



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS EM ARARA-CANINDÉ (*Ara ararauna*) E ARARA-
VERMELHA (*Ara chloropterus*) PELO MÉTODO DE
QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

Kássia Regina Aguiar Vieira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ismar Silva Santana

BRASÍLIA – DF

JULHO/2016



KÁSSIA REGINA AGUIAR VIEIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS EM ARARA-CANINDÉ (*Ara ararauna*) E ARARA-
VERMELHA (*Ara chloropterus*) PELO MÉTODO DE
QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ismar Silva Santana

BRASÍLIA – DF

JULHO/2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Kássia Regina Aguiar

Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos em arara-canindé (*Ara ararauna*) e arara-vermelha (*Ara chloropterus*) pelo método de quimioluminescência. / Kássia Regina Aguiar Vieira; orientação de Marcelo Ismar Silva Santana – Brasília, 2016.

24 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: Kássia Regina Aguiar Vieira

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos em arara-canindé (*Ara ararauna*) e arara-vermelha (*Ara chloropterus*) pelo método de quimioluminescência.

Ano: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Kássia Regina Aguiar Vieira

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: VIEIRA, Kássia Regina Aguiar.

Título: Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos em arara-canindé (*Ara ararauna*) e arara-vermelha (*Ara chloropterus*) pelo método de quimioluminescência

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, local da realização da minha graduação. Agradeço aos professores e funcionários da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB pelos conhecimentos por eles transmitidos durante estes cinco anos de faculdade. Ao meu orientador Marcelo Santana, pela ajuda e orientação na elaboração deste trabalho, e pela amizade em todo este período.

À Itaipu Binacional, local de realização de parte da pesquisa, onde obtive todo o suporte. Ao Zalmir Silvino Cubas por ter sido o incentivador deste trabalho e dado apoio para sua realização. Agradeço a toda a equipe do Refúgio Biológico Bela Vista de Itaipu Binacional pelas contribuições para o meu crescimento profissional e pessoal. Ao Laboratório Ambiental de Itaipu Binacional, em especial à Isalina Ansilheiro Nascimento, pela disposição em ajudar.

Aos médicos veterinários Ligia Rigoletto Oliva e Mathias Dislich, pelos ensinamentos transmitidos e pelos esforços em contribuir com esta pesquisa, e a toda a equipe do Parque das Aves Foz Tropicana, pelo acolhimento e carinho.

Ao Laboratório Grupo São Camilo, em Maringá (PR), pela execução dos testes hormonais e apoio à realização desta pesquisa.

Agradeço ao vovô Zé, esteja onde estiver, pois sem ele muitos sonhos não teriam se realizado. Às minhas avós Severina e Maria Isabel, ao avô Valter, aos meus pais Mirian Aguiar e Wesley Vieira, e às minhas irmãs Karine e Karla, que por mais difíceis que fossem as circunstâncias, sempre tiveram paciência e confiança na minha formação. Aos meus pequenos sobrinhos, Miguel e Gabriel, que junto do gato Caco, são minha alegria nos momentos difíceis.

Agradeço às minhas amigas – e futuras veterinárias – Amanda, Alice, Gabrielle, Ingrid, Layla, Sirlene e Vanya, pela amizade, incentivo e carinho durante toda a graduação e especialmente durante a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus e à mãe-natureza, muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. CASIB - Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
2. CLIA – Quimioluminescência
3. PAFT - Parque das Aves Foz Tropicana
4. RIA – Radioimunoensaio
5. T3 – Triiodotironina
6. T4 – Tiroxina
7. TBG – Globulina ligadora de tiroxina
8. TSH – Hormônio estimulador da tireóide

Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos em arara-canindé (*Ara ararauna*) e arara-vermelha (*Ara chloropterus*) pelo método de quimioluminescência

Evaluation of serum levels of thyroid hormones in blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) and red-and-green macaw (*Ara chloropterus*) by chemiluminescence

Kássia Regina Aguiar Vieira^{1*}; Zalmir Silvino Cubas²; Mathias Dislich³; Lígia Rigoletto Oliva³; Adalfredo Rocha Lobo Júnior⁴; Marcelo Ismar Silva Santana⁵

¹Graduanda em Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

²Médico Veterinário, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

³Médico(a) Veterinário(a), Parque das Aves Foz Tropicana, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil

⁴Professor do Instituto de Ciências Agrárias, UFVJM, Unaí, Minas Gerais, Brasil.

⁵Professor de Anatomia Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

RESUMO

Variações nas concentrações séricas de hormônios tireoidianos geram uma indicação de alterações na função da glândula tireoide, portanto, selecionar um método adequado e prático para medição destes hormônios é uma ferramenta importante na rotina clínica. Os objetivos deste trabalho foram investigar a eficiência do método de quimioluminescência para obtenção das concentrações séricas de hormônios tireoidianos em araras; propor intervalos de referência para as espécies amostradas e analisar o efeito da espécie e do sexo sobre os valores destes hormônios. Foram coletadas 23 amostras de soro de duas espécies de araras, arara-canindé (*Ara ararauna*) e arara-vermelha (*Ara chloropterus*), mantidas no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e no Parque das Aves Foz Tropicana, em Foz do Iguaçu (PR). As concentrações de T4 total variaram de 0,3 a 2,5 µg/dL, com uma média de 0,94 µg/dL; T4 livre (intervalo 0,11 - 0,46 ng/dL; média 0,28 ng/dL) e T3 livre (intervalo 1,46 – 3,59 ng/dL; média 2,42 ng/dL) e TSH (intervalo 0,01 - 0,12 µUI/mL; média 0,04 µUI/mL). As médias de T3 livre e T4 total foram significativamente menores em *Ara ararauna* (n=12) do que em *Ara chloropterus* (n=11). Os valores de TSH e T4 livre não foram afetados significativamente pelo efeito espécie. Houve interação estatística entre espécie e sexo dentro dos valores de T4 total: os machos (n=4) de *Ara ararauna* obtiveram valores significativamente maiores do que as fêmeas (n=8); já os machos (n=7) de *Ara chloropterus* possuem concentrações de T4 total mais baixas do que as fêmeas (n=4) desta espécie. Os dados obtidos neste estudo determinam um intervalo de referência para hormônios tireoidianos em *Ara ararauna* e *Ara chloropterus*. Os resultados obtidos sugerem que é possível mensurar as concentrações séricas de hormônios tireoidianos em araras pelo método de quimioluminescência, devendo-se considerar variações relevantes entre diferentes espécies e sexos.

Palavras-chave: Aves. Hormônios da tireoide. Imunoquimioluminescência.

ABSTRACT

Variations in the serum concentration of thyroid hormones indicate alterations in the function of the thyroid gland. Choosing an adequate, practical method of measuring such hormones is an important tool for clinical work. This paper has the following purposes: investigating the efficiency of chemiluminescence in obtaining serum concentrations of thyroid hormones in macaws; proposing reference ranges for the sampled species, and analyzing whether these hormones' values vary depending on the animals' sex and species. Twenty-three serum samples were collected from two species of macaws: the blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) and the red-and-green macaw (*Ara chloropterus*). Both species were kept at the Itaipu Binacional's Wild Animal Nursery and at the Bird Park in the city of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. Serum concentrations of total thyroxine (T4), free T4, free triiodothyronine (T3) and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured by a chemiluminescence test. T4 total concentrations range from 0,3 to 2,5 µg/dL, with an average ratio of 0,94 µg/dL; free T4 (range 0,11 - 0,46 ng/dL; average 0,28 ng/dL), free T3 (1,46 – 3,59 ng/dL; 2,42 ng/dL) and TSH (0,01 - 0,12 µUI/mL; 0,04 µUI/mL). The averages of free T3 and total T4 were significantly lower in *Ara ararauna* (n=12) than in *Ara chloropterus* (n=11). There was no significant difference between both species as far as TSH and free T4 are concerned. There was a statistically significant interaction between sex and species within the values of total T4: male *Ara ararauna* (n=4) had significantly higher values than female *Ara ararauna* (n=8); male *Ara chloropterus* (n=7) have lower total T4 concentrations than female *Ara chloropterus* (n=4). Data obtained in this study determine a reference range for thyroid hormones in *Ara ararauna* and *Ara chloropterus*. The results of this study suggest that it is possible to measure the serum concentration of thyroid hormones in macaws by means of the chemiluminescence method, as long as relevant variations between different species and sexes are taken into account.

Key-words: Birds. Thyroid hormones. Thyroxine. Immunochemiluminescence.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	6
CONCLUSÕES	13
REFERÊNCIAS.....	14

INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior diversidade de psitacídeos (IUCN, 2012) e abriga duas espécies populares deste grupo: a arara-vermelha (*Ara chloropterus*) e a arara-canindé (*Ara ararauna*). Os psitacídeos se destacam como animais de companhia e desde a regulamentação da criação e comercialização de espécies silvestres nativas no Brasil (IBAMA, 1997), tem havido maior procura por serviços veterinários especializados e, com isso, tem-se uma elevada casuística clínica de aves silvestres (VALLE et al., 2008).

A tireoide é uma glândula endócrina que tem por função produzir os hormônios tiroxina (tetraiodotironina ou T4) e triiodotironina (T3). A glândula tireoide das aves é semelhante em todos os aspectos à dos mamíferos (STOJEVIC et al., 2000). O principal efeito dos hormônios tireoidianos é o de aumentar as atividades metabólicas da maioria dos tecidos do corpo e são importantes em vários processos nas aves, como eclosão, muda de penas e reprodução (MCNABB, 2000; STOJEVIC et al., 2000).

As doenças clínicas relacionadas à glândula tireoide já documentadas em aves incluem: bócio, hipotireoidismo, hipertireoidismo, tireoidite autoimune e neoplasias (OROSZ et. al, 2015). A doença de tireoide mais comumente relatada em aves é a hiperplasia (bócio) (RAE, 2000) e é mais frequentemente causada por deficiência de iodo (OROSZ et. al, 2015). Na necropsia, um estudo relatou que a maior prevalência de bócio hiperplásico entre as aves foi encontrada em arara-canindé (SCHMIDT, 2002). Apesar do hipotireoidismo funcional ser considerado incomum em aves (MERRYMAN & BUCKLES, 1998), foi confirmado um caso de hipotireoidismo em arara-macaco (*Ara macao*) e outros casos de suspeita de hipotireoidismo em psitacídeos já foram reportados.

Devido às dificuldades da realização de testes tireoidianos, o papel que a tireoide desempenha na doença clínica em aves ainda não é bem documentado (SCHMIDT & REAVILL, 2008). A determinação dos níveis de T3, T4 e TSH (Hormônio Estimulador da Tireóide) é útil no diagnóstico de doenças relacionadas à tireoide, sendo fundamental a seleção de um método preciso, eficaz e prático para medição das concentrações destes hormônios na rotina clínica de aves (WOERPEL & ROSSKOPF, 1984; OROSZ et al., 2015).

Muitos testes têm sido utilizados para determinar os níveis de hormônios tireoidianos, incluindo a diluição isotópica por espectrometria, ensaios enzimáticos e radioimunoensaio (RIA). A diluição isotópica por espectrometria de massa é raramente usada devido a sua complexidade (OROSZ et al., 2015). Métodos enzimáticos ainda não foram validados para o uso em aves, os níveis de T4 obtidos por meio destes métodos são usualmente mais baixos quando comparados com os valores obtidos com RIA e os valores de T4 total abaixo de 0,5 µg/dL não são lineares (GREENACRE, 2009). Apesar do RIA ser o teste mais acurado, mais sensível e mais utilizado para esta finalidade em aves (OROSZ et al., 2015), o uso de isótopos reativos requer licença dos órgãos normatizadores, apresenta dificuldade de aquisição, necessita de dispositivos de segurança e oferece perigo de radioatividade para os operadores, o que aumenta o seu custo (SINGH et al., 1997; ESHRATKHAH, 2011; MACHADO, 2013).

Atualmente, estão sendo pesquisados outros métodos para serem utilizados como alternativas ao RIA. Um deles é a quimioluminescência (CLIA), que demonstra boa correlação com RIA, maior sensibilidade, menor tempo de realização, menor custo, e nenhum efeito tóxico dos reagentes foi reportado até o presente estudo (RONGEN et al., 1994; MACHADO, 2013). O método de quimioluminescência foi validado para dosagem de hormônios da tireoide em humanos e em algumas espécies de animais domésticos (REIMERS et al., 1996; SINGH et al., 1997).

O presente estudo tem como objetivo investigar a eficiência da quimioluminescência para obtenção das concentrações séricas de hormônios tireoidianos em araras; determinar um intervalo de referência para T3 livre, T4 livre, T4 total e TSH por meio de CLIA em arara-canindé (*Ara ararauna*) e arara-vermelha (*Ara chloropterus*); analisar as variações dos níveis hormonais entre as espécies e os sexos e propor a utilização deste método para auxiliar no diagnóstico de doenças da tireoide nas espécies estudadas, possibilitando ao clínico a escolha de uma forma mais simples, barata, rápida e segura de avaliação da função deste órgão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 23 araras de duas diferentes espécies: 12 *Ara ararauna* (arara-canindé), quatro machos e oito fêmeas, e 11 *Ara chloropterus* (arara-vermelha), sete machos e quatro fêmeas, previamente sexadas pela técnica de biologia molecular, com diferentes idades e clinicamente saudáveis, tomando-se por parâmetro os exames físico, hematológico e de bioquímica sérica. Do grupo selecionado, 16 aves eram mantidas no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) e sete no Parque das Aves Foz Tropicana (PAFT), ambas as instituições localizadas no município de Foz do Iguaçu, Paraná. Todas as aves viviam em recintos coletivos, com água *Ad libitum* e alimentadas com uma dieta semelhante nas duas instituições, composta por ração específica para araras, frutas frescas, verduras e legumes diversos.

As capturas foram realizadas individualmente com o auxílio de puçá, sendo as araras imediatamente contidas fisicamente para a realização dos procedimentos de identificação, pesagem, exame físico e colheita de amostras de sangue. Durante o exame físico, foram avaliados o escore corporal (caquético, magro, normal, sobrepeso, obeso), o nível de consciência (alerta; deprimido; estupor; coma), a postura corporal, as cavidades oral e nasal, os membros, a presença de ectoparasitos e a condição das penas.

Foram colhidos três mL de sangue na veia jugular direita, no período de 10h às 12h, durante os meses de fevereiro e março de 2016 (Figura 1). O sangue colhido foi dividido em tubo com anticoagulante (heparina) para realização dos hemogramas, e em tubo com gel ativador de coagulação para obtenção de soro. As amostras colhidas em tubos com anticoagulante foram encaminhadas ao Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional para a realização de hemograma completo e exames de bioquímica sérica. As amostras nos tubos com ativador de coágulo foram centrifugadas, em até 30 minutos após a colheita, para a obtenção de 0,5 mL de soro (6000 rpm por 10 minutos) e enviadas refrigeradas em isopor com gelo, por via aérea, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório Grupo São Camilo (Maringá, Paraná) para a dosagem sérica de hormônios tireoidianos.



FIGURA 1 - Colheita de sangue na veia jugular direita em uma arara-canindé (*Ara ararauna*).

Os parâmetros analisados nos exames de hemograma foram: número de hemácias (milhões/mm), hematócrito (%), hemoglobina (g/dL), contagem total de leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$), número relativo de leucócitos (%), proteína plasmática (g/dL) e os cálculos de volume corpuscular médio (fL) e concentração de hemoglobina corpuscular média (%). A contagem de hemácias foi realizada por meio de diluição de sangue em solução salina 0,85%, na proporção de 1:200, e contagem em câmara hematimétrica de Neubauer. O hematócrito foi realizado pelo método do microhematócrito. A dosagem da concentração de hemoglobina foi feita com a diluição de sangue em solução de Drabkin e avaliação por espectrofotometria (método da cianometahemoglobina). Os índices hematimétricos foram obtidos por meio das fórmulas: $\text{VCM} = \text{HT} \cdot 10 / \text{He}$ e $\text{CHCM} = \text{Hg} \cdot 100 / \text{HT}$, sendo HT (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), He (contagem de hemácias) e Hg (concentração de hemoglobina). A contagem global de leucócitos foi realizada pela diluição na proporção de 1:100 de sangue em solução de soro fisiológico contendo Azul Cresil Brilhante e contagem em câmara hematimétrica de Neubauer. O diferencial leucocitário foi realizado por meio de microscopia óptica a partir da contagem de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com coloração de May-Grunwald-Giemsa.

Devido à limitação do volume de amostra disponível, pelo pequeno porte dos animais amostrados e à destinação de maior parte do sangue para realização dos testes hormonais, foram escolhidos para avaliação dos parâmetros de bioquímica os valores de ácido úrico (mg/dL), para verificação da função renal, e AST (mg/dL), para verificação da função hepática, dosados pelo método de química seca, com uso de tiras para uso humano do kit Reflotron (Roche®), a partir das amostras de sangue total.

Foram dosados T3 e T4 livres (ng/dL), T4 total (µg/dL) e TSH (µUI/mL). A metodologia utilizada para a determinação quantitativa dos hormônios tireoidianos no soro foi a quimioluminescência direta, com o equipamento automático ADVIA Centaur® XP – SIEMENS. Os kits utilizados foram imunoensaios competitivos, largamente empregados em humanos, e foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. O kit para dosagem das concentrações de T3 livres na circulação (ADVIA Centaur® FT3, Siemens Healthcare Diagnostics [SHD], 2014, USA) apresenta sensibilidade analítica para valores entre 0,02 – 2,39 ng/dL (0,3 – 30,8 pmol/L). A sensibilidade do kit que dosa as concentrações de T4 livre (ADVIA Centaur® FT4, SHD, 2014, USA) varia de 0,1 ng/dL (1,3 pmol/L) a 12 ng/dL (155 pmol/L). O ensaio para dosagem das concentrações de T4 total (ADVIA Centaur® T4, SHD, 2014, USA) apresenta sensibilidade para valores entre 0,3 µg/dL e 30 µg/dL (3,9 nmol/L - 387 nmol/L). O ensaio para a obtenção dos valores séricos de TSH (ADVIA Centaur® TSH3-Ultra, SHD, 2014, USA) é um ensaio de terceira geração para utilização em diagnóstico *in vitro* na determinação quantitativa do hormônio estimulador da tireoide no soro. O intervalo do ensaio varia entre 0,008 – 150 µIU/mL (mIU/L).

Uma análise de variância foi realizada para todas as variáveis segundo um delineamento inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 2 (espécie) × 2 (sexo). Desta forma, um modelo linear misto contemplando os efeitos fixos de espécie, sexo e suas interações e o efeito aleatório de origem foi usado nas análises. O peso das aves foi considerado no modelo como covariável. As análises de variância dos dados foram conduzidas usando o procedimento MIXED do software *Statistical Analysis Systems* (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; versão 9.2). Para considerar um efeito significativo, um nível de probabilidade de 5% ou menor para o teste *F* foi adotado. A média e o erro padrão foram apresentados para todas variáveis em função dos tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção de uma fêmea de arara-canindé descrita abaixo, as aves amostradas não apresentaram alterações no exame físico, estavam saudáveis e alertas, com escore corporal normal e postura em estação. Apenas quatro aves apresentaram ectoparasitos de pena, sendo medicadas com solução tópica à base de fipronil (Topline[®] Red, Merial Brasil). Das aves amostradas, sete fêmeas e quatro machos de arara-canindé pesaram em média 1,05 kg ($\pm 0,03$) e 1,1 kg ($\pm 0,04$), respectivamente, enquanto quatro fêmeas e sete machos de arara vermelha pesaram em média 1,28 kg ($\pm 0,25$) e 1,26 kg ($\pm 0,17$), respectivamente. As médias de peso corporal obtidas estão de acordo com os valores esperados para estas espécies (CARPENTER, 2010).

Foram colhidas amostras de sangue e realizados testes de hematologia e bioquímica para avaliação da saúde clínica. Os valores médios dos parâmetros hematológicos (Tabela 1) e os resultados dos testes bioquímicos (Tabela 2) estão de acordo com os valores de referência para as duas espécies amostradas (TEARE, 2002). Os dados obtidos para a amostra em questão visam colaborar gerando valores hematológicos e bioquímicos de referência para a região do Brasil onde estes animais foram amostrados.

TABELA 1 - Valores hematológicos médios e desvio padrão em araras (*Ara ararauna* e *Ara chloropterus*) mantidas em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e no Parque das Aves Foz Tropicana, Foz do Iguaçu, Paraná

Parâmetros	<i>Ara spp.</i>	<i>Ara ararauna</i>	<i>Ara chloropterus</i>	Valores de referência*
N	22	11	11	
RBC (milhões/mm)	2,9 \pm 0,27	2,84 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	2,11 a 6,54
Hg (g/dL)	15,2 \pm 1,1	15,5 \pm 1	14,8 \pm 1	6,2 a 18
VGM (fL)	157,1 \pm 17,5	161,7 \pm 17,7	152,5 \pm 16,8	55,9 a 229
HGM (pg)	52,3 \pm 7,97	55,8 \pm 5,92	49,2 \pm 8,8	13,4 a 64,3
CHCM (%)	33,4 \pm 2,6	34,2 \pm 1,4	32,6 \pm 3,2	13,6 a 43,1
HT (%)	44,5 \pm 3,2	45,4 \pm 3,3	43,6 \pm 3,1	34 a 62
WBC ($\times 10^3$ /mm ³)	10,7 \pm 4,3	9,3 \pm 3,7	13 \pm 4,6	3 a 54,5
EOS (%)	0	0	0	0 a 1,3
BAS (%)	0,2 \pm 0,12	0,19 \pm 0,12	0,12 \pm 0,12	0 a 1,2
MON (%)	0,4 \pm 0,4	0,17 \pm 0,17	0,63 \pm 0,48	0 a 2,5
LIN (%)	3,9 \pm 1,9	3,22 \pm 1,04	4,57 \pm 2,29	0,3 a 25,7
HET (%)	8,2 \pm 5,9	5,76 \pm 3,83	10,65 \pm 6,72	0,9 a 50,7
PP (g/dL)	3,5 \pm 0,53	3,31 \pm 0,6	3,62 \pm 0,42	1,9 a 7,7

*Fonte: TEARE (2002). RBC = contagem total de hemácias; Hg = hemoglobina; VGM = volume globular médio; HGM = hemoglobina globular média; CHCM = concentração de hemoglobina globular média; HT = hematócrito; WBC = leucócitos totais; EOS = eosinófilos; BAS = basófilos; MON = monócitos; LIN = linfócitos; HET = heterófilos; PP = proteína plasmática; N = número de indivíduos.

TABELA 3 - Média e desvio padrão de parâmetros de bioquímica sérica em *Ara ararauna* e *Ara chloropterus* em araras (*Ara ararauna* e *Ara chloropterus*) mantidas em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e no Parque das Aves Foz Tropicana, Foz do Iguaçu, Paraná

Parâmetros	<i>Ara spp.</i>	<i>Ara ararauna</i>	<i>Ara chloropterus</i>	Valores de referência*
N	16	10	6	
AST (mg/dL)	155 ±62	155,2 ±79,6	154 ±13,7	40 a 528
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	6,5 ±3,3	7,7 ±3,5	4,5 ±2	0 a 14,9

*Fonte: TEARE (2002). AST = aspartato aminotransferase; N = número de indivíduos.

Foram obtidas as concentrações séricas de triiodotironina livre (T3 livre), tiroxina total (T4 total), tiroxina livre (T4 livre) e do hormônio estimulador da tireoide (TSH) das 23 araras amostradas. A Tabela 3 apresenta a média e erro padrão dos hormônios tireoidianos dosados em *Ara ararauna* e *Ara chloropterus* e os valores obtidos para machos e fêmeas. Os resultados da análise estatística demonstraram que os valores de T3 livre e T4 total foram significativamente menores em *Ara ararauna* do que em *Ara chloropterus*. Os valores de TSH e T4 livre não foram afetados significativamente pelo efeito espécie. Houve interação estatística entre espécie e sexo somente dentro dos valores de T4 total, considerando um nível de significância de 5% pelo teste *F*. Esta variável foi desdobrada na análise de variância para ambos os fatores na Figura 2.

TABELA 3 - Níveis séricos de hormônios tireoidianos e o efeito de espécie e/ou sexo sobre estes valores, em araras (*Ara ararauna* e *Ara chloropterus*), mantidas em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e no Parque das Aves Foz Tropicana, Foz do Iguaçu, Paraná

Variável	Espécie (E)			Sexo (S)		Valor de P		
	Todos (n=23)	<i>Ara ararauna</i> (n=12)	<i>Ara chloropterus</i> (n=11)	Macho (n=11)	Fêmea (n=12)	Espécie	Sexo	E x S
T3 livre (ng/dL)	2,42 (0,56)	2,1 (0,23) ^b	2,9 (0,23) ^a	2,4 (0,22)	2,6 (0,21)	0,02	0,52	0,72
T4 total (µg/dL) [‡]	0,94 (0,56)	0,5 (0,14) ^b	1,6 (0,14) ^a	0,8 (0,13) ^B	1,2 (0,13) ^A	<0,01	0,02	<0,01
T4 livre (ng/dL)	0,28 (0,05)	0,30 (0,028)	0,25 (0,030)	0,27 (0,025)	0,28 (0,026)	0,34	0,87	0,45
TSH (µUI/mL)	0,04 (0,04)	0,02 (0,015)	0,06 (0,016)	0,04 (0,014)	0,04 (0,014)	0,21	0,84	0,13

Média de quadrados mínimos (erro padrão); n = número de animais; [‡]Variável influenciada significativamente pela interação de espécie e sexo, a qual foi desdobrada na análise de variância para ambos os fatores na tabela seguinte (Tabela 4). ^{a,b}Médias de quadrados mínimos seguidas por diferentes letras minúsculas entre as espécies diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste *F*; ^{A,B}Médias de quadrados mínimos seguidas por diferentes letras maiúsculas entre os sexos diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste *F*.

As concentrações de T4 total variaram de 0,3 a 2,5 µg/dL, com uma média de 0,94 µg/dL; T4 livre (intervalo 0,11 - 0,46 ng/dL; média 0,28 ng/dL) e T3 livre (intervalo 1,46 – 3,59 ng/dL; média 2,42 ng/dL). Os valores de T3 livre e T4 total foram significativamente menores em *Ara ararauna* do que em *Ara chloropterus*. Eshratkhah et al. (2011) mensuraram, através de quimioluminescência direta, as concentrações séricas de hormônios tireoidianos em frangos de corte, neste caso, o valor médio obtido para T4 total em frangos foi semelhante ao obtido neste trabalho. A média de T4 livre foi mais alta e a média de T3 livre mais baixa nestes frangos quando comparadas às médias obtidas nas araras deste estudo. A média de T4 total obtida através do RIA em araras (*Ara* spp.) variou de 1,0 – 4,0 (µg/dL) (WOERPEL & ROSSKOPF, 1984), valores comparativamente mais altos do que os obtidos no presente trabalho.

Sabe-se que há variações nos intervalos de referência entre as espécies e, em alguns casos, entre aves da mesma espécie (OROSZ et al., 2015). Generalizações sobre as diferenças de concentração dos hormônios tireoidianos entre espécies são complicadas visto que muitos fatores influenciam o funcionamento da tireoide, como a disponibilidade de alimentos e de iodo na dieta, a composição de alimentos, sazonalidade, temperatura, idade, maturidade sexual, data da colheita de sangue e estresse (GREENACRE, 2001; SCHMIDT & REAVILL, 2008). Desta forma, os valores do intervalo de referência devem ser utilizados com cuidado (OROSZ et al., 2015), comparando valores de referência que utilizem o mesmo método de análise e mesmo laboratório, e considerando as peculiaridades de cada espécie. Os resultados devem ser interpretados juntamente com outros indicadores, como sinais clínicos e outros testes laboratoriais (SCHMIDT & REAVILL, 2008).

Visto que a proteína carreadora denominada globulina ligadora de tiroxina (TBG) está ausente em aves, os níveis de T4 livre são menos afetados pelas concentrações de proteína e doenças concomitantes. As concentrações de T4 livre parecem estar presentes em maiores níveis em amostras de aves quando comparados com os de mamíferos, quando mensurados com diálise de equilíbrio e cromatografia de coluna. Com isso, o uso de T4 livre para auxílio no diagnóstico de doenças da tireoide em aves tem sido proposto e investigado (OROSZ et. al, 2015). A confiabilidade e relevância clínica destas informações precisam de uma

avaliação mais aprofundada, porém este estudo destaca a mensuração de hormônios livres da tireóide como um importante teste diagnóstico em aves.

Apesar de T4 ter aparentemente uma maior potência para desencadear algumas ações fisiológicas em aves, estudos afirmam que T3 é responsável pela maior ação de hormônios tireoidianos em aves (MCNABB, 2000). Esta afirmação é baseada nas seguintes evidências: os receptores tireoidianos em aves, assim como nos mamíferos, sugerem uma maior afinidade para T3; a proporção relativa entre T3/T4 é maior em aves do que em mamíferos, sugerindo uma boa capacidade de ligação de T3; as características e funcionamento das enzimas responsáveis pela produção dos hormônios tireoidianos indicam que T3 é o principal hormônio metabolicamente ativo (MCNABB & KING, 1993). Devido a estes fatos, o presente trabalho enfatiza a importância da dosagem dos níveis de T3 na verificação da função tireoidiana em aves.

A maioria dos intervalos de referência publicados para T4 total em aves foi estabelecido utilizando um kit de RIA desenvolvido para uso em cães e ainda não validado para o uso nesta classe (GREENACRE et. al, 2001; OROSZ et al., 2015). Aves possuem níveis séricos de hormônios da tireoide muito baixos (MAYER & DONNELLY, 2013), portanto é necessário escolher um teste que detecte com precisão concentrações relativamente baixas. O padrão mais baixo disponível para o kit de RIA é de 0,5 µg/dL (GREENACRE, 2009), enquanto que a sensibilidade analítica mínima do kit de CLIA utilizado neste trabalho é 0,3 µg/dL. Considerando estes fatos, sugere-se que novos estudos sejam realizados comparando os valores dos hormônios tireoidianos de araras obtidos pelo método de RIA aos resultados utilizando a CLIA, a partir de amostras dos mesmos animais e analisadas no mesmo laboratório, com o objetivo de definir qual ensaio é mais preciso na mensuração e criar intervalos de referência confiáveis para estes hormônios nas espécies de araras estudadas.

Os métodos para determinação dos níveis de TSH no sangue ainda não foram validados para o uso em aves e não há publicações dos valores de referência (OROSZ et al., 2015). Os níveis de TSH medidos variaram de 0,01 a 0,12 µUI/mL, com uma média de 0,04 µUI/mL. Dentre estes resultados, 57% das amostras (13/23) obtiveram valores próximos ao mínimo detectável pelo kit (0,008 µUI/mL). Estes resultados podem demonstrar que os níveis de TSH nestas espécies são naturalmente baixos. Deve-se considerar que as aves selecionadas

eram adultas saudáveis fora da muda, fora da época de reprodução e que a amostragem foi realizada em um curto período de tempo. Em várias espécies de aves, ciclos anuais têm sido notados em níveis circulantes de hormônios da tireóide (SMITH, 1982; GROSCOLAS & LELOUP, 1986; SILVERIN et. al, 1989). Estudos demonstraram que, em aves adultas, hormônios da tireoide têm papéis permissivos e sinérgicos em interação com outros hormônios, especialmente no final da temporada reprodutiva e durante a muda (NORRIS & CARR, 2013). Portanto, o fato das aves estarem fora do período reprodutivo pode ter influenciado nos valores de TSH. Desta forma, há necessidade de novas pesquisas que incluam dosagens dos hormônios tireoidianos em todos os períodos do ano, com objetivo de avaliar a influência da sazonalidade nos níveis de hormônios tireoidianos nestas espécies.

Os resultados obtidos no presente estudo propõem valores de referência para hormônios tireoidianos pelo método de quimioluminescência para *Ara ararauna* e *Ara chloropterus*. A obtenção deste intervalo de referência tem papel fundamental para o diagnóstico de alterações na função tireoidiana de aves enfermas. A partir de uma pesquisa diagnóstica melhor embasada, o papel que a tireoide desempenha na doença clínica das aves de companhia será mais bem compreendido. A quimioluminescência é um teste de excelente sensibilidade, rápida execução, baixo custo, sem efeitos tóxicos, e aplicável à medicina veterinária (RONGEN et al., 1994), tornando acessível a realização de testes tireoidianos na rotina clínica.

Foi encontrada interação entre espécie e sexo na análise estatística da concentração total de tiroxina (T4 total), com diferença estatística a um nível de significância de 5% pelo teste *F* (Figura 2).

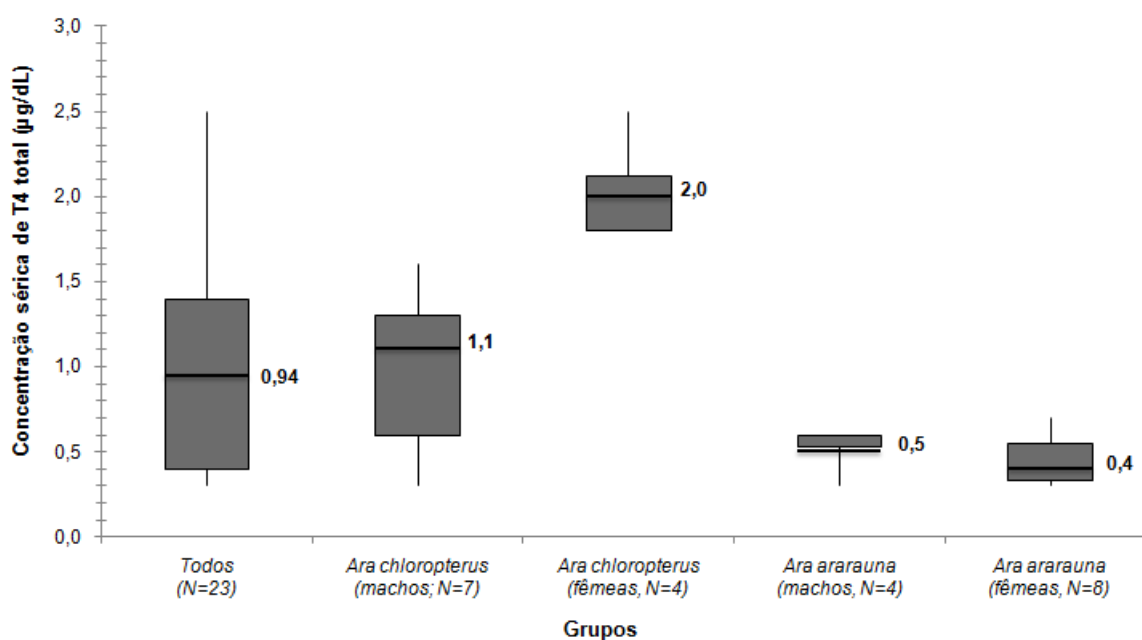


FIGURA 2 – Gráfico de caixa demonstrando a interação entre espécie e sexo sobre a concentração total do hormônio tiroxina (T4 total, µg/dL) em machos e fêmeas das espécies *Ara ararauna* e *Ara chloropterus*. Os valores dentro do gráfico indicam as médias de quadrados mínimos. N= número de indivíduos para as combinações.

Os machos da espécie *Ara ararauna* obtiveram valores significativamente maiores que as fêmeas desta espécie; já os machos de *Ara chloropterus* possuem concentrações de T4 total mais baixas do que as fêmeas desta espécie. Embora ainda não completamente elucidados, fatores reprodutivos podem ser responsáveis por variações nas concentrações dos hormônios tireoidianos (JOHNSON, 1994). Diferenças entre os sexos nas concentrações de tiroxina total já foram reportadas em ratos e em cobaias, onde machos obtiveram valores de tiroxina no soro maiores do que as fêmeas (SEGAL et al., 1982; MULLER et al., 2009). Em gatos, estudos avaliaram a influência do sexo sobre os valores de tiroxina total, mas os resultados são conflitantes e ainda não chegaram a um senso comum (VIEIRA, 2010). Em aves, esta relação também ainda não foi elucidada. Desta forma, são necessários estudos que testem a representação de subgrupos, como sexo e idade, nas variações dos níveis séricos destes hormônios, com o objetivo de gerar resultados mais precisos e para comparação.

Para um método de diagnóstico hormonal ser validado para o uso em uma determinada espécie é necessário, além da validação laboratorial, uma

validação fisiológica, que indica se as concentrações hormonais obtidas na dosagem dos hormônios refletem a normalidade ou as alterações patológicas da função tireoidiana (FURTADO & SOILA, 2015). Como uma forma de verificar se o método escolhido detecta flutuações nos níveis hormonais em araras, foi selecionada um espécime de *Ara ararauna*, fêmea, pesando 0,985 kg, proveniente do PAFT, que estava sendo tratada pelos veterinários responsáveis havia cinco meses do momento da primeira colheita de amostra, com um quarto de comprimido 25 mcg de Levotiroxina sódica (Levotiroxina sódica 25 mcg, Merck S/A™), duas vezes ao dia, na dose de 6,25 mcg/kg, VO, devido a suspeita clínica de hipotireoidismo. No exame físico, apresentou rarefação de penas na região peitoral, na cabeça e na área interna da asa, nível de consciência alerta, postura em estação. Foi colhido sangue desta ave para avaliação clínica e dosagem de T4 total, T4 livre, T3 livre e TSH. Trinta dias após a finalização do tratamento com tiroxina, foi realizada nova colheita de sangue para a dosagem de hormônios tireoidianos (Tabela 4). Apenas os valores obtidos da segunda colheita foram incluídos na análise estatística dos valores de hormônios tireoidianos. Os resultados de peso corporal, exames hematológicos e bioquímicos deste animal não foram incluídos na análise de resultados deste trabalho.

TABELA 4 - Valores séricos de hormônios tireoidianos de um exemplar de *Ara ararauna* durante e 30 dias após o tratamento com Levotiroxina sódica, mantida em cativeiro no Parque das Aves Foz Tropicana, Foz do Iguaçu (PR)

	T3 livre (ng/dL)	T4 total (µg/dL)	T4 livre (ng/dL)
Em tratamento	5,94	13,6	3
30 dias sem tratamento	2,27	0,7	0,29

Durante o tratamento com tiroxina, os níveis séricos de T4 total estavam aumentados em 19 vezes, e T4 livre em 10 vezes, quando comparados aos valores trinta dias após o término do tratamento. O aumento de T3 livre em quase três vezes na mensuração durante a administração de tiroxina, se comparado com a segunda amostragem, pode ser explicado pelo fato de que a maior parte das moléculas de T3 em aves é produzida fora da tireoide, ocorrendo a partir da reação de deiodinação, em que a molécula de T4 é convertida em T3

(MCNABB, 2000). Desta forma, o aumento da concentração de T4 pela administração exógena, leva ao aumento da concentração sérica de T3. Na segunda amostragem, os níveis dos três hormônios encontravam-se dentro do intervalo de valores obtido para esta espécie. A detecção desta variação nos níveis hormonais deste espécime, durante e após o tratamento, demonstra que a quimioluminescência realizou uma mensuração efetiva neste animal. Apesar de ser apenas um animal, e que de fato são necessários estudos mais abrangentes, esta informação corrobora a proposta de que o método da quimioluminescência pode ser utilizado em araras para a medição de hormônios tireoidianos.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que a obtenção das concentrações séricas de hormônios tireoidianos pelo método de quimioluminescência tem um desempenho eficiente em araras. Os dados obtidos neste estudo propõem intervalos de referência para hormônios tireoidianos em *Ara ararauna* e *Ara chloropterus*, são eles: T4 total (intervalo 0,3 a 2,5 µg/dL, média 0,94 µg/dL); T4 livre (intervalo 0,11 - 0,46 ng/dL; média 0,28 ng/dL) e T3 livre (intervalo 1,46 – 3,59 ng/dL; média 2,42 ng/dL) e TSH (intervalo 0,01 - 0,12 µUI/mL; média 0,04 µUI/mL). Os resultados da mensuração devem ser comparados somente com valores de referência estabelecidos usando o mesmo método de análise e mesmo laboratório, devendo-se considerar variações relevantes entre diferentes espécies e sexos. Os valores de T3 livre e T4 total foram significativamente maiores *Ara chloropterus* que em *Ara ararauna*. Os machos da espécie *Ara ararauna* obtiveram valores significativamente maiores do que as fêmeas desta espécie; já os machos de *Ara chloropterus* possuem concentrações de T4 total mais baixas do que as fêmeas desta espécie. Os exames de dosagens hormonais devem fazer parte da rotina clínica de aves, pois são elementos fundamentais para a realização de um diagnóstico clínico preciso.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Portaria 117 de 15 de outubro de 1997 do IBAMA: **Dispõe sobre a comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna silvestre brasileira e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, n. 200 de 16 out. 1997, seção I, p.23489/490.

CARPENTER, J. W. **Formulário de Animais Exóticos**. 3 ed. São Paulo: MedVet, 2010, p. 578.

ESHRAKHAH, B.; ZADEH, S. A.; FOROUZAN, V.; PARDA, A. A. P.; JAMSHID, G. G. Comparative study on the determination of serum thyroid hormones by two methods of immunoassay in broiler breeder poultry. **Comp Clin Pathol**, v. 20, p. 337–340, 2011.

FURTADO, P. V.; SOILA, R. Avaliação laboratorial do sistema endócrino. In: JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M.; NETO, J. P. A. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015, 2394 p.

GREENACRE, C. B. Diagnostic testing in the field: the researcher's perspective on thyroid testing in the Psittacine birds. **Proc Assoc Avian Vet Annu Conf**, p. 89-94, 2009.

GREENACRE, C. B.; YOUNG, D. W., BEHREND, E. N. et al. Validation of a novel high-sensitivity radioimmunoassay procedure for measurement of total thyroxine concentration in psittacine birds and snakes. **Am J Vet Res**, v. 62, p. 1750-1754, 2001.

GROSCOULAS, R.; LELOUP, J. The endocrine control of reproduction and moult in male and female Emperor (*Aptenodytes forsteri*) and Adelie (*Pygoscelis adeliae*) Penguins. **Gen Comp Endocrinol**, v. 63, p. 264-274, 1986.

INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE - IUCN. **Red list of threatened species**. Versão 2012.2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 15/04/2016.

JENNI-EIRMAN, S.; JENNI, L.; PIERSMA, T. Temporal uncoupling of thyroid hormones in Red Knots: T3 peaks in cold weather, T4 during moult. **J Ornithol**, v. 143, p. 331-340, 2002.

JOHNSON, C. A. Reproductive manifestations of thyroid disease. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 24, n. 3, p. 509-514, 1994.

MACHADO, L. H. A.; MOUTINHO, F. Q. Validação do método de quimioluminescência para determinação de PTH intacto em cães. **Vet e Zootec**, v. 20, n. 1, p. 84-90, 2013.

MAYER, J.; DONNELLY, T.M. **Clinical veterinary advisor birds and exotic pets**. St Louis (MO): Elsevier Saunders, 2013, 1061 p.

MCNABB, F. M. A. Thyroids. In: WHITTOW, G.C. **Sturkie's avian physiology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2000, cap. 17, p. 461–471.

MCNICHOLS, M. J.; MCNABB, F. M. A. Comparative thyroid function in adult Japanese quail and ring doves: Influence of dietary iodine availability. **J Exp Zool**, v. 244, p. 263–268, 1987.

MERRYMAN, J. I.; BUCKLES, E. L. The avian thyroid gland. Part two: a review of function and pathophysiology. **J Avian Med Surg**, v. 12, p. 238-242, 1998.

MULLER, K.; MULLER, E.; KLEIN R.; BRUNNBERG, L. Serum thyroxine concentrations in clinically healthy pet guinea pigs (*Cavia porcellus*). **Vet Clin Pathol**, v. 38, p. 507– 510, 2009.

NORRIS, D. O; CARR, J. A. **Vertebrate endocrinology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2013, 580 p.

- OROSZ, S. E.; MONKS, D.; MATOS, R. Clinical endocrinology of the protein hormones. In: SPEER, B. **Current Therapy in Avian Medicine and Surgery**. Boston: Elsevier Inc., 2016, cap. 10, p. 379-382.
- RAE M. Avian endocrine disorders. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine: avian an exotic pets**. Philadelphia: Saunders, 2000, p. 76–89.
- REIMERS, T. J.; SALERNO, V. J.; LAMB, S. V. Validation and application of solid-phase chemiluminescent immunoassays for diagnosis of endocrine diseases in animals. **Comparative haematology international**, v. 6, p. 170-175, 1996.
- RONGEN, H. A. H.; HOETELMANS, R. M. W.; BULT, A. et al. Chemiluminescence and immunoassays. **J Pharm Biomed Anal**, v. 12, p. 433-462, 1994.
- SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R. The Avian Thyroid Gland. **Vet Clin Exot Anim**, v. 11, p. 15–23, 2008.
- SEGAL, J., TROEN, B.R., INGBAR, S.H. Influence of age and sex on the concentrations of thyroid hormone in serum in the rat. **J Endocrinol**, v. 93, p.177–181, 1982.
- SILVERIN, B.; VIEBKE, P.A.; WESTIN, J.; SCANES, C. G. Seasonal changes in body weight, fat depots and plasma levels of thyroxine and growth hormone in free-living Great Tits (*Parus major*) and Willow Tits (*P. montanus*). **Gen Comp Endocrinol**, v. 73, p. 404-416, 1989.
- SINGH, A. K.; JIANG, Y.; WHITE, T.; SPASSOVA, D. Validation of Nonradioactive Chemiluminescent Immunoassay Methods for the Analysis of Thyroxine and Cortisol in Blood Samples Obtained from Dogs, Cats, and Horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 3, p. 261-268, 1997.
- SMITH, J. P. Changes in blood levels of thyroid hormones in two species of passerine birds. **Condor**, v. 84, p. 160-167, 1982.
- STOJEVIC, Z.; MILINKOVIC-TUR, S.; CURCIJA, K. Changes in thyroid hormones concentrations in chicken blood plasma during fattening. **Vet Arhiv**, v. 70, p 31-37, 2000.
- TEARE, J. A. **Reference ranges for physiological values in captive wildlife International Species Information System: physiological data reference values** [CD-ROM], International Species Information System, Apple Valey, 2002.
- VALLE, S. F.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, A. R.; BARCELLOS, L. J. G.; HLAVAC, N. R. C.; FRANÇA, R. T.; LOCATELLI, M. L. Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Araras canindé (*Ara ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 711-716, 2008.
- VIEIRA, A. B.; CASTRO, M.C.; FREIRE, I. M. A.; COELHO, M. J.; ALENCAR, N. X.; SOARES, A. M. B. Dosagem de tiroxina total (T4) sérica pelo método de quimioluminescência em gatos clinicamente sadios. **Braz J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 224-230, 2010.
- WOERPEL, R. W.; ROSSKOPF, W. J. Jr. Clinical experience with avian laboratory diagnostics. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 14, p. 249–286, 1984.