitados. Exames de bioquímica clínica são úteis na avaliação da saúde e diagnóstico de doenças em aves. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de bioquímica sérica de pinguins-de-magalhães jovens e adultos no PROAMAR e no CETAS-SC, relacionando esses resultados com o estado de saúde. No Paraná, foram avaliados 10 pinguins na pré e sete na pós-reabilitação e em Santa Catarina, 29 animais foram avaliados após a reabilitação. Determinou-se os níveis de ácido úrico, uréia, proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, colesterol, γ -glutamil transferase (GGT), aspartato amino transferase (AST), creatina quinase (CK), fosfatase alcalina (FA) e lactato desidrogenase (LDH). Na pré-reabilitação foram encontrados valores de uréia elevados e de proteínas totais reduzidos, o que indica que os animais estavam desidratados e desnutridos, condição fundamental que deve ser avaliada nos animais durante a reabilitação. Os parâmetros obtidos dos animais do CETAS-SC, com médias variando de 7,88 a 9,36 mg/dL de ácido úrico; 12,31 a 13,59 mg/dL de uréia; 5,68 a 5,94 g/dL de proteínas totais; 2,07 a 2,14 g/dL de albumina; 3,54 a 3,87 g/dL de globulinas; 180,7 a 312,3 mg/dL de glicose; 200 a 223,6 mg/dL de colesterol; 10,97 a 13,83 U/L de GGT; 157,5 a 169,6 U/L de AST; 317,6 a 327,3 U/L de CK; 95,65 a 106,8 U/L de FA; e 826,5 a 972,5 U/L de LDH, podem ser utilizados como valores de referências para pinguins-de-magalhães em cativeiro e como parâmetros para soltura.

Palavras-chave: bioquímicos; desidratação; enzimas; pinguim; proteína.

ABSTRACT

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) are common on the continental shelf of southern Brazil and Uruguay during the winter and usually arrive weak and debilitated. Clinical biochemistry tests are useful in assessing the health and diagnose diseases in birds. The aim of this study was to determine the profile of serum biochemistry of young and adult Magellanic penguins in PROAMAR and CETAS-SC, relating these results with the state of health. In Paraná, 10 penguins were evaluated pre and seven post-rehabilitation, and in Santa Catarina, 29 animals were evaluated after rehabilitation. It was determined the levels of uric acid, urea, total protein, albumin, globulin, glucose, cholesterol, γ -glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH). In the pre-rehabilitation values of urea were elevated and total protein reduced, indicating that the animals were dehydrated and malnourished, a fundamental condition that must be evaluated in animals during rehabilitation. The parameters obtained from the animals of CETAS-SC, with averages ranging from 7.88 to 9.36 mg/dL of uric acid; 12.31 to 13.59 mg/dL of urea; 5.68 to 5.94 g/dL of total protein; 2.07 to 2.14 g/dL of albumin; 3.54 to 3.87 g/dL of globulin; 180.7 to 312.3 mg/dL of glucose; 200 to 223.6 mg/dL of cholesterol; 10.97 to 13.83 U/L of GGT; 157.5 to 169.6 U/L of AST; 317.6 to 327.3 U/L of CK; 95.65 to 106.8 U/L of ALP; and 826.5 to 972.5 U/L of LDH, can be used as reference values for Magellanic penguins in captivity and as release parameters.

Key-words: biochemistry; dehydration; enzymes; penguin; protein.

1 INTRODUÇÃO

Pingüins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* – Forster, 1781) reproduzem-se durante o verão na região da Patagônia e Ilhas Malvinas, e no inverno migram para o norte, chegando à plataforma continental do sul do Brasil e Uruguai (GANDINI, FRERE e BOERSMA, 1998; PÜTZ *et al.*, 2007). Os animais que chegam às praias do Brasil geralmente estão fracos e debilitados (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Exames de bioquímica clínica são ferramentas importantes para auxiliar na avaliação da saúde e diagnóstico de doenças em aves, pois os sinais clínicos nesses animais são frequentemente sutis (COLES, 1986; HOCHLEITHNER, 1994; SCHMIDT *et al.*, 2007). Parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para avaliar as condições dos diferentes sistemas do organismo das aves (HARR, 2002; SCHMIDT *et al.*, 2007).

Para avaliação da função renal nas aves, as análises bioquímicas mais indicadas são o ácido úrico e a uréia (LIERZ, 2003). Distúrbios na função renal

podem levar ao aumento na concentração sérica do ácido úrico (LUMEIJ, 2008). A concentração da uréia sanguínea é influenciada pela ingestão de proteínas, pela taxa de excreção renal e pelo estado do fígado, que é o órgão responsável pela sua síntese (SCHMIDT *et al.*, 2007).

As disfunções hepáticas podem ser avaliadas pela determinação das enzimas séricas aspartato amino transferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT) e pelo proteinograma, com a determinação da albumina e das proteínas totais (FUDGE, 2000; HARR, 2002).

As proteínas plasmáticas estão envolvidas em diversos processos no organismo, desde o transporte de substâncias no plasma até a resposta imune (JAIN, 1986). Muitas dessas proteínas, com exceção das imunoglobulinas, são sintetizadas no fígado. Por isso, a determinação da concentração de proteínas plasmáticas tem valor diagnóstico para doenças gastrintestinais, hepáticas ou renais (HOCHLEITHNER, 1994).

No estudo realizado por Najle *et al.* (2006), verificou-se que os níveis das diferentes proteínas plasmáticas em pinguins podem variar conforme sua exposição a substâncias tóxicas (especialmente hepatotóxicas).

A enzima lactato desidrogenase (LDH) tem funções ligadas à glicólise, e está presente na maioria dos tecidos de aves (HARR, 2002). Elevada atividade desta enzima pode ser observada em lesões musculares e hepáticas (HOCHLEITHNER, 1994), apesar de ter baixa especificidade para o fígado (HARR, 2002).

Outras dosagens enzimáticas úteis para avaliação da saúde de aves são a creatina quinase (CK) e a fosfatase alcalina (FA). Os níveis séricos da CK e da AST são utilizados para detectar e monitorar doenças musculares (FUDGE, 2000). A FA possui atividade no duodeno e nos rins, e pode estar aumentada em casos de lesões em vários tecidos (HOCHLEITHNER, 1994). O aumento nos níveis de FA também é importante em casos de excesso de atividade osteoblástica e alterações ósseas (HARR, 2002).

O colesterol é um elemento importante como precursor de hormônios esteróides e ácidos biliares, além de ser um componente de membrana celular. Este elemento é sintetizado no fígado, e é útil na avaliação da função e integridade deste órgão (HOCHLEITHNER, 1994).

A glicose é continuamente requerida como fonte de energia por todas as células do organismo, e deve ser mantida em níveis adequados no plasma, para atender a esta demanda (HOCHLEITHNER, 1994). A hiperglicemia em aves é induzida por níveis elevados de glicocorticóides endógenos ou exógenos, sendo observada nos casos de estresse (FUDGE, 2000; MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2007). A hipoglicemia pode ocorrer por disfunção hepática, redução na ingestão e/ou produção, septicemia e ainda por utilização excessiva (HOCHLEITHNER, 1994; MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2007).

Para a correta interpretação de resultados obtidos nas análises bioquímicas é necessário dispor de valores de referência, porém, existem poucos estudos que incluem a avaliação de bioquímica clínica em pinguins (WALLACE *et al.*, 1995; VILLOUTA, HARGREAVES e RIVEROS, 1997; TRAVIS *et al.*, 2006).

No estudo realizado por Villouta, Hargreaves e Riveros (1997) os parâmetros bioquímicos em pinguim-de-humboldt (*Spheniscus humboldti*) foram avaliados conforme o tempo de cativeiro dos animais e Wallace *et al.* (1995) avaliaram os parâmetros de bioquímica sérica de pinguins da mesma espécie de vida livre capturados na costa do Chile.

Travis *et al.* (2006) determinaram os valores de bioquímica sérica para pinguim-de-galápagos (*Spheniscus mendiculus*) de vida livre, e além disso, realizaram testes sorológicos para doenças previamente detectadas em outras espécies de aves endêmicas das ilhas Galápagos, no Equador.

No estudo de Alonso-Alvarez *et al.* (2003) foram analisadas as variações dos parâmetros de bioquímica sérica em pinguins-de-barbicha (*Pygoscelis antarctica*) durante períodos de jejum.

Para pinguins-de-magalhães não foram encontrados trabalhos que incluíssem parâmetros de bioquímica sérica, embora sejam úteis na avaliação da saúde de animais antes e após a reabilitação (NEWMAN *et al.*, 2000). O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de bioquímica sérica de pinguins-de-magalhães jovens e adultos, antes e após a reabilitação realizada nos centros de recuperação do Paraná e Santa Catarina, relacionando esses resultados com o estado de saúde dos animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAIS E ANIMAIS

O estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira foram utilizados pinguins-de-magalhães que chegaram ao município de Pontal do Paraná-PR e que foram recebidos no Projeto de Estudos e Recuperação de Aves, Mamíferos e Répteis (PROAMAR), do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (UFPR) no ano de 2010.

Foram acompanhados 10 animais durante o período de reabilitação, que durou de uma semana a dois meses dependendo do caso, até que se procedeu à soltura ou ocorreu óbito. Foram coletadas amostras de sangue antes (até dois dias depois da chegada do animal) e após o período de reabilitação. Os animais foram recebidos nos meses de junho a outubro, sendo as coletas do início da reabilitação realizadas nesses meses, e as coletas do final da reabilitação nos meses de agosto a outubro.

O manejo nutricional dos animais no PROAMAR é realizado da seguinte forma: Os pinguins recebem um ou dois peixes por dia nos primeiros dias da reabilitação e essa quantidade é gradativamente aumentada até chegar a cerca de 500 g de peixes por dia. Os animais recebem peixes de descarte da pesca do camarão, ou sardinha congelada quando não há disponibilidade desses peixes. É feita a suplementação com tiamina (vitamina B1) (doses de 75 mg cinco vezes por semana) e vitaminas A (0,25 ml duas vezes por semana) e E (0,5ml uma vez por semana). Animais muito debilitados recebem alimento liquefeito com a mesma suplementação.

Os critérios para soltura após a reabilitação no PROAMAR são baseados na avaliação do estado geral dos animais, que inclui peso e condição adequada das penas (sem falhas ou lesões), postura e bom desempenho na piscina.

A segunda etapa do estudo foi executada no município de Florianópolis-SC e utilizou 29 pinguins-de-magalhães jovens e adultos recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Santa Catarina (CETAS-SC), da Polícia Militar Ambiental e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) no ano de 2011. Esses animais passaram por reabilitação com duração de um a dois meses. No final desse período foram coletadas amostras de sangue para realização dos exames bioquímicos. Os animais foram recebidos no

CETAS-SC nos meses de junho a setembro, e as coletas do final da reabilitação foram realizadas de setembro a novembro.

No CETAS-SC o manejo nutricional é realizado de forma diferente do PROAMAR. São fornecidos cerca de oito (500 g) de sardinha congelada por dia para cada animal, suplementados com tiamina (doses de 75 mg três vezes por semana). Quando debilitados, os animais podem receber até 10 sardinhas por dia e hidratação oral, quando prostrados recebem Potenay Gold B12® (1ml) e Ferrodex® injetável (1ml) em duas doses, com intervalo de uma semana.

Os parâmetros para soltura no CETAS-SC são baseados no exame clínico completo dos animais (com ênfase na auscultação) e são utilizados os critérios da IFAW (“International Found for Animal Welfare”), que consideram o estado geral dos animais, o estado de impermeabilização das penas, o hematócrito mínimo de 38%, valor de leucócitos no tubo capilar máximo de 2% e a proteína plasmática total igual ou superior a 3 g/dL.

Em ambos os locais é realizada a vermifugação após a estabilização dos animais. O tratamento é feito com o vermífugo oral Drontal Plus®, em duas administrações (doses de 1/4 de comprimido de 660 mg) com intervalo de 15 dias.

O manejo sanitário dos recintos também é realizado de maneira semelhante nos dois centros, com limpeza diária do recinto e da piscina com água e hipoclorito de sódio.

2.2 EXAME FÍSICO E COLETA DE AMOSTRAS

O exame físico foi realizado sob contenção física, com verificação das mucosas oral e oculares, inspeção do corpo a procura de ferimentos e marcas de óleo e pesagem.

As coletas de sangue foram realizadas após jejum de 8 horas (PROAMAR) e de 24 horas (CETAS-SC) por punção da veia metatársica medial. Foram coletados de 1 a 3 mL de sangue de cada animal e as amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante.

2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para processamento.

Após retração do coágulo, realizou-se a centrifugação das amostras a 5000 RPM por 5 minutos para separação do soro. Foram então realizadas as análises, utilizando o Analisador de Química Clínica Automatizado BS 200 da Mindray®.

Foram dosados os seguintes parâmetros: uréia (UV Enzimático: Urease-GLDH); ácido úrico (método da uricase/peroxidase); proteínas totais (método do biureto); albumina (método do verde de bromo cresol); globulinas (calculadas, reduzindo os níveis de albumina do valor das proteínas totais); glicose (glicose oxidase); colesterol (hidrólise enzimática e oxidação); γ -glutamil transferase (GGT) (método cinético-colorimétrico); aspartato amino transferase (AST) (método cinético-UV); creatina quinase (CK) (método UV otimizado); fosfatase alcalina (FA) (método cinético colorimétrico); e lactato desidrogenase (LDH) (método cinético UV).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros bioquímicos e de massa corporal foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste T de Student mediante o programa BioEstat (versão 5.0).

3 RESULTADOS

Os 10 pinguins recebidos no PROAMAR em 2010 eram jovens e apresentavam-se debilitados antes da reabilitação. No exame físico desses animais verificou-se que todos apresentavam diarreia de coloração esverdeada. Além disso, dois animais apresentavam lesões de pele sugestivas de trauma e outros dois tinham sinais de contaminação por óleo. Desses pinguins, sete sobreviveram e estavam clinicamente saudáveis antes da soltura.

O volume de soro obtido dos animais acompanhados no Paraná antes e após a reabilitação não foi suficiente para todas as análises, portanto, foram realizadas as dosagens de uréia, ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulinas, glicose e colesterol.

Dos 29 pinguins-de-magalhães recebidos e reabilitados no CETAS-SC em 2011, 19 eram adultos e 10 eram jovens e todos estavam clinicamente sadios no momento da coleta.

Os resultados dos exames de bioquímica clínica dos animais do Paraná (pré e pós-reabilitação) e de Santa Catarina (pós-reabilitação) estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS DE BIOQUÍMICA SÉRICA NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) JOVENS E ADULTOS RECEBIDOS NO PROAMAR E NO CETAS-SC.

Parâmetros*	Paraná		Santa Catarina	
	Jovens (pré-reabilitação)	Jovens (pós-reabilitação)	Jovens (pós-reabilitação)	Adultos (pós-reabilitação)
Massa corporal (Kg)	2,32 ± 0,13 ^a	2,78 ± 0,17 ^b	3,47 ± 0,14 ^c	3,5 ± 0,08 ^c
Ácido Úrico (mg/dL)	19,34 ± 2,94 ^a	17,26 ± 2,39 ^a	9,36 ± 1,14 ^b	7,88 ± 0,73 ^b
Uréia (mg/dL)	17,78 ± 4,79 ^a	14,37 ± 4,03 ^a	12,31 ± 0,73 ^a	13,59 ± 0,57 ^a
Proteínas Totais (g/dL)	4,34 ± 0,37 ^a	5,74 ± 0,24 ^b	5,94 ± 0,35 ^b	5,68 ± 0,14 ^b
Albumina (g/dL)	2,45 ± 0,15 ^a	2,78 ± 0,26 ^a	2,07 ± 0,04 ^b	2,14 ± 0,02 ^b
Globulinas (g/dL)	2,7 ± 0,1 ^a	2,96 ± 0,11 ^a	3,87 ± 0,31 ^b	3,54 ± 0,13 ^b
Glicose (mg/dL)	193,2 ± 10,22 ^a	180,7 ± 11,64 ^a	203,3 ± 8,15 ^a	312,3 ± 99,65 ^a
Colesterol (mg/dL)	209,6 ± 22,68 ^a	212,0 ± 16,3 ^a	223,6 ± 12,43 ^a	200,0 ± 8,31 ^a
GGT ¹ (U/L)	-	-	13,83 ± 2,17 ^a	10,97 ± 1,21 ^a
AST ² (U/L)	-	-	169,6 ± 16,5 ^a	157,5 ± 12,78 ^a
CK ³ (U/L)	-	-	327,3 ± 27,42 ^a	317,6 ± 28,85 ^a
FA ⁴ (U/L)	-	-	106,8 ± 12,22 ^a	95,65 ± 7,54 ^a
LDH ⁵ (U/L)	-	-	972,5 ± 102,2 ^a	826,5 ± 61,57 ^a

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

^{abc} Letras diferentes em uma mesma linha indicam significância estatística (p<0,05).

¹GGT - γ-Glutamil transferase; ²AST - Aspartato amino transferase; ³CK - Creatina quinase; ⁴FA - Fosfatase alcalina;

⁵LDH - Lactato desidrogenase.

Nos animais recebidos no Paraná, houve diferença significativa (p<0,05) entre a pré e a pós-reabilitação nos valores de massa corporal e proteínas totais.

Comparando-se os dados obtidos na pós-reabilitação dos pinguins no PROAMAR e no CETAS-SC, houve diferença significativa (p<0,05) entre a massa corporal, ácido úrico, albumina e globulinas.

Na pós-reabilitação dos animais de Santa Catarina, não houve diferença significativa (p>0,05) entre jovens e adultos em nenhum dos parâmetros bioquímicos e massa corporal.

Após a reabilitação, os animais do Paraná tiveram massa corporal significativamente maior ($p < 0,05$) que na pré-reabilitação, porém esse valor não atingiu a massa corpórea dos animais de Santa Catarina pós-reabilitação, sendo também significativamente diferente ($p < 0,05$) (FIGURA 4).

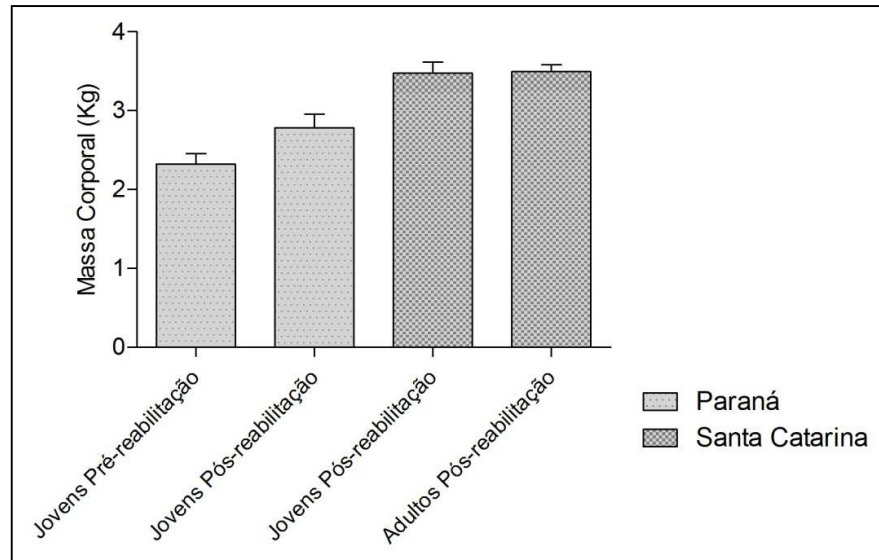


FIGURA 4 – MASSA CORPORAL NA PRÉ E PÓS-REABILITAÇÃO DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) JOVENS E ADULTOS NO PARANÁ E EM SANTA CATARINA.

4 DISCUSSÃO

Com relação à massa corporal, os animais do Paraná tiveram ganho significativo ($p < 0,05$) entre a pré e a pós-reabilitação, indicando que houve recuperação do estado corporal durante o período em que os animais foram acompanhados. A massa corporal está altamente correlacionada com as massas dos órgãos e com depósitos lipídicos, portanto, este é um índice eficaz para avaliar o estado nutricional e de saúde das aves (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Apesar dessa recuperação observada nos animais do Paraná, o valor da massa corporal após a reabilitação foi significativamente menor ($p < 0,05$) que nos animais de Santa Catarina. Isso possivelmente se deve ao manejo nutricional, que foi diferente entre os dois locais. Os animais do PROAMAR recebiam especialmente peixes do descarte da pesca de camarão. As espécies de peixes *Cynoscion* spp. e *P. brasiliensis*, fornecidas aos animais nesse caso, possuem menor teor de proteínas, lipídeos e calorias do que as sardinhas (ANDRADE, BISPO e DRUZIAN,

2009; MARTINS e OETTERER, 2010; MINOZZO, 2010), que foram o alimento fornecido aos animais do CETAS-SC.

Os valores de ácido úrico obtidos dos animais pós-reabilitação em Santa Catarina foram semelhantes aos valores encontrados em pinguins-de-humboldt de cativeiro (VILLOUTA, HARGREAVES e RIVEROS, 1997). Em outro estudo com pinguins-de-humboldt em vida livre, foram encontrados valores menores para ácido úrico (WALLACE *et al.*, 1995) e em pinguins-de-galápagos os valores foram de 18,64 mg/dL (TRAVIS *et al.*, 2006), maiores que os encontrados no presente estudo.

O ácido úrico é o principal produto do metabolismo de nitrogênio em aves (HARR, 2002) e diversos fatores podem influenciar nas concentrações sanguíneas desse metabólito, como a espécie, idade, hidratação e dieta (CAMPBELL, 2007a).

Animais jovens tendem a apresentar maiores concentrações de ácido úrico do que adultos (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a), o que foi observado nos animais recebidos no CETAS-SC, apesar de não haver diferença significativa entre esses valores.

Na pós-reabilitação dos animais acompanhados no Paraná, os valores de ácido úrico foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que nos animais de Santa Catarina. Apesar de a dieta fornecida aos pinguins do PROAMAR possuir um menor teor de proteínas, também possui menos calorias, o que pode induzir o consumo de compostos nitrogenados do próprio organismo causando um aumento nos níveis de ácido úrico (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a; KRAUTWALD-JUNGHANN, 2007). Em casos de inanição isso também pode ocorrer, sendo possivelmente o motivo pelo qual os níveis de ácido úrico estavam aumentados também nos animais da pré-reabilitação no Paraná.

Alonso-Alvarez *et al.* (2003) estudaram o efeito do jejum em parâmetros bioquímicos de pinguins-de-barbicha. No primeiro dia de jejum os valores de ácido úrico foram semelhantes aos obtidos para os pinguins-de-magalhães do CETAS-SC. Porém, ao 11º dia de jejum, o ácido úrico estava elevado, com valor médio de 18,64 mg/dL, valor próximo ao encontrado nos animais do PROAMAR. Esses resultados demonstram que os animais do Paraná, mesmo após a reabilitação, apresentavam certo grau de debilidade.

Os valores de uréia dos pinguins antes da reabilitação no Paraná foram superiores aos de 3,47 mg/dL de pinguins-de-humboldt em cativeiro (VILLOUTA,

HARGREAVES e RIVEROS, 1997) e de 3,43 mg/dL em vida livre (WALLACE *et al.*, 1995).

A concentração de uréia tem pouco valor diagnóstico para as aves quando comparada ao ácido úrico (AMAND, 1986; CAMPBELL, 2007a). Porém, como sua eliminação depende do estado de hidratação do animal, pode ser útil para detectar diminuição da perfusão arterial renal (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a; LUMEIJ, 2008).

Nos animais pré-reabilitação no Paraná, os valores de uréia foram elevados possivelmente devido ao jejum prolongado e/ou desidratação. Durante o jejum, a perda de energia está relacionada com a depleção de gorduras e mobilização de proteínas, o que pode aumentar os teores de uréia (CAMPBELL, 2007a). No caso de aves desidratadas, quase toda a uréia filtrada pelos glomérulos é reabsorvida nos túbulos renais (HOCHLEITHNER, 1994; KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007). No trabalho de Alonso-Alvarez *et al.* (2003) com pinguins-de-barbicha, os valores de uréia foram de 17,7 mg/dL após 11 dias de jejum, similares aos obtidos nos animais do presente estudo.

Os resultados obtidos dos animais de Santa Catarina podem ser considerados como valores de referência para pinguins-de-magalhães em cativeiro. Mesmo sendo diferentes dos valores obtidos em pinguins-de-humboldt (WALLACE *et al.*, 1995; VILLOUTA, HARGREAVES e RIVEROS, 1997), o desvio padrão observado nesses resultados demonstra que os indivíduos apresentavam condições corporais semelhantes.

Nos animais do Paraná após a reabilitação, os valores de uréia foram estatisticamente semelhantes aos de Santa Catarina, apesar disso, o desvio padrão observado nos resultados desses animais foi alto, o que demonstra uma variação na sua condição corporal. Valores altos de uréia também podem ter ocorrido nesses animais por um efeito pós-prandial. Segundo Lumeij (2008) pode ocorrer aumento da uréia no período pós-prandial em rapinantes e aves piscívoras (como pinguins), possivelmente devido à alimentação altamente proteica, por isso, o autor recomenda que o jejum antes da coleta nesses animais seja de 24 horas.

Os valores de proteínas totais obtidos dos animais pós-reabilitação foram semelhantes aos de pinguins-de-humboldt de cativeiro (VILLOUTA, HARGREAVES e RIVEROS, 1997) e vida-livre (WALLACE *et al.*, 1995), e pinguins-de-galápagos de vida-livre (TRAVIS *et al.*, 2006).

O teor plasmático normal de proteínas é essencial para a manutenção da pressão osmótica coloidal normal, que preserva o pH e o volume sanguíneo normais (CAMPBELL, 2007a). Os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais nas aves são: idade, sazonalidade, condições de manejo e doenças (LUMEIJ, 2008). Esse parâmetro é frequentemente utilizado como um indicador do estado geral de saúde e pode ter valor no diagnóstico de doenças hepáticas, gastrointestinais ou renais. Além disso, podem indicar presença de doenças infecciosas, com estimulação do sistema imunológico (HOCHLEITHNER, 1994).

Nos animais do Paraná antes da reabilitação os valores de proteínas totais foram significativamente menores ($p < 0,05$) do que nos animais reabilitados. A hipoproteinemia pode estar associada à hypoalbuminemia, comum em casos de desnutrição ou doença hepática grave, ou à hipoglobulinemia, o que pode indicar imunodeficiência (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a).

Os valores de albumina e de globulinas dos animais após a reabilitação no CETAS-SC foram semelhantes aos obtidos em pinguins-de-humboldt com sete semanas de cativeiro (VILLOUTA, HARGREAVES e RIVEROS; 1997).

Nos pinguins do Paraná, pré e pós-reabilitação, os valores de albumina foram significativamente maiores ($p < 0,05$) e os de globulinas, significativamente menores ($p < 0,05$) que dos animais de Santa Catarina. Esse perfil de hiperalbuminemia e hipoglobulinemia pode indicar um quadro de desidratação ou imunodeficiência (CAMPBELL, 2007a).

Os valores de glicemia dos pinguins pré e pós-reabilitação foram semelhantes aos obtidos por Villouta, Hargreaves e Riveros (1997) em pinguins-de-humboldt em cativeiro, por Wallace *et al.* (1995) em pinguins-de-humboldt de vida livre e por Travis *et al.* (2006) em pinguins-de-galápagos de vida livre. Mendes-de-Almeida *et al.* (2007) encontraram valores de glicose sérica em pinguins-de-magalhães sadios de cativeiro variando de 182 a 222 mg/dL, níveis próximos aos dos animais do presente estudo. Os autores consideraram esses valores de glicemia normais para animais dessa espécie mantidos em cativeiro.

Os animais acompanhados no Paraná possivelmente passaram por um período longo de jejum antes da reabilitação, e apesar disso, não apresentaram hipoglicemia. Períodos de jejum de até oito dias em aves sadias não diminuem a utilização de glicose, como nos mamíferos. No caso de jejum prolongado, a glicose é

derivada da quebra de gorduras e proteínas, principalmente do tecido muscular, por meio da gliconeogênese no fígado e rins (HOCHLEITHNER, 1994).

Os valores de colesterol antes e após a reabilitação foram semelhantes a valores obtidos em pinguins-de-humboldt (WALLACE *et al.*, 1995) e em pinguins-de-barbicha (ALONSO-ALVAREZ *et al.*, 2003) de vida livre.

O colesterol pode ser sintetizado por vários tecidos do organismo, mas o fígado é o órgão principal de síntese dessa substância. Variações nos níveis de colesterol podem ser causadas pela dieta ou por insuficiência hepática, obstrução biliar extra-hepática, fibrose hepática e hiperplasia de ductos biliares (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a; LUMEIJ, 2008).

Os valores de GGT obtidos dos animais pós-reabilitação em Santa Catarina foram de $13,83 \pm 2,17$ U/L para animais jovens e $10,97 \pm 1,21$ U/L para adultos. Não foram encontrados estudos incluindo a dosagem dessa enzima em pinguins, porém, segundo Harr (2002) os valores normais em aves variam de 0 a 10 U/L.

A GGT é uma enzima de membrana associada a vários tecidos. O aumento dos níveis sanguíneos indica lesão hepática ativa, porém, níveis dentro dos valores de referência não garantem o funcionamento normal do fígado (FUDGE, 2000).

Os níveis de AST encontrados nos animais do CETAS-SC foram superiores ao valor de $128,4 \pm 59$ U/L para pinguins-de-humboldt de cativeiro (VILLOUTA, HARGREAVES e RIVEROS, 1997) e inferiores ao valor de $206,8 \pm 88,23$ U/L encontrado em pinguins-de-humboldt de vida livre (WALLACE *et al.*, 1995).

A AST possui alta atividade no fígado de aves, porém esta enzima também está presente em músculo esquelético e cardíaco, cérebro e rins, em níveis que variam conforme a espécie (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a). Embora a AST não seja específica do fígado, é considerada a melhor enzima para indicar doença hepática (KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007). Mesmo assim, é importante que seja associada a uma enzima músculo-específica, para que seja possível diferenciar dano hepático ou muscular (HARR, 2002; SCHMIDT *et al.*, 2007).

A CK é a enzima utilizada para avaliar a função muscular das aves (CAMPBELL, 2007a; LUMEIJ, 2008). O aumento na sua concentração indica lesão muscular e o aumento marcante está relacionado com miopatia de contenção. Nesta condição a atividade da AST não aumenta significativamente (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a; KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007).

Os valores de CK encontrados nos animais após a reabilitação em Santa Catarina foram de $327,3 \pm 27,42$ U/L para pinguins jovens e $317,6 \pm 28,85$ U/L para adultos, sendo maiores que os encontrados por Wallace *et al.* (1995) em pinguins-de-humboldt de vida livre e por Travis *et al.* (2006) em pinguins-de-galápagos de vida livre. Segundo Campbell (2007a), porém, os valores normais de CK em aves podem variar de 100 a 500 U/L.

Os valores de FA obtidos nos animais pós-reabilitação no CETAS-SC foram de $106,8 \pm 12,22$ U/L em jovens e $95,65 \pm 7,54$ U/L em adultos, semelhante ao valor de $101,2 \pm 56,19$ U/L encontrado em pinguins-de-humboldt de vida livre (WALLACE *et al.*, 1995).

A fosfatase alcalina plasmática nas aves resulta primariamente de atividade osteoblástica. Assim, aumento nos teores desta enzima pode ocorrer durante crescimento ósseo, reparação de fraturas, osteomielites, neoplasias e condição pré-ovulatória (CAMPBELL, 2007a; KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007). A atividade desta enzima é maior em aves jovens do que em adultas (HOCHLEITHNER, 1994), o que foi observado nos animais do presente estudo, apesar de não haver diferença significativa entre os valores de pinguins jovens e adultos.

Os valores de LDH encontrados para os pinguins do CETAS-SC foram de $972,5 \pm 102,2$ U/L em animais jovens e $826,5 \pm 61,57$ U/L em adultos, e podem ser considerados como de referência para pinguins-de-magalhães em cativeiro, pois não foram encontrados estudos que incluíssem essa dosagem. Segundo Krautwald-Junghanns (2007), existe grande variação dos níveis normais de LDH para as diferentes espécies de aves. Para a maioria os níveis variam de 46 a 442 U/L, porém, para algumas espécies, os valores normais podem chegar a 2.000 U/L.

O aumento dos teores plasmáticos de LDH geralmente está associado a distúrbios hepatocelulares ou musculares. Em relação à AST, a atividade da LDH aumenta e diminui mais rapidamente após danos hepáticos ou musculares, o que pode auxiliar no diagnóstico de problemas agudos (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2007a; KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007).

5 CONCLUSÃO

A desidratação e a desnutrição evidenciadas pelo aumento da uréia e pela redução das proteínas totais são aspectos importantes a serem avaliados e tratados na reabilitação de pinguins-de-magalhães.

A massa corporal e os parâmetros bioquímicos estão relacionados à dieta e ao manejo utilizado nos diferentes centros de reabilitação. E a dieta baseada no fornecimento de sardinhas com suplementação parece ser mais eficiente na recuperação dos animais.

Os parâmetros bioquímicos dos animais do CETAS-SC após a reabilitação podem ser utilizados como valores de referência para pinguins-de-magalhães em cativeiro e como parâmetros para soltura (ANEXO 5).

REFERÊNCIAS

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

AMAND, W. B. Avian clinical hematology and blood chemistry. In: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 264-276.

ANDRADE, G. Q.; BISPO, E. S.; DRUZIAN, J. I. Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 721-726, 2009.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica clínica de aves. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007a. p. 448-460.

COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986.

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

GANDINI, P.; FRERE, E.; BOERSMA, P. D. Status and conservation of the magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* in Patagonia, Argentina. **Bird Conservation International**, Cambridge, v. 6, p. 307-316, 1998.

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

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

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febinger, 1986.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. Aids to diagnosis. In: COLES, B. H. **Essentials of avian medicine and surgery**. 3.ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 56-102.

LIERZ, M. Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis, and therapy. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 6, p. 29-55, 2003.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 839-872.

MARTINS, W. S.; OETTERER, M. Correlação entre o valor nutricional e o preço de oito espécies de pescado comercializadas no estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 277-282, 2010.

MENDES-DE-ALMEIDA, F. *et al.* Avaliação da glicose sérica em pingüim de magalhães (*Spheniscus magellanicus* FOSTER, 1781) (Sphenicidae-aves) em cativeiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35 (Supl.2), p. 390-391, 2007.

MINOZZO, M. G. **Patê de pescado: Alternativa para incremento da produção nas indústrias pesqueiras**. 206 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

NAJLE, R. *et al.* The use of serum proteins as biological markers of contamination of gentoo *Pygoscelis papua* and adelia *P. adeliae* penguins. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Ciudad de México v. 22, n.3, p. 107-112, 2006.

NEWMAN, S. H. *et al.* An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated american coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. **Environmental Pollution**, Barking, v. 107, p. 295-304, 2000.

PÜTZ, K. *et al.* Winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southernmost distributional range. **Marine Biology**, Berlin, v. 152, p. 1227-1235, 2007.

RODRIGUES, S. C. *et al.* Surviving probability indicators of landing juvenile magellanic penguins arriving along the southern Brazilian coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 419-424, 2010.

SCHMIDT, E. M. S. *et al.* Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (pinguim). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 309-323.

TRAVIS, E. K. *et al.* Hematology, serum chemistry, and serology of galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 3, p. 625-632, 2006.

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

WALLACE, R. S. *et al.* Hematology and plasma chemistry values in free-ranging humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. **Zoo Biology**, Brookfield, v. 14, p. 511-316, 1995.

CAPÍTULO III

COLINESTERASE MUSCULAR EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*)

MUSCULAR CHOLINESTERASE IN MAGELLANIC PENGUINS (*Spheniscus magellanicus*)

RESUMO

Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) são comumente observados no Brasil durante o inverno, sendo que muitas vezes vão a óbito em decorrência da fraqueza, doenças ou contaminação por óleo. O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, entre eles, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. As colinesterases (ChE) são consideradas biomarcadores para organofosforados e carbamatos, porém estudos demonstram que diversos HPA são inibidores da ChE *in vitro*. O objetivo desse estudo foi determinar a atividade das colinesterases em tecido muscular de pinguins-de-magalhães que vieram a óbito durante a reabilitação no PROAMAR (CEM-UFPR). Foram avaliados 20 animais, sendo 14 de 2010 e seis de 2011, todos jovens. Os animais vieram a óbito devido à debilidade e nenhum apresentava sinais externos de contaminação por óleo. No tecido muscular desses pinguins ocorreu a hidrólise dos três tipos de substratos (iodetos de acetiltiocolina – AcSCh; de propioniltiocolina – PrSCh; e de butiriltiocolina – BuSCh), indicando a presença de acetilcolinesterase e de pseudocolinesterase. Os valores obtidos foram expressos em nmol/min/mg de proteína, sendo de $8,12 \pm 4,49$ para AcSCh, $8,66 \pm 5,02$ para BuSCh e $12,10 \pm 7,07$ para PrSCh. O escore corporal apresentou correlação negativa com as atividades das colinesterases musculares nesses animais. Para animais encontrados na costa paranaense sem sinais externos de contaminação por óleo, os valores obtidos no presente estudo podem servir como referência.

Palavras-chave: acetilcolinesterase; butirilcolinesterase; tecido; pinguim; pseudocolinesterase.

ABSTRACT

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) are commonly observed in Brazil during the winter, and often die as a result of weakness, disease or oil contamination. Oil is a complex mixture of hydrocarbons, including the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), which have mutagenic and carcinogenic properties. The cholinesterase (ChE) is considered biomarkers for organophosphates and carbamates, but many studies show that PAHs are *in vitro* inhibitors of ChE. The aim of this study was to determine the activity of cholinesterase in muscle tissue of Magellanic penguins that died during rehabilitation in PROAMAR (CEM-UFPR). There were 20 animals, 14 in 2010 and six in 2011, all young. The animals died due to a weak and showed no external signs of oil contamination. In the muscular tissue of these penguins were hydrolyzed the three types of substrate (acetylthiocholine – AcSCh; propionylthiocholine – PrSCh; and butyrylthiocholine – BuSCh, all as the iodides), indicating the presence of acetylcholinesterase and pseudo cholinesterase. The values obtained were expressed as nmol/min/mg protein, which were 8.12 ± 4.49 on AcSCh, 8.66 ± 5.02 on BuSCh and 12.10 ± 7.07 on PrSCh. The body condition score was negatively correlated with muscle cholinesterase activities in these animals. For animals found off the coast of Paraná with no external signs of oil contamination, the values obtained in this study can serve as a reference.

Key-words: acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; tissue; penguin; pseudo cholinesterase.

1 INTRODUÇÃO

Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* – Forster, 1781) são frequentemente encontrados no sul do Brasil e Uruguai durante o inverno (GANDINI, FRERE e BOERSMA, 1998; PÜTZ *et al.*, 2007), sendo que geralmente chegam debilitados e muitas vezes vão a óbito em decorrência da fraqueza, doenças ou contaminação por óleo (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os pinguins nadam em águas superficiais e são particularmente vulneráveis a derramamentos de petróleo, sendo menos capazes de detectar e evitar o contato com o óleo do que outras aves marinhas (GARCÍA-BORBOROGLU *et al.*, 2006).

O efeito primário do óleo em aves é penetrar na plumagem, permitindo que a água substitua o ar presente entre as penas e o animal perca boa parte de seu isolamento térmico, além de ficar mais pesado, o que reduz a capacidade de vôo, flutuação e natação (ISLAM e TANAKA, 2004). Além disso, a ingestão de alimento e de água contaminados é uma importante via de exposição (BURGER e GOCHFELD, 2004), que leva a efeitos sistêmicos. Segundo Oropesa *et al.* (2007), o efeito irritante

do petróleo pode reduzir a capacidade de absorção de nutrientes e contribuir para a caquexia e diarreia observadas em animais contaminados por óleo.

O petróleo é uma das mais importantes fontes de energia para a humanidade, mas ao mesmo tempo, é um dos principais causadores de poluição ambiental (ALEIXO, TACHIBANA e CASAGRANDE, 2007). O óleo cru é purificado e processado em refinarias para produzir uma série de combustíveis, lubrificantes e solventes. Durante estas operações pode ocorrer poluição contínua em pequena escala (ISLAM e TANAKA, 2004). Além disso, os poluentes derivados de petróleo podem entrar no ambiente por emissões naturais, descargas urbanas residenciais e industriais, além de acidentes (rodoviários, portuários, em refinarias, etc.) que, embora sejam os mais noticiados, não representam a maior fonte de introdução de óleo nos oceanos (ALEIXO, TACHIBANA e CASAGRANDE, 2007).

Há muitas evidências de que a poluição por óleo pode causar sérios efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos e nos organismos. A contaminação ambiental por óleo causa efeitos de curta e longa duração e traz prejuízos à saúde humana e animal, assim como às atividades socioeconômicas da região e ao ambiente em geral (ISLAM e TANAKA, 2004).

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e de pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, assim como baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos (PEDROZO *et al.*, 2002).

Existem três grupos principais de hidrocarbonetos no petróleo: parafínicos, naftênicos e aromáticos (PEDROZO *et al.*, 2002). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são uma classe de compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos condensados e por possuírem propriedades mutagênicas e carcinogênicas, têm sido amplamente estudados (DAVIS, 2008).

As colinesterases (ChE) são tradicionalmente consideradas como biomarcadores do efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos, pois esses atuam diretamente na sua função (MANAHAN, 2002). Porém, recentemente têm-se estudado outras substâncias que produzem efeitos semelhantes, como alguns metais pesados e produtos derivados de petróleo, especialmente os HPA (DAVIS, 2008).

Essas enzimas são classificadas em dois grupos: a colinesterase verdadeira (acetilcolinesterase – AChE) e a pseudocolinesterase (butirilcolinesterase – BChE) (ANDREESCU e MARTY, 2006).

A AChE é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina na sinapse colinérgica, dessa forma, a inibição dessa enzima leva ao acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas, resultando em estímulo excessivo dos receptores pós-sinápticos colinérgicos (VIARENGO *et al.*, 2007; DAVIS, 2008).

A função da pseudocolinesterase não está bem estabelecida, principalmente pelo fato de sua inibição não resultar em efeitos farmacológicos mesmo apresentando ampla distribuição em fígado, coração, cérebro, endotélio vascular, plasma e sistema nervoso. A estrutura molecular dessa enzima é semelhante a da AChE e ela é capaz de hidrolisar acetilcolina, porém com menor eficiência, além de outros substratos (ANDREESCU e MARTY, 2006; VIARENGO *et al.*, 2007).

Kang e Fang (1997) demonstraram que diversos HPA são inibidores fracos da AChE *in vitro*, estabelecendo a hipótese de que os HPA com três ou mais anéis aromáticos são inibidores mais potentes da AChE. Os HPA presentes no petróleo podem ter um ou mais anéis aromáticos, dependendo do tipo e origem do óleo (PEDROZO *et al.*, 2002)

A metodologia mais utilizada para determinação da atividade das ChE foi desenvolvida por Ellman *et al.* (1961) e baseia-se no princípio de fornecer um falso substrato para ser degradado pela enzima presente no material biológico. Acrescentando-se um cromógeno ao ensaio capaz de reagir com a colina, forma-se um ânion de cor amarela. A velocidade de produção da cor equivale à velocidade de degradação do falso substrato pela enzima da amostra, podendo ser mensurada por espectrofotometria em determinados comprimentos de onda (DAVIS, 2008; XAVIER e SPINOSA, 2008).

Para que seja possível determinar a porcentagem de inibição da enzima em casos de animais intoxicados é necessário conhecer os parâmetros normais de atividade dessas enzimas na espécie em questão (XAVIER e SPINOSA, 2008) e considerar que a atividade das colinesterases pode ser afetada também por outros fatores, como sexo, idade, condição corporal, temperatura e presença de doenças infecciosas ou não (DAVIS, 2008).

Existem poucos estudos com avaliação das colinesterases em aves (CHINOY e GEORGE, 1965; MAYACK e MARTIN, 2003; LANZAROT *et al.*, 2005;

STRUM *et al.*, 2008), expostas ou não a poluentes, e nenhum estudo foi encontrado em pinguins-de-magalhães.

O objetivo desse estudo foi determinar a atividade das colinesterases em tecido muscular de pinguins-de-magalhães que vieram a óbito durante a reabilitação no estado do Paraná.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL E ANIMAIS

O estudo foi realizado no município de Pontal do Paraná e utilizou como instrumento de pesquisa pinguins-de-magalhães que foram a óbito durante a reabilitação realizada no Projeto de Estudos e Recuperação de Aves, Mamíferos e Répteis (PROAMAR) do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Nos dois anos de estudo foram a óbito 20 animais, sendo 14 em 2010 e seis em 2011, todos jovens. Os animais vieram a óbito em menos de uma semana após o recebimento e os óbitos ocorreram devido à debilidade, sendo que nenhum animal apresentava sinais externos de contaminação por óleo.

2.2 COLETA DE AMOSTRAS

Após o óbito as carcaças permaneceram congeladas a -20°C por até quatro meses, e então foram realizadas as necropsias, sendo determinado o escore corporal pela palpação da musculatura peitoral, classificado em 1 (muito magro, quando a quilha do animal é facilmente observada, mesmo sem a palpação), 2 (magro, quando a quilha do animal não é facilmente observada mas pode ser palpada) ou 3 (normal, quando a quilha do animal não é facilmente observada ou palpada). Foram coletados fragmentos do músculo peitoral, acondicionados em micro-tubos de 1,5 mL e mantidos congelados a -20°C para realização da análise enzimática.

2.3 ANÁLISE LABORATORIAL

As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental da UFPR. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1M; pH 7,5) em homogeneizador Potter-Elvehjem®, em seguida foram centrifugados a 13.000 RPM

a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi separado para análise enzimática. O extrato tecidual foi diluído (1:100) e pipetado (50 µL) nas cavidades da microplaca (96 poços) sendo quatro repetições. O DTNB (5,5 – Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM foi adicionado (200 µL) a cada amostra. Foram então adicionados 50 µL de cada um dos diferentes substratos imediatamente antes da leitura no espectrofotômetro de microplaca TECAN® a 405 nm. Os substratos utilizados foram os iodetos de acetiltiocolina (AcSCh) (10 mM), de propioniltiocolina (PrSCh) (30 mM) e de butiriltiocolina (BuSCh) (30 mM).

A análise da acetilcolinesterase foi realizada pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva-de-Assis (1998) expressa em nmol de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína. Para cada ensaio, um branco sem amostra foi realizado em paralelo para estimar a razão de hidrólise espontânea do substrato. A concentração de proteína nas amostras utilizadas nas análises foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando soro de albumina bovina como padrão com diluição de 1:20.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros foram analisados estatisticamente mediante o programa BioEstat (versão 5.0), utilizando o teste T de Student para comparação entre os valores de atividade enzimática obtidos nos dois anos do estudo, e utilizando-se o teste de correlação linear de Pearson para comparação dos valores de atividade enzimática com o escore corporal dos animais.

3 RESULTADOS

As médias e desvios padrão de atividade das colinesterases obtidas dos animais que foram a óbito durante a reabilitação no PROAMAR estão apresentados na TABELA 6 e na FIGURA 5. Os valores individuais das atividades enzimáticas estão apresentados no ANEXO 6.

TABELA 6 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COLINESTERASES PARA DIFERENTES SUBSTRATOS EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) RECEBIDOS NO PROAMAR NOS ANOS DE 2010 E 2011.

Substrato	Atividade Enzimática* (nmol/min/mg de proteína)		
	2010 (n=14)	2011 (n=6)	2010 e 2011 (n=20)
AcSCh ¹	7,52 ± 1,11	9,53 ± 2,18	8,12 ± 4,49
BuSCh ²	8,98 ± 1,55	7,89 ± 1,09	8,66 ± 5,02
PrSCh ³	12,21 ± 2,1	11,85 ± 2,22	12,10 ± 7,07

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

¹AcSCh - Iodeto de acetiltiocolina; ²BuSCh - Iodeto de butiriltiocolina; ³PrSCh - Iodeto de propioniltiocolina.

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de atividade enzimática sobre os diferentes substratos nos anos de 2010 e de 2011.

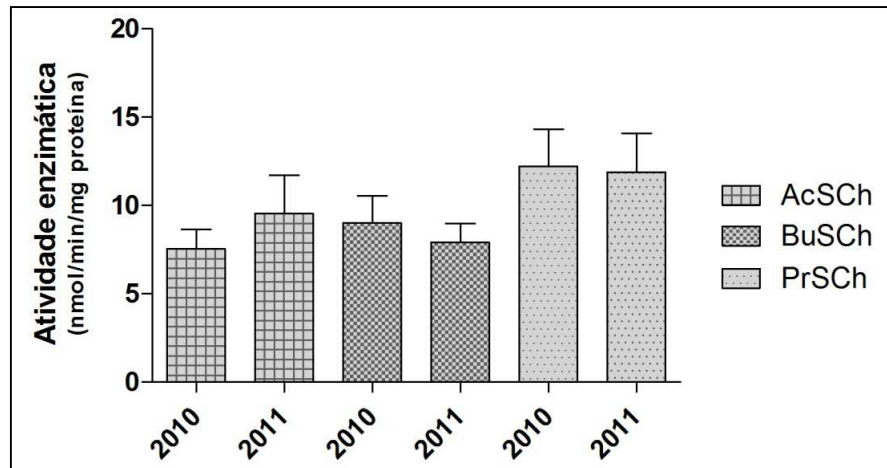


FIGURA 5 – VALORES MÉDIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COLINESTERASES PARA OS DIFERENTES SUBSTRATOS EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) RECEBIDOS NO PROAMAR NOS ANOS DE 2010 (n=14) E 2011 (n=6).

O escore corporal foi classificado como 1 em seis animais, 2 em 13 animais e 3 em um animal. Entre as atividades enzimáticas sobre os diferentes substratos no tecido muscular e o escore corporal dos animais houve correlação negativa (FIGURAS 6, 7 e 8). O coeficiente de correlação de Pearson foi de -0,64 para AcSCh; -0,53 para BrSCh; e -0,49 para PrSCh.

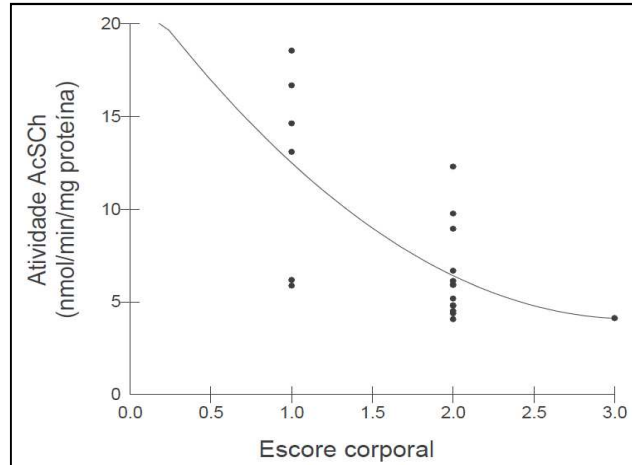


FIGURA 6 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE O SUBSTRATO AcSch EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).

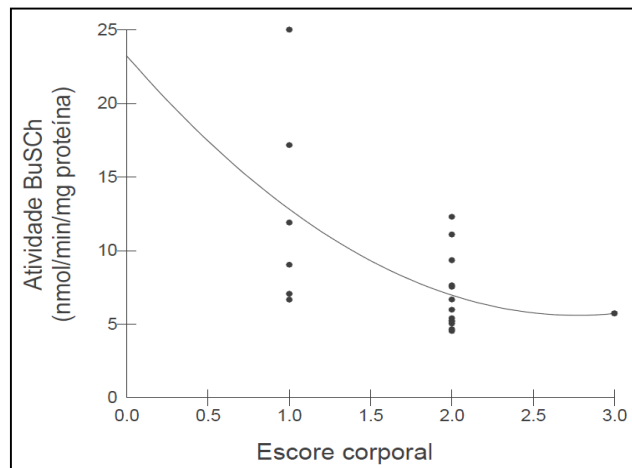


FIGURA 7 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE O SUBSTRATO BuSch EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).

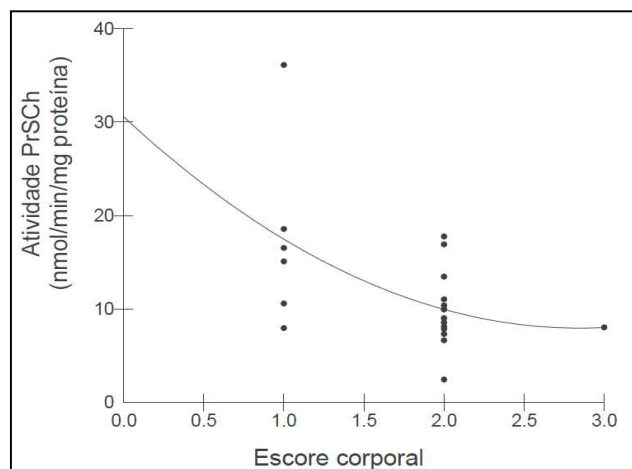


FIGURA 8 – CORRELAÇÃO ENTRE ESCORE CORPORAL E ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOBRE O SUBSTRATO PrSCh EM TECIDO MUSCULAR DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).

4 DISCUSSÃO

No tecido muscular dos pinguins-de-magalhães avaliados neste estudo ocorreu a hidrólise dos três tipos de substrato utilizados nas análises, os iodetos de acetiltiocolina (AcSCh), de propioniltiocolina (PrSCh) e de butiriltiocolina (BuSCh), indicando a presença de acetilcolinesterase e de pseudocolinesterase.

Segundo Silver (1963), há evidências de que o iodeto de PrSCh pode ser hidrolizado pela AChE e pela BChE. No estudo realizado por esse autor, verificou-se que a acetilcolinesterase possui afinidade semelhante para PrSCh e AcSCh.

Segundo Xavier e Spinosa (2008), a AChE é encontrada no tecido nervoso e na junção neuro-muscular, enquanto que a BChE está presente no plasma, fígado, pâncreas, mucosa intestinal e substância branca no SNC. Entretanto, em outros estudos foram encontrados os diferentes tipos de colinesterases em músculo e outros tecidos, tanto em mamíferos quanto em aves (SILVER, 1963; CHINOY e GEORGE, 1965; NENE, 1977; JEDRZEJCZYK *et al.*, 1984).

Chinoy e George (1965) verificaram que tanto a AChE quanto a BChE estavam presentes no músculo peitoral de várias espécies, independente do tipo de fibra muscular. Esses autores observaram por métodos de histoquímica que a BChE apresentava maior concentração do que a AChE em pombos e frangos e que em passeriformes, rãs, lagartos e ratos a concentração de AChE foi consideravelmente maior do que BChE. No presente estudo, as atividades de BChE e de AChE sobre os substratos específicos foram semelhantes, porém não é possível determinar que quantidade de PrSCh foi hidrolisada pelas diferentes colinesterases.

Silver (1963) e Nene (1977) realizaram estudos utilizando histoquímica para avaliar atividade das ChE na musculatura de aves e mamíferos. Silver (1963) encontrou atividade de AChE sobre a AcSCh e a PrSCh no músculo grande dorsal de frangos. Nene (1977) encontrou atividade de colinesterases sobre de AcSCh, PrSCh e BuSCh em todos os músculos de pombos e frangos estudados, sendo que nos dois primeiros substratos a atividade foi maior, diferente do presente estudo, em que a atividade sobre AcSCh e BuSCh foi semelhante.

Outro estudo utilizando musculatura de frangos, demonstrou que a concentração de pseudocolinesterase foi menor que a de acetilcolinesterase (JEDRZEJCZYK *et al.*, 1984).

As atividades das colinesterases determinadas pelo método de Ellman *et al.* (1961) em estudos realizados com musculatura de peixes são maiores do que os

valores obtidos no presente para os pinguins-de-magalhães. Klemz e Silva-de-Assis (2005) determinaram a atividade da AChE em músculo de peixes cascudos (*Ancistrus multispinnis*), sendo que esta foi em média 40 nmol/min/mg de proteína. Em músculo de peixes corydora-pimenta (*Corydoras paleatus*) a atividade de AChE foi de aproximadamente 75 nmol/min/mg de proteína (GUILOSKI *et al.*, 2010).

As colinesterases estão presentes no plasma e em outros órgãos das aves, especialmente no cérebro e os níveis dessas enzimas variam conforme espécie, idade, condição corporal e contaminação (MAYACK e MARTIN, 2003; LANZAROT *et al.*, 2005; ALIAS *et al.*, 2011).

A proporção de colinesterases no plasma varia para as diferentes espécies de aves, tendo diferentes padrões de atividade dependendo da idade dos animais (LANZAROT *et al.*, 2005). Em cegonhas-negras (*Ciconia nigra*) a atividade da BChE no plasma aumentou progressivamente com a idade dos filhotes (LANZAROT *et al.*, 2005).

No estudo de Mayack e Martin (2003), com corruíras (*Troglodytes aedon*) e estorninhos (*Sturnus vulgaris*), os animais apresentaram padrões semelhantes de BChE e AChE no plasma. A BChE plasmática aumentou com o crescimento dos filhotes, e a AChE reduziu rapidamente após a eclosão, mantendo-se constante durante o crescimento.

A atividade da AChE no cérebro costuma ser maior que no plasma ou em outros órgãos. Em estorninhos adultos, os valores obtidos para esta atividade foram de 215,0 nmol/min/mg de proteína (LUDKE, HILL e DIETER, 1975).

Os pinguins do presente estudo apresentavam escore corporal baixo (apenas um estava normal), o que indica que passaram por longos períodos de privação de alimento e estresse (SILVA-FILHO e RUOPPOLO, 2006). Períodos prolongados de jejum em aves saudáveis levam à depleção de gorduras e mobilização de proteínas, resultando em perda de peso, que pode ser observada pela redução da massa muscular peitoral (COLES, 2007).

Entre a atividade enzimática e o escore corporal, houve correlação negativa para todos os substratos. O coeficiente de correlação de Pearson foi negativo, com valores que indicam correlação moderada. Klems e Silva-de-Assis (2005) encontraram correlação semelhante entre a atividade de AChE muscular em peixes cascudos e a massa corporal.

No estudo de Strum *et al.* (2008) com aves migratórias na costa dos EUA, a atividade plasmática de BChE e de AChE também variou negativamente com a massa corporal. Segundo os autores, o metabolismo é menor quanto maior o tamanho do animal, o que pode ser uma explicação parcial para a relação inversa entre a atividade das colinesterases plasmáticas e a massa corporal.

Além disso, segundo Strum *et al.* (2008), o estresse fisiológico da migração em aves pode resultar em variação inter-individual no estado corporal, dependendo do tempo e distância percorridos até a chegada ao local de descanso, o que também pode influenciar nos níveis de atividade das colinesterases.

Oropesa *et al.* (2007) determinaram a atividade da AChE cerebral em aves marinhas antes e após um acidente com derramamento de óleo na costa da Espanha. Animais não expostos à contaminação tiveram atividade cerebral de 388,6 nmol/min/mg de proteína, enquanto que em animais expostos a atividade média foi de 325,0 nmol/min/mg de proteína. Essa diferença observada foi estatisticamente significativa, o que sugere que o petróleo produziu um efeito inibitório sobre a atividade da AChE nesses animais.

Os pinguins do presente estudo não apresentaram sinais externos de contaminação por óleo, porém, essa condição não pode ser descartada. Além disso, aves marinhas são susceptíveis à contaminação por outros produtos tóxicos, além do petróleo, muitos dos quais podem ser inibidores das ChE (FURNESS e CAMPHUYSEN, 1997).

5 CONCLUSÃO

Pinguins-de-magalhães apresentam atividade muscular de acetilcolinesterase e de pseudocolinesterase, sendo que ocorreu a hidrólise dos iodetos de acetiltiocolina, de propioniltiocolina e de butiriltiocolina.

O escore corporal apresenta correlação negativa com as atividades das colinesterases musculares nesses animais.

Para animais encontrados na costa paranaense sem sinais externos de contaminação por óleo, os valores obtidos no presente estudo podem servir como referência.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, L. A. G.; TACHIBANA, T.; CASAGRANDE, D. Poluição por óleo – Formas de introdução de petróleo e derivados no ambiente. **Integração**, São Paulo, a. 13, n. 49, p. 159-166, 2007.
- ALIAS, A. S. *et al.* Plasma and whole brain cholinesterase activities in three wild bird species in Mosul, Iraq: *in vitro* inhibition by insecticides. **Interdisciplinary Toxicology**, Bratislava, v. 4, n. 3, p. 144–148, 2011.
- ANDREESCU, S.; MARTY, J-L. Twenty years research in cholinesterase biosensor: from basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, Barcelona, v. 23, p. 1-15, 2006.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. Marine birds as sentinels of environmental pollution. **EcoHealth Journal Consortium**, New York, v. 1, p. 263–274, 2004.
- CHINOY, N. J.; GEORGE, J. C. Cholinesterases in the pectoral muscle of some vertebrates. **The Journal of Physiology**, Leningrad, v. 177, p. 346-354, 1965.
- COLES, B. H. **Essentials of Avian Medicine and Surgery**. 3.ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2007.
- DAVIS, R. A. H. **Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia rendalli***. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Kansas City, v. 7, p. 88-95, 1961.
- FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, C. J. Seabirds as monitors of the marine environment. **ICES Journal of Marine Science**, New York, v. 54, p. 726–737, 1997.
- GANDINI, P.; FRERE, E.; BOERSMA, P. D. Status and conservation of the magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* in Patagonia, Argentina. **Bird Conservation International**, Cambridge, v. 6, p. 307-316, 1998.
- GARCÍA-BORBOROGLU, P. *et al.* Chronic oil pollution harms magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 52, p. 193–198, 2006.
- GUILOSKI, I. C. *et al.* Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 461-468, 2010.

ISLAM, S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 48, p. 624–649, 2004.

JEDRZEJCZYK, J. *et al.* Molecular forms of acetylcholinesterase in synaptic and extrasynaptic regions of avian tonic muscle. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 46, p. 283-289, 1984.

KANG, J. J.; FANG, H. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 238, p. 367–369, 1997.

KLEMZ, C.; SILVA-DE-ASSIS, H. C. Efeitos do endosulfano na atividade da acetilcolunesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, teleostei). **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 51-58, 2005.

LANZAROT, M. P. *et al.* Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 2, p. 379–386, 2005.

LUDKE, J. L.; HILL, E. F.; DIETER, M. P. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 3, n. 1, p. 1-21, 1975.

MANAHAN, S. E. Toxicology. In: MANAHAN, S. E. **Toxicological chemistry and biochemistry**. 3.ed. Washington: Lewis Publishers, 2002.

MAYACK, D. T.; MARTIN, T. Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of house wrens and european starlings. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 39, n. 3, p. 627–637, 2003.

NENE, R. V. A histochemical study of cholinesterases in arm and forearm muscles of the pigeon and fowl. **Journal of Anatomy**, London, v. 123, n. 3, p. 745-749, 1977.

OROPESA, A. L. *et al.* Acetylcholinesterase activity in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician Coast (NW Spain). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 372, p. 532–538, 2007.

PEDROZO, M. F. M. *et al.* **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Série Cadernos de Referência Ambiental**, v. 12. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002.

PÜTZ, K. *et al.* Winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southernmost distributional range. **Marine Biology**, Berlin, v. 152, p. 1227-1235, 2007.

RODRIGUES, S. C. *et al.* Surviving probability indicators of landing juvenile magellanic penguins arriving along the southern Brazilian coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 419-424, 2010.

SILVA-DE-ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Technische Universität Berlin, Berlin, 1998.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (pinguim). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 309-323.

SILVER, A. A histochemical investigation of cholinesterases at neuromuscular junctions in mammalian and avian muscle. **The Journal of Physiology**, Leningrad, v. 169, p. 386-393, 1963.

STRUM, K. M. *et al.* Plasma cholinesterases for monitoring pesticide exposure in nearctic-neotropical migratory shorebirds. **Ornitologia Neotropical**, Montréal, v. 19 (Supl.), p. 641-651, 2008.

VIARENGO, A. *et al.* The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative biochemistry and physiology - C - Comparative pharmacology**, Oxford, v. 146, p. 281-300, 2007.

XAVIER, F. G.; SPINOSA, H. S. Toxicologia dos Praguicidas Anticolinesterásicos: Organofosforados e Carbamatos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. Cap. 11, p. 291-312.

CONCLUSÃO

A desnutrição, a desidratação e o estresse são os principais aspectos a serem considerados na pré-reabilitação de pinguins-de-magalhães.

A desidratação e a desnutrição são evidenciadas pelo aumento da uréia, pela redução das proteínas totais e pela anemia.

A anemia e a relação H/L alta ($3,87 \pm 0,57$) na pré-reabilitação indicam uma maior chance de óbito em pinguins-de-magalhães.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos obtidos dos animais após a reabilitação podem ser utilizados como valores de referência para pinguins-de-magalhães em cativeiro e como parâmetros para soltura (ANEXOS 4 e 5).

Pinguins-de-magalhães apresentam atividade muscular de acetilcolinesterase e de pseudocolinesterase, que possuem correlação negativa com o escore corporal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A condição corporal dos pinguins está estritamente relacionada aos seus parâmetros hematológicos e bioquímicos, portanto, a avaliação dessas informações de forma conjunta serve como indicador de saúde nesses animais.

Como no Brasil é comum a ocorrência de pinguins-de-magalhães foi essencial determinar, por meio dos parâmetros laboratoriais, os problemas mais frequentes. Com base nos resultados obtidos, recomenda-se que os principais aspectos a serem avaliados e tratados nos indivíduos recém-chegados são a hidratação e o suporte nutricional (dieta proteica e calórica), que devem ser realizados o mais breve possível para evitar perdas.

Os exames bioquímicos considerados como mais importantes no acompanhamento dos animais durante a reabilitação são o ácido úrico e as proteínas totais (e suas frações), recomendando-se também avaliar a GGT e a AST.

Sugere-se que os critérios hematológicos utilizados para soltura de pinguins-de-magalhães sejam o hematócrito de acima de 45%, PPT igual ou superior a 6,0 g/dL, número de leucócitos totais abaixo de 10.000/ μ L e relação H/L inferior a 1,5.

Devem ser realizados estudos voltados para a melhoria da avaliação das condições dos pinguins-de-magalhães durante a reabilitação, já que existe a disponibilidade de animais nos centros de recuperação e o envolvimento de profissionais capacitados para este tipo de trabalho. Estudos que avaliem as dificuldades enfrentadas pelos animais antes e durante o período de reabilitação, assim como as possíveis causas de estresse, doenças e produtos tóxicos aos quais poderão estar expostos, estudos de acompanhamento dos animais após a soltura e em situação de vida-livre são possibilidades futuras de trabalhos nessa área. Ainda podem ser realizados estudos mais aprofundados sobre a real função dos leucócitos, especialmente dos eosinófilos.

Com relação às determinações de atividade das colinesterases musculares, os resultados obtidos nesse estudo são iniciais. Sendo assim, recomenda-se que sejam realizados novos trabalhos, incluindo a avaliação da cinética enzimática e da influência da contaminação por óleo sobre as enzimas em questão.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, L. A. G.; TACHIBANA, T.; CASAGRANDE, D. Poluição por óleo – Formas de introdução de petróleo e derivados no ambiente. **Integração**, São Paulo, a. 13, n. 49, p. 159-166, 2007.
- ALIAS, A. S. *et al.* Plasma and whole brain cholinesterase activities in three wild bird species in Mosul, Iraq: *in vitro* inhibition by insecticides. **Interdisciplinary Toxicology**, Bratislava, v. 4, n. 3, p. 144–148, 2011.
- ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. O. Patologia clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 939-966.
- ALONSO-ALVAREZ, C. *et al.* Plasma chemistry of the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* during fasting periods: a case of poor adaptation to food deprivation? **Polar Biology**, Berlin, v. 26, p. 14-19, 2003.
- AMAND, W. B. Avian clinical hematology and blood chemistry. In: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 264-276.
- ANDRADE, G. Q.; BISPO, E. S.; DRUZIAN, J. I. Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 721-726, 2009.
- ANDREESCU, S.; MARTY, J-L. Twenty years research in cholinesterase biosensor: from basic research to practical applications. **Biomolecular Engineering**, Barcelona, v. 23, p. 1-15, 2006.
- BERGER, C. A. Order sphenisciformes. In: HUTCHINS, M.; JACKSON, J. A.; BOCK, W. J.; OLENDORF, D. **Grzimek's animal life encyclopedia – Volume 8**. 2.ed. Farmington Hills: Gale Group, 2002. p. 147-158.
- BINGHAM, M.; HERRMANN, T. M. Magellanic penguin (Spheniscidae) monitoring results for Magdalena Island (Chile) 2000 – 2008. **Anales Instituto Patagonia**, Punta Arenas, v. 36, n. 2, p. 19-32, 2008.
- BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, Reston, v. 58, p. 597-607, 2008.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres. **Cartilha do projeto nacional de monitoramento do pingüim-de-magalhães *Spheniscus magellanicus***. Brasília: CEMAVE, 2010.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Marine birds as sentinels of environmental pollution. **EcoHealth Journal Consortium**, New York, v. 1, p. 263–274, 2004.

CAMPBELL, T. W. Hematology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine - Principles and application**. 1.ed. Florida: Wingers Publishing, 1994. p. 176-198.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica clínica de aves. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007a. p. 448-460.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de aves. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007b. p. 215-247.

CATTANI, A. P. *et al.* Avaliação da ictiofauna da fauna acompanhante da pesca do camarão sete-barbas do município de Pontal do Paraná, litoral do Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 247-260, 2011.
2011

CHINOY, N. J.; GEORGE, J. C. Cholinesterases in the pectoral muscle of some vertebrates. **The Journal of Physiology**, Leningrad, v. 177, p. 346-354, 1965.

COLES, B. H. **Essentials of Avian Medicine and Surgery**. 3.ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

COLES, E. H. **Veterinary clinical pathology**. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986.

CRANFIELD, M. R. Sphenisciformes (penguins). In: FOWLER, M. E.; MILLER, E. R. **Zoo and wild animal medicine**. 5.ed. Saint Louis: W. B. Saunders, 2003. p. 103-110.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, Oxford, v. 22, p. 760-772, 2008.

DAVIS, R. A. H. **Biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos de contaminação ambiental em *Mugil liza*, *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia rendalli***. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Kansas City, v. 7, p. 88-95, 1961.

FAIR, J.; WHITAKER, S.; PEARSON, B. Sources of variation in haematocrit in birds. **Ibis - The International Journal of Avian Science**, London, v. 149, p. 535-552, 2007.

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

FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, C. J. Seabirds as monitors of the marine environment. **ICES Journal of Marine Science**, New York, v. 54, p. 726–737, 1997.

GANDINI, P. *et al.* Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina. **Auk**, Washington, v. 111, n. 1, p. 20-27, 1994.

GANDINI, P.; FRERE, E.; BOERSMA, P. D. Status and conservation of the magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* in Patagonia, Argentina. **Bird Conservation International**, Cambridge, v. 6, p. 307-316, 1998.

GARCÍA-BORBOROGLU, P. *et al.* Chronic oil pollution harms magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 52, p. 193–198, 2006.

GARCÍA-BORBOROGLU, P. *et al.* Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 60, p. 1652-1657, 2010.

GUILOSKI, I. C. *et al.* Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 461-468, 2010.

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

HARR, K. E. Overview of avian hemostasis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 703-708.

HAWKEY, C. M. *et al.* Haematological findings in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 14, p. 251-256, 1985.

HAWKEY, C. M.; HART, M. G. An analysis of the incidence of hyperfibrinogenaemia in birds with bacterial infections. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 17, n. 2, p. 427-432, 1988.

HAWKEY, C. M.; HORSLEY, D. T.; KEYMER, I. F. Haematology of wild penguins (sphenisciformes) in the Falkland Islands. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 18, p. 495-502, 1989.

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

ISLAM, S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 48, p. 624–649, 2004.

IUCN - International Union for Conservation of Nature. *Spheniscus magellanicus*. **IUCN Red list of threatened species**. Versão 2010.4. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 15/01/2012.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febinger, 1986.

JEDRZEJCZYK, J. *et al.* Molecular forms of acetylcholinesterase in synaptic and extrasynaptic regions of avian tonic muscle. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 46, p. 283-289, 1984.

KANG, J. J.; FANG, H. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 238, p. 367–369, 1997.

KLEMZ, C.; SILVA-DE-ASSIS, H. C. Efeitos do endosulfano na atividade da acetilcolunesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, teleostei). **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 51-58, 2005.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. Aids to diagnosis. In: COLES, B. H. **Essentials of avian medicine and surgery**. 3.ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 56-102.

LANZAROT, M. P. *et al.* Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 2, p. 379–386, 2005.

LIERZ, M. Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis, and therapy. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 6, p. 29-55, 2003.

LUDKE, J. L.; HILL, E. F.; DIETER, M. P. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 3, n. 1, p. 1-21, 1975.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 839-872.

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

MALLORY, M. L. *et al.* Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: A case for gathering multiple proxies of seabird health. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 60, p. 7-12, 2010.

MANAHAN, S. E. Toxicology. In: MANAHAN, S. E. **Toxicological chemistry and biochemistry**. 3.ed. Washington: Lewis Publishers, 2002.

MARTINS, W. S.; OETTERER, M. Correlação entre o valor nutricional e o preço de oito espécies de pescado comercializadas no estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 277-282, 2010.

MAYACK, D. T.; MARTIN, T. Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of house wrens and european starlings. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 39, n. 3, p. 627–637, 2003.

MENDES-DE-ALMEIDA, F. *et al.* Avaliação da glicose sérica em pingüim de magalhães (*Spheniscus magellanicus* FOSTER, 1781) (Sphenicidae-aves) em cativeiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35 (Supl.2), p. 390-391, 2007.

MILLAR, H. T.; SIMPSON, J. G.; STALKER, A. L. An evaluation of the heat precipitation method of fibrinogen estimation. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 24, p. 827-830, 1971.

MINOZZO, M. G. **Patê de pescado: Alternativa para incremento da produção nas indústrias pesqueiras**. 206 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, p. 501-522, 2008.

NAJLE, R. *et al.* The use of serum proteins as biological markers of contamination of gentoo *Pygoscelis papua* and adelic *P. adeliae* penguins. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Ciudad de México v. 22, n.3, p. 107-112, 2006.

NENE, R. V. A histochemical study of cholinesterases in arm and forearm muscles of the pigeon and fowl. **Journal of Anatomy**, London, v. 123, n. 3, p. 745-749, 1977.

NETTO, A. D. P. *et al.* Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NEWMAN, S. H. *et al.* An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated american coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. **Environmental Pollution**, Barking, v. 107, p. 295-304, 2000.

OROPESA, A. L. *et al.* Acetylcholinesterase activity in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician Coast (NW Spain). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 372, p. 532–538, 2007.

PEDROZO, M. F. M. *et al.* **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Série Cadernos de Referência Ambiental**, v. 12. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002.

PELANDA, A. A. **Impactos humanos sobre aves associadas a ecossistemas marinhos na costa paranaense**. 43 f. Trabalho de Graduação (Oceanografia) - Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2007.

PETRY, M. V.; FONSECA, V. S. S. Effects of human activities in the marine environment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ornitologia Neotropical**, Montréal, v. 13, p. 137-142, 2002.

PINHATTI, V. R. *et al.* Determinação de danos basais no DNA de araras canindé (*Ara ararauna*) através do teste de micronúcleos: uma ferramenta na avaliação da saúde animal e seu uso no biomonitoramento da poluição ambiental. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 313-317, 2006.

PÜTZ, K. *et al.* Winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southernmost distributional range. **Marine Biology**, Berlin, v. 152, p. 1227-1235, 2007.

PÜTZ, K.; INGHAM, R. J.; SMITH, J. G. Satellite tracking of the winter migration of magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) breeding in the Falkland Islands. **Ibis - The International Journal of Avian Science**, London, v. 142, p. 614-622, 2000.

PÜTZ, K.; INGHAM, R. J.; SMITH, J. G. Foraging movements of Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* during the breeding season in the Falkland Islands. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, Chichester, v. 12, p. 75-87, 2002.

ROCHA, A. M. **Avaliação de anormalidades nucleares eritrocitárias em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* Foster)**. 40 f. Trabalho de Graduação (Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

RODRIGUES, S. C. *et al.* Surviving probability indicators of landing juvenile magellanic penguins arriving along the southern Brazilian coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 419-424, 2010.

ROOS, A. L. Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no Nordeste: Migrantes ou Errantes? **Migrante.Net - Boletim eletrônico do CEMAVE**, Cabedelo, a. 2, n. 2, julho-setembro 2008. Disponível em: <www.icmbio.gov.br/cemave/download.php?id_download=465>. Acesso em: 28/02/2012.

RUOPPOLO, V. *et al.* Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, a. 9, n. 51, p. 78-83, 2004.

SCHIAVINI, A. *et al.* Los pingüinos de las costas Argentinas: estado poblacional y conservación. **Hornero**, Buenos Aires, v. 20, n. 1, p. 5-23, 2005.

SCHMIDT, E. M. S. *et al.* Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SERGEANT, N.; ROGERS, T.; CUNNINGHAM, M. Influence of biological and ecological factors on hematological values in wild little penguins, *Eudyptula minor*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 138, Part A, p. 333-339, 2004.

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

SILVA-DE-ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Technische Universität Berlin, Berlim, 1998.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (pinguim). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 309-323.

SILVER, A. A histochemical investigation of cholinesterases at neuromuscular junctions in mammalian and avian muscle. **The Journal of Physiology**, Leningrad, v. 169, p. 386-393, 1963.

SOPEZKI, M. S. *et al.* Estudo da relação heterófilo/linfócito como marcador de estresse em pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). In: Congresso de Iniciação Científica, 16., 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPel, 2007.

STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D.; DAVIS, L. S. Satellite tracking of Magellanic penguins migration. **The Condor**, New Mexico, v. 100, p. 376-381, 1998.

STRUM, K. M. *et al.* Plasma cholinesterases for monitoring pesticide exposure in nearctic-neotropical migratory shorebirds. **Ornitologia Neotropical**, Montréal, v. 19 (Supl.), p. 641–651, 2008.

TRAVIS, E. K. *et al.* Hematology, serum chemistry, and serology of galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 3, p. 625-632, 2006.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 152-161.

VIARENGO, A. *et al.* The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative biochemistry and physiology - C - Comparative pharmacology**, Oxford, v. 146, p. 281-300, 2007.

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

VLECK, C. M. *et al.* Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living adélie penguins. **The Condor**, New Mexico, v. 102, n. 2, p. 392-400, 2000.

VON IHERING, R. **Dicionário dos animais do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2002.

WALLACE, R. S. *et al.* Hematology and plasma chemistry values in free-ranging humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. **Zoo Biology**, Brookfield, v. 14, p. 511-316, 1995.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Leipzig, v. 51, n. 31, p. 32-49, 1933.

XAVIER, F. G.; SPINOSA, H. S. Toxicologia dos Praguicidas Anticolinesterásicos: Organofosforados e Carbamatos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. Cap. 11, p. 291-312.

ZINKL, J. G. Avian hematology. In: JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febinger, 1986.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO CONCEDIDO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA SCA DA UFPR.



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 046/2010, referente ao projeto "Avaliação dos impactos de origem ambiental em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) na costa litorânea do município de Pontal do Paraná", sob a responsabilidade de Angela Mara Coraiola, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 09 de Dezembro de 2010. Este certificado expira em 09 de dezembro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 046/2010, regarding the project "Avaliação dos impactos de origem ambiental em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) na costa litorânea do município de Pontal do Paraná", in charge of Angela Mara Coraiola, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 2010. This certificate expires on December, 2011.

Curitiba, 09 de dezembro de 2010.

Geraldo Camilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA CONCEDIDA PELO SISBIO/MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25013-2	Data da Emissão: 02/09/2011 07:49
Dados do titular	
Nome: Angela Mara Coraiola	CPF: 048.475.649-44
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS DE ORIGEM AMBIENTAL EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) NA COSTA LITORÂNEA DO MUNICÍPIO DE PONTAL DO PARANÁ	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Monitoramento da praia e coleta de animais mortos	08/2010	09/2010
2	Coleta de amostras dos animais vivos	08/2010	09/2010
3	Processamento de amostras	08/2010	10/2010
4	Monitoramento da praia e coleta de animais mortos	05/2011	09/2011
5	Coleta de amostras dos animais vivos	05/2011	09/2011
6	Processamento de amostras	05/2011	10/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	PAULO ROGERIO MANGINI (CRMV-PR - 3347)	Coleta de amostras	720.944.949-34	3.892.220.0 SSP-PR-PR	Brasileira
2	Ricardo Krul	Coleta de amostras	776.760.689-91	41195231 SSP-PR	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PR	Projeto de Recuperação e Estudo de Aves, Mamíferos e Répteis	Fora de UC
2		SC	Centro de Triagem de Animais Selvagens	Fora de UC
3		RS	Centro de Recuperação de Animais Marinhos	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44226185



Página 1/3

ANEXO 2 – CONTINUAÇÃO.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25013-2	Data da Emissão: 02/09/2011 07:49
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Angela Mara Coraiola	CPF: 048.475.649-44
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS DE ORIGEM AMBIENTAL EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) NA COSTA LITORÂNEA DO MUNICÍPIO DE PONTAL DO PARANÁ	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Spheniscus magellanicus</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Spheniscus magellanicus</i>
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	<i>Spheniscus magellanicus</i>
4	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Spheniscus magellanicus</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Fezes)
2	Método de captura/coleta (Aves)	Captura manual
3	Método de marcação (Aves)	Etiquetas de asa

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	Instituição de ensino superior e pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44226185



Página 2/3

ANEXO 2 – CONTINUAÇÃO.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 25013-2	Data da Emissão: 02/09/2011 07:49
Dados do titular	
Nome: Angela Mara Coraiola	CPF: 048.475.649-44
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS DE ORIGEM AMBIENTAL EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>Spheniscus magellanicus</i>) NA COSTA LITORÂNEA DO MUNICÍPIO DE PONTAL DO PARANÁ	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44226185



Página 3/3

ANEXO 3 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES.

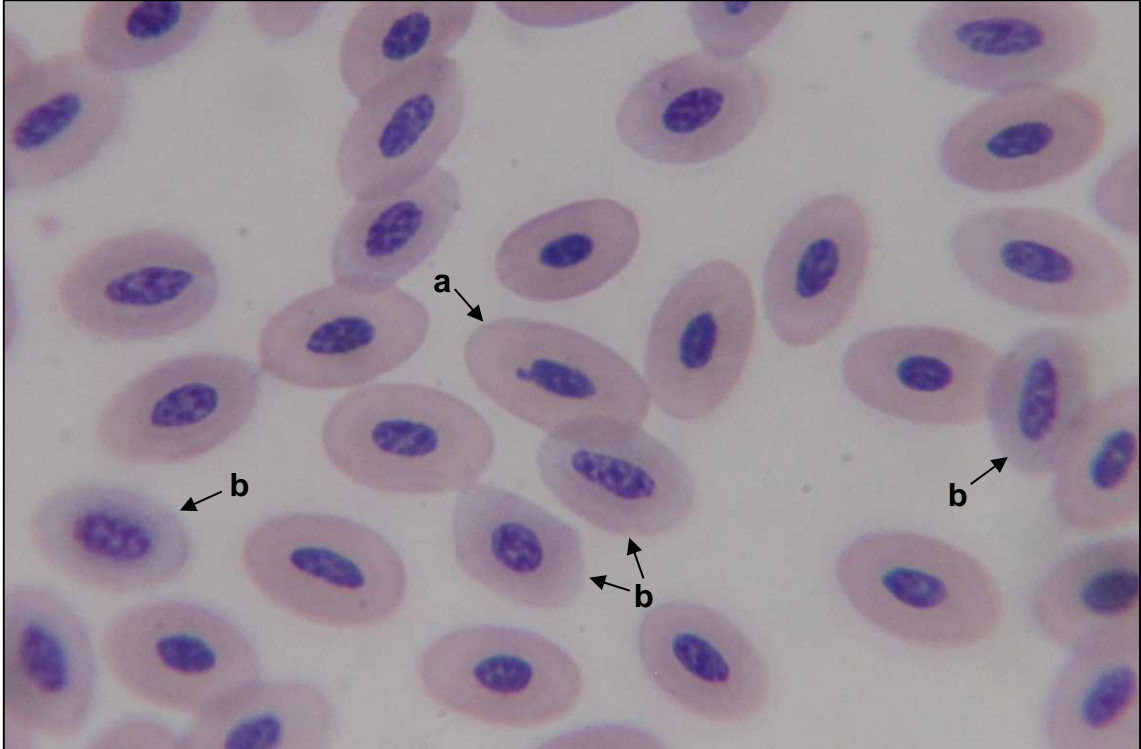


FIGURA A – Eritrócito com anormalidade nuclear (a) e policromatófilos (b) em esfregaço sanguíneo de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Corante de Wright, 1000x.

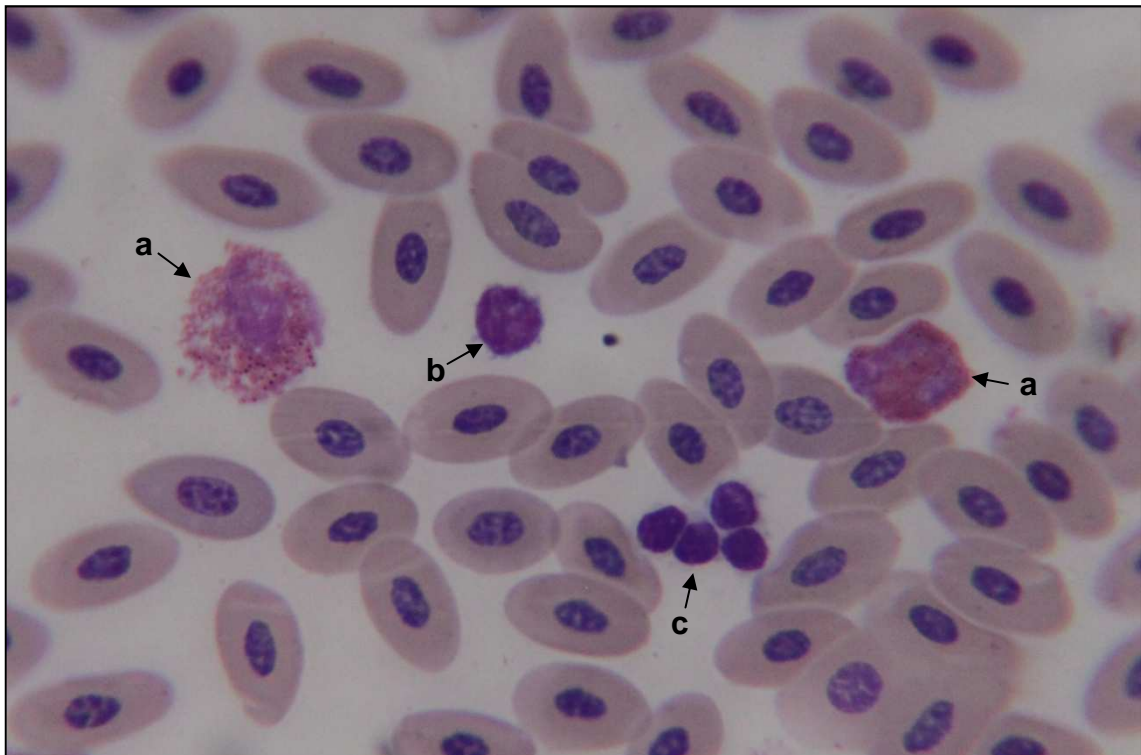


FIGURA B – Heterófilos (a), linfócito (b) e trombócitos (c) em esfregaço sanguíneo de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Corante de Wright, 1000x.

ANEXO 3 – CONTINUAÇÃO.

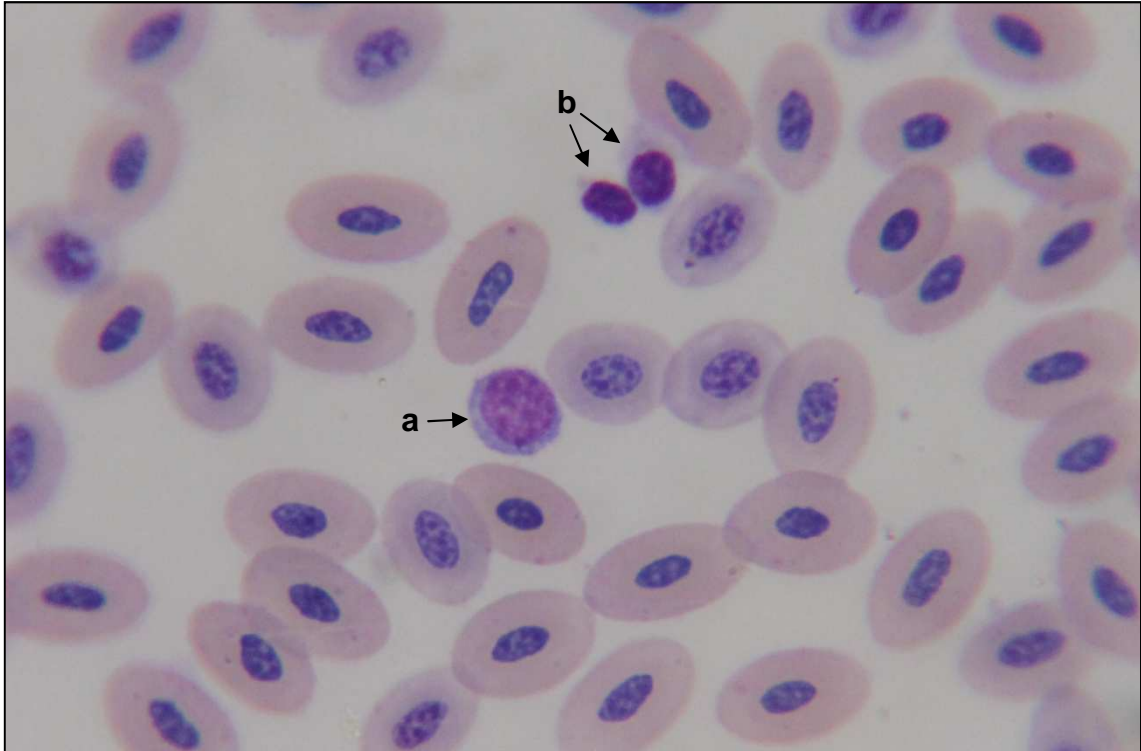


FIGURA C – Linfócito (a) e trombócitos (b) em esfregaço sanguíneo de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Corante de Wright, 1000x.

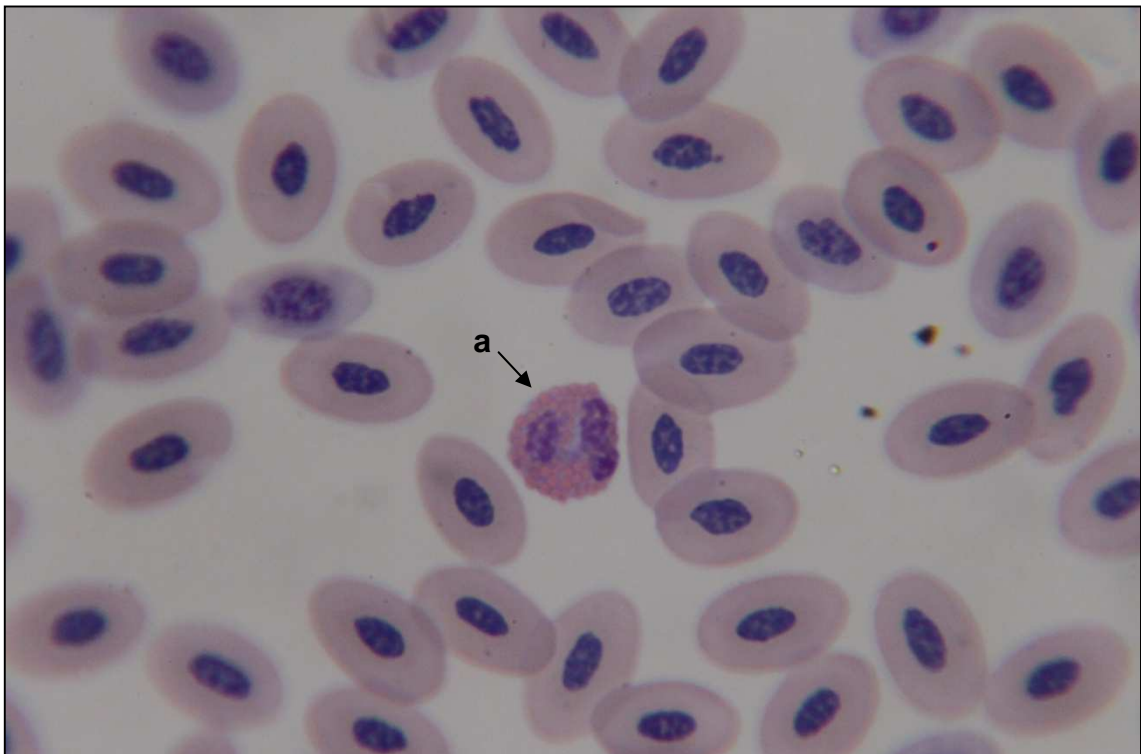


FIGURA D – Eosinófilo (a) em esfregaço sanguíneo de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Corante de Wright, 1000x.

ANEXO 3 – CONTINUAÇÃO.

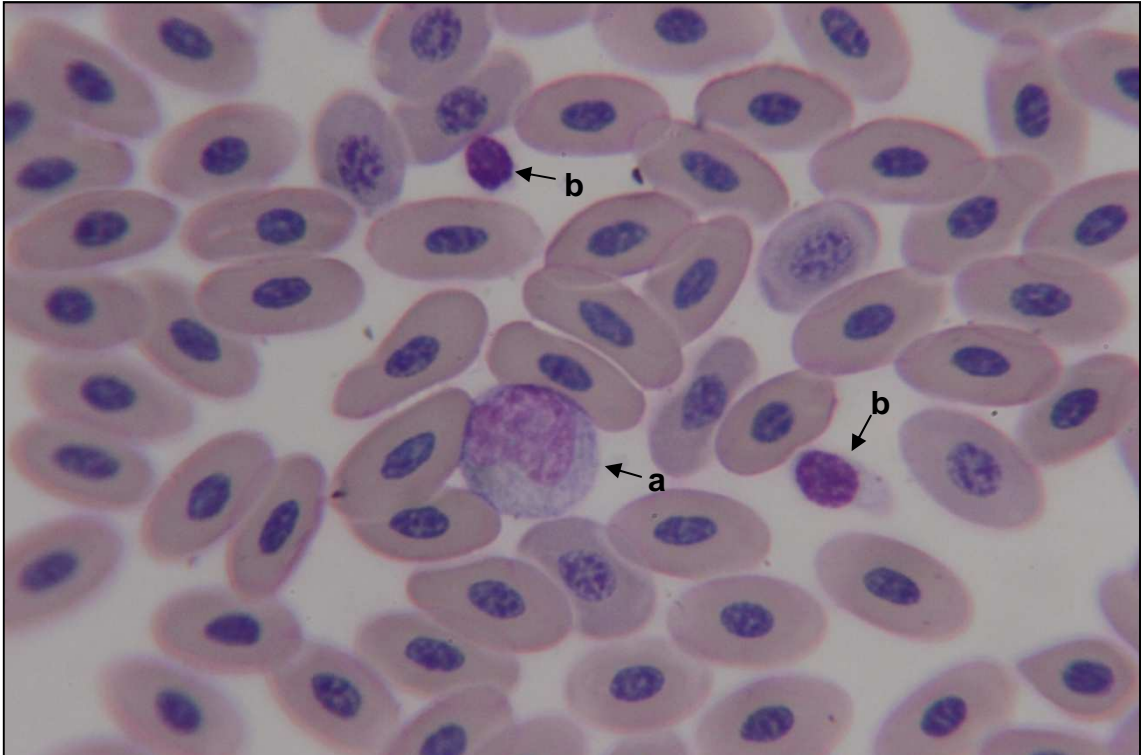


FIGURA E – Monócito (a) e trombócitos (b) em esfregaço sanguíneo de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Corante de Wright, 1000x.

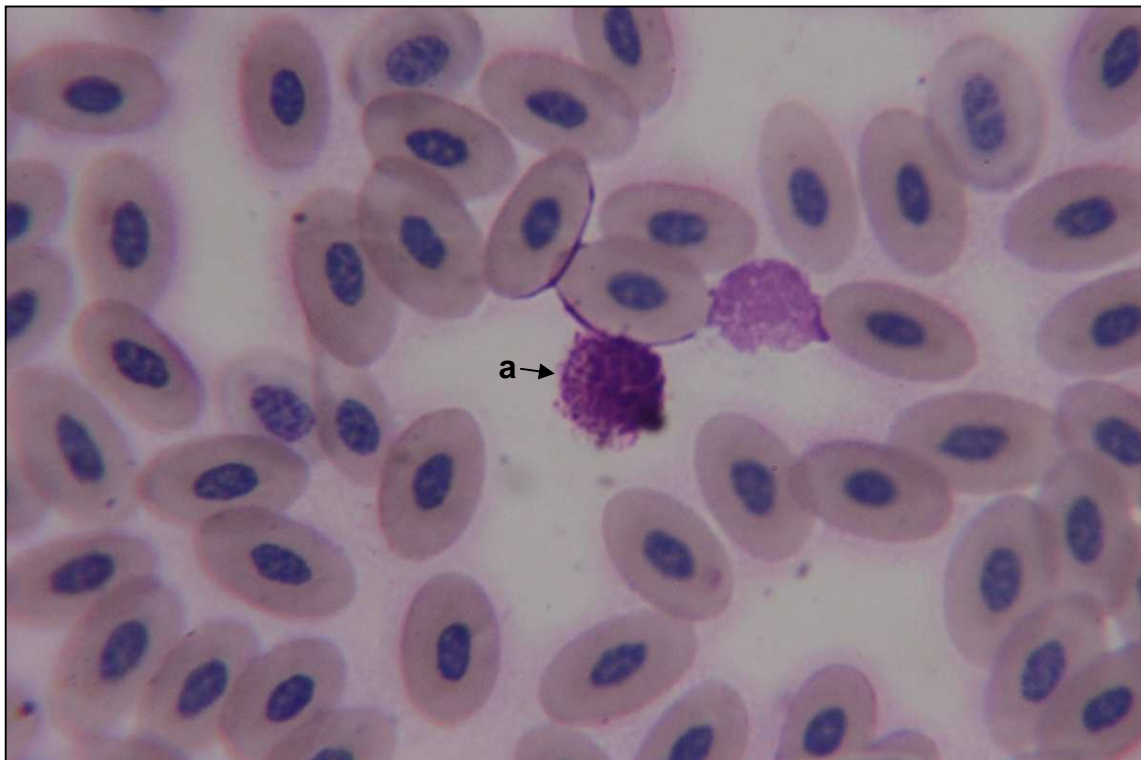


FIGURA F – Basófilo (a) em esfregaço sanguíneo de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Corante de Wright, 1000x.

**ANEXO 4 – VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS PARA PINGUINS-DE-MAGALHÃES JOVENS E
ADULTOS EM CATIVEIRO.**

Parâmetros*	Pinguins-de-magalhães (n=37)
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,81 ± 0,24
Hematócrito (%)	47,08 ± 3,69
Hemoglobina (g/dL)	13,11 ± 1,27
VGM ¹ (fL)	262,94 ± 26,08
CHGM ² (%)	27,86 ± 1,94
Leucócitos Totais (/μL)	10.218 ± 3.967
Heterófilo (%)	53,86 ± 9,23
Heterófilos (/μL)	5.568 ± 2.556
Linfócitos (%)	39,11 ± 10,34
Linfócitos (/μL)	3.955 ± 1.723
Eosinófilos (%)	3,0 ± 2,95
Eosinófilos (/μL)	303,51 ± 346,1
Monócitos (%)	2,19 ± 2,39
Monócitos (/μL)	230,49 ± 304,76
Basófilos (%)	1,84 ± 1,66
Basófilos (/μL)	159,95 ± 126,92
Policromatófilos/campo	2,01 ± 1,35
H/L ³	1,54 ± 0,67
ANE/100 ⁴	0,76 ± 1,04
PPT ⁵ (g/dL)	6,71 ± 0,69
Fibrinogênio (g/dL)	0,19 ± 0,2

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

¹VGM - Volume globular médio; ²CHGM - Concentração de hemoglobina globular média; ³H/L - Relação heterófilos/linfócitos;

⁴ANE/100 - Alterações nucleares eritrocitárias em 100 eritrócitos; ⁵PPT - Proteína plasmática total.

**ANEXO 5 – VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS PARA PINGUINS-DE-MAGALHÃES JOVENS E
ADULTOS EM CATIVEIRO.**

Parâmetros*	Pinguins-de-magalhães (n=29)
Ácido Úrico (mg/dL)	8,5 ± 3,2
Uréia (mg/dL)	13,1 ± 2,4
Proteínas Totais (g/dL)	5,8 ± 0,8
Albumina (g/dL)	2,1 ± 0,1
Globulinas (g/dL)	3,7 ± 0,7
Glicose (mg/dL)	209,5 ± 35,7
Colesterol (mg/dL)	209,1 ± 36,8
GGT ¹ (U/L)	12,0 ± 5,8
AST ² (U/L)	161,9 ± 52,9
CK ³ (U/L)	321,0 ± 112,3
FA ⁴ (U/L)	99,8 ± 33,8
LDH ⁵ (U/L)	880,6 ± 284,5

* Valores expressos como média ± desvio padrão.

¹GGT - γ-Glutamil transferase; ²AST - Aspartato amino transferase; ³CK - Creatina quinase; ⁴FA - Fosfatase alcalina;

⁵LDH - Lactato desidrogenase.

ANEXO 6 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE COLINESTERASES PARA DIFERENTES SUBSTRATOS EM TECIDO MUSCULAR DOS INDIVÍDUOS DA ESPÉCIE *S. magellanicus* RECEBIDOS NO PROAMAR.

Ano	Escore corporal	Atividade sobre Substrato*		
		AcSCh ¹	BuSCh ²	PrSCh ³
2010	1	14,616	17,157	16,522
2010	2	12,293	12,293	16,903
2010	2	9,760	11,090	17,745
2010	2	6,677	7,631	7,313
2010	2	4,069	4,650	7,847
2010	2	4,385	5,979	10,364
2010	2	5,181	4,533	8,095
2010	2	5,934	6,675	8,530
2010	2	6,127	5,406	9,010
2010	2	4,513	5,044	6,636
2010	1	16,664	24,996	36,105
2010	1	6,180	7,062	7,945
2010	2	4,800	7,543	9,942
2010	3	4,121	5,724	8,013
2011	1	18,539	9,032	18,539
2011	2	5,906	5,250	13,453
2011	2	4,822	5,166	11,022
2011	1	5,878	6,661	10,580
2011	1	13,088	11,898	15,071
2011	2	8,938	9,344	2,438

* Atividade enzimática expressa em nmol/min/mg de proteína.

¹AcSCh - Iodeto de acetiltiocolina; ²BuSCh - Iodeto de butiriltiocolina; ³PrSCh - Iodeto de propioniltiocolina.

VITA

Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná (2003-2007); Pós-graduação *lato sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos pelo Instituto Qualittas de Pós-graduação/UCB (2008-2009); Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná (2010 – 2012);

Áreas de atuação: Clínica de animais selvagens e Patologia clínica veterinária

Contatos:

- email: angela.coraiola@gmail.com
- telefone: (41) 9223-1303