



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

PROTEINOGRAMA DE ARARAS MANTIDAS EM CATIVEIRO

SAMARA MAGUILNIK

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA - DF
JANEIRO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

PROTEINOGRAMA DE ARARAS MANTIDAS EM CATIVEIRO

SAMARA MAGUILNIK

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 077/2013

BRASÍLIA - DF
JANEIRO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

PROTEINOGRAMA DE ARARAS MANTIDAS EM CATIVEIRO

SAMARA MAGUILNIK

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRADUADO
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:



GIANÉ REGINA PALUDO, PROFESSOR DOUTOR (UnB)
(ORIENTADOR)



RAFAEL VERÍSSIMO MONTEIRO, PROFESSOR DOUTOR (UnB)
(AVALIADOR INTERNO)



JAIR DUARTE DA COSTA JÚNIOR, PROFESSOR DOUTOR (UnB)
(AVALIADOR INTERNO)

BRASÍLIA, 18 DE JANEIRO DE 2013

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MAGUILNIK, S. **Proteinograma de araras mantidas em cativeiro**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 73 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Maguilnik, Samara.
M213p Proteinograma de araras mantidas em cativeiro / Samara
Maguilnik. -- 2013.
xiv, 73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Saúde Animal, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Giane Regina Paludo.

1. Ave - Doenças - Diagnóstico. 2. Proteínas - Análise.
3. Eletroforese. 4. Ave - Proteção. I. Paludo, Giane Regina.
II. Título.

CDU 619:636.5

Ao Ricardo, que sem ele nada disso seria possível.

Meus mais sinceros agradecimentos, por ter se tornado meu companheiro e, com isso, ter transformado a minha história. Por ter seu amor, sua ajuda e seu magnífico exemplo, cheguei até aqui e com você pretendo seguir eternamente.

Amo você!

À Maria Flor, pela alegria que trouxe em vida e pela indescritível saudade que deixou. Obrigada minha Florzinha, por me mostrar o quanto é importante viver plenamente. Você mudou minha perspectiva de vida. Sempre amarei você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, ajudaram-me a concluir essa fase tão importante de minha vida profissional e pessoal. E entre todos, agradeço especialmente:

À minha família, que mesmo tão longe está sempre muito presente. Obrigada mãe e pai por sempre acreditarem em mim e não pouparem esforços mesmo nas minhas mais insanas empreitadas. Não tenho palavras suficientes para dizer o quando os amo e admiro. Obrigada às minhas irmãs Débora e Gabriela e ao meu sobrinho Matheus pela amizade e pelas incessantes risadas! Sinto muita saudades de vocês.

Aos meus “filhos” Duda, Raul e Preto pelo seu amor incondicional. E aos meus outros bichinhos e todos os animais por serem seres puros e maravilhosos. Meu agradecimento especial ao Buddy (*in memoriam*) por ter iniciado meu fascínio com a medicina veterinária e por ter me tornado quem sou hoje.

À família do meu marido, a qual posso chamar de minha família graças ao amor, carinho, dedicação e atenção de minha sogra Joana e sogro Tércio. Assim como meu cunhado e cunhada e suas adoráveis Melina e Flávia por terem me adotado e serem pessoas maravilhosamente bacanas.

À professora Giane Regina Paludo pela constante dedicação, orientação e paciência.

À Roberta Rendy Ramos por ter cedido de forma tão gentil suas amostras, seus dados e seus conhecimentos. Sua contribuição neste trabalho foi imensurável!

Aos professores Claudete Ruas e Eduardo Freitas da Silva por solucionarem a estatística e pela paciência ao resolverem meus questionamentos.

Aos professores, residentes, funcionários e estagiários do Hospital Veterinário da UnB por serem minha família. Sou muito grata por poder contar com a amizade e apoio de todos mesmo quando precisei me ausentar dessa minha segunda “casa”.

À Andréa pela amizade, por tornar o trabalho mais leve e divertido e por ter facilitado todo o processo burocrático para mim.

À sempre disposta Marcela Scalon pela atenção, auxílio e amizade dispensadas durante a execução deste projeto.

Aos meus queridos amigos Fê e Richard pela longa amizade, pelos estímulos e por sempre poder contar com vocês, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença!

Aos adorados Jô, Rafa, Alice, Rô e Peco pela amizade e companhia. Pelo bom humor constante que alegra e ilumina a minha vida!

À Cami por ter gerado meu afilhado Davi e seu irmão Vicente e por ser minha “irmã”. Por ser sempre “a” amiga, mesmo tão longe. É um privilégio poder dividir minhas alegrias, tristeza e loucuras com você!

À todos os outros amigos pelas inúmeras alegrias.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB, principalmente ao Hospital Veterinário, por proporcionarem e acompanharem meu crescimento profissional e pelas instalações e equipamentos utilizados na execução do projeto experimental; e ao Programa de Pós-graduação em Saúde Animal por possibilitar a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT.....	XIV
CAPÍTULO I.....	1
Introdução	1
Referencial teórico	3
Araras	3
Hemoparasitas Hemosporídeos aviários	4
Resposta de fase aguda	7
Eletroforese de proteínas	17
Referências	23
CAPÍTULO II.....	39
Introdução	39
Material e Métodos.....	40
Obtenção das amostras	40
Colheita, processamento e armazenamento das amostras	42
Análises laboratoriais	42
Análise estatística	44
Resultados	45
Discussão.....	53
Conclusão	61
Referências	62
CAPÍTULO III.....	70
Considerações finais.....	70
Anexos	72

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Relação das PFA positivas e negativas em mamíferos e aves	11
Tabela 2 Relação das PFA maiores e moderadas nas diferentes espécies animais	12
Tabela 3 Principais componentes das frações proteicas separadas por eletroforese observadas em aves	20
Tabela 4 Distribuição por grupos das araras conforme a espécie	41
Tabela 5 Distribuição de araras conforme o sexo nos grupos	45
Tabela 6 Número de araras negativas e positivas para Hemosporídeos distribuídas por espécie em cada grupo.	46
Tabela 7 Valores médios e desvios padrão de leucócitos e proteínas totais e valores absolutos e relativos (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas araras positivas e negativas para infecção por Hemosporídeos de todos os criadouros amostrados	47
Tabela 8 Valores médios e desvios padrão de leucócitos e proteínas totais e valores absolutos e relativos (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas araras fêmeas e machos de todos os criadouros amostrados.....	48
Tabela 9 Valores médios e desvios padrão de leucócitos e proteínas totais e valores absolutos e relativos (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas araras conforme o criadouro amostrados.....	49
Tabela 10 Valores médios e desvios padrão das proteínas totais (g/dL) e valores absolutos (g/dL) e relativos (%) (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas espécies de araras negativas para Hemosporídeos. Valores relativos apresentados entre parênteses, abaixo dos valores absolutos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1** Corrida eletroforética. Do pólo positivo (+) para o negativo (-): pré-albumina, albumina, α -globulinas, β -globulina e γ -globulina. Notar a divisão da fração α -globulina em duas subfrações distintas, α_1 -globulina e α_2 -globulina (cabeças de seta) 46
- Figura 2** Gráfico de corrida eletroforética normal para psitacídeos 47
- Figura 3** Gráfico de corrida eletroforética de psitacídeo alocado em G2 com hipergamaglobulinemia. Observar o perfil eletroforético, do anodo para o cátodo: pré-albumina (0,14 g/dL), albumina (1,50 g/dL), α_1 -globulina (0,19 g/dL), α_2 -globulina (0,18 g/dL), β -globulina (0,35 g/dL) e γ -globulina (1,38 g/dL)..... 50
- Figura 4** Representação gráfica das médias, medianas, valores mínimos e máximos de proteínas totais (g/dL) nas diferentes espécies de araras. (ara): *A. ararauna* (n = 49); (chlo): *A. chloroptera* (n = 24); (glau): *A. glaucogularis* (n = 1); (hibr): híbridas (n = 7); (hyac): *A. hyacintinus* (n = 10); (macao): *A. macao* (n = 9); (rub): *A. rubrogenis* (n = 2) 50

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP: α 1- glicoproteína ácida

Cp: Ceruloplasmina

Fb: Fibrinogênio

FNT: Fator de necrose tumoral

Hp: Haptoglobulina

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

PCR: Proteína C reativa

PFA: Proteínas de fase aguda

RCP: Reação em cadeia de polimerase

RFA: Resposta de fase aguda

SAA: Amiloide sérico A

SNA: Sistema nervoso autonômico

SNC: Sistema nervoso central

RESUMO

O sucesso na criação e conservação das araras depende de boas práticas de manejo e da identificação e tratamento de doenças, o que pode ser desafiador, pois as aves tendem a mascarar os sinais de enfermidade. Sendo assim, a utilização de ferramentas diagnósticas como o proteinograma é imperativo, pois são capazes de avaliar de forma abrangente o estado de saúde desses indivíduos. Este estudo teve como objetivo determinar o proteinograma de araras mantidas em cativeiro por meio da eletroforese de proteínas, correlacionando a espécie, sexo e ambiente com possíveis variações no perfil eletroforético, assim como buscou averiguar se infecções por hematozoários hemosporídeos se prestam como modelo de resposta de fase aguda, acarretando modificações no padrão proteico. Ademais, pretendeu avaliar a eletroforese de proteínas como ferramenta diagnóstica. A eletroforese em gel de agarose das proteínas séricas foi realizada em diferentes espécies de araras, fêmeas e machos, positivas e negativas para hemosporidioses e alocadas em três grupos distintos conforme o ambiente de origem no Distrito Federal ou Goiás. Não foram evidenciadas alterações significativas nas frações proteicas entre indivíduos positivos e negativos. O sexo interferiu nas concentrações de pré-albumina, as quais foram inferiores nas fêmeas. O fator ambiente resultou em mudanças nas frações β e γ globulinas. Concluiu-se que a variável ambiente é a maior responsável pelas discrepâncias observadas e atribuiu-se a isto a presença de uma possível enfermidade crônica. Por fim, pode-se afirmar que a eletroforese de proteínas é uma ferramenta diagnóstica muito sensível, porém, inespecífica.

Palavras-chave: araras, diagnóstico, eletroforese, hemosporídeos, proteínas, psitacídeos.

ABSTRACT

Success in breeding and conservation of macaws depends on good management practices and the identification and treatment of diseases, which can be challenging, because the birds tend to mask the signs of illness. Thus, the use of diagnostic tools such as proteinogram is imperative, as they are able to assess widely the health status of these individuals. The aim of this study was to determine the proteinogram of macaws kept in captivity with protein electrophoresis, correlating the species, gender, and environment with possible changes in the electrophoretic profile, and to establish whether infections by blood hemosporidian parasites may be used as a model of acute phase response and modify the protein pattern. In addition, this study intended to evaluate the protein electrophoresis as a diagnostic tool. The agarose gel electrophoresis of serum proteins was carried out in different species of macaws, male and female, positive and negative for hemosporidiosis, and allocated into three distinct groups depending on the original environment in Distrito Federal or Goias. There were no significant changes in protein fractions between positive and negative individuals. Gender has interfered in prealbumin levels, which were lower in females. The environment has led to alterations in β - and γ -globulins fractions. It was concluded that environment is the most responsible for the observed differences and this is probably attributed to the presence of a chronic illness. Finally, the protein electrophoresis is a highly sensitive, but non-specific, diagnostic tool.

Key-words: diagnosis, electrophoresis, hemosporidian, macaws, proteins, psittacine.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o número de veterinários que se dedicam à medicina aviária vem crescendo exponencialmente em resposta ao aumento da demanda por parte dos proprietários de aves de companhia (HARR, 2002). Dentre os pássaros mais populares como animais de companhia destacam-se os Psittaciformes (RENTAS, 2001), devido à sua beleza, coloração, inteligência, facilidade de domesticação e habilidade de interagir e imitar a linguagem humana (SICK, 1997). A arara é um desses psitacídeos que há séculos cativa os homens (GUEDES, 2004). Sua história de domesticação se inicia pelas populações indígenas brasileiras, que as amansavam sem nenhuma função útil, mas unicamente para diversão doméstica, alegria e curiosidade para os olhos e as mantinham nas aldeias como xerimbabos, que significa “coisa muito querida” (RENTAS, 2001). Elas são aves tropicais impressionantes e os maiores exemplares dentro da ordem Psittaciforme (SICK, 1997). A fauna brasileira é a detentora do maior número de espécies de araras (INSTITUTO ARARA AZUL, 2009), embora seja um país carente em publicações e estudos sobre essas aves.

É notória a necessidade de profissionais que possam fornecer assistência médica de qualidade a essas aves de cativeiro, assim como é vital o amparo àquelas de vida livre (HARR, 2002). No entanto, é sabido que a identificação de doenças em pássaros pode representar um desafio ao diagnóstico, porque estes

mascararam os sinais de moléstia, de modo a parecerem membros saudáveis do bando frente a potenciais predadores. Essa característica das aves na natureza é expressa também pelos pássaros mantidos em cativeiro. Conseqüentemente, o veterinário pode não observar sinais de doença se a avaliação da saúde depender somente do resultado do exame físico (POLO et al., 1998).

Esse potencial para concluir equivocadamente que uma ave doente é saudável dá suporte à realização de testes de diagnóstico laboratoriais com a finalidade de avaliar o seu estado de saúde (BRISCOE et al., 2010). Por essa razão, a hematologia e a análise da bioquímica plasmática compõem a base fundamental para o diagnóstico de doenças nesta espécie, ocasionando a necessidade crescente do desenvolvimento de técnicas precisas e acuradas úteis no diagnóstico de aves (HARR, 2002).

Inserido neste contexto, o médico veterinário tem um papel vital no reconhecimento das enfermidades, assim como lhe é atribuída a tarefa de identificar a severidade, o estágio (agudo ou crônico) e, ainda, a resolução da doença que acomete seu paciente (CHAMANZA et al., 1999). As proteínas de fase aguda prestam-se completamente a essa empreitada, pois as variações em suas concentrações séricas acompanham quaisquer estados inflamatórios (PETERSEN et al., 2004). A cinética destas ainda reflete com precisão o momento em que se encontra a resposta de fase aguda, trazendo informações valiosas a respeito do estado de saúde dos animais (PALTRINIERI, 2008).

Em voga nos últimos anos, a eletroforese é o método preferido para a avaliação das frações proteicas. O padrão de mobilidade proteica difere entre as espécies, portanto, é essencial que seja estabelecido para cada uma delas o padrão “normal” da eletroforese e que um intervalo de referência espécie-específico possa ser determinado (ALBERGHINA et al., 2011). Os valores de referência incluem as flutuações observadas em uma população saudável e, por meio desses, os laboratórios podem estabelecer intervalos a partir dos quais, por comparação, pode-se identificar anormalidades em determinados pacientes (GREFFE et al., 2009).

Com o intuito de otimizar o valor da eletroforese das proteínas como meio diagnóstico e dispor aos laboratórios clínicos acesso aos intervalos de referência específicos para as diferentes espécies de araras, este trabalho utilizou como modelo de inflamação as hemoparasitoses de ocorrência comum em aves. Tendo em vista que os parasitos sanguíneos mais comumente encontrados pertencem à

ordem Haemosporida e incluem os gêneros *Haemoproteus* spp, *Plasmodium* spp e *Leukocytozoon* spp (MITCHELL; JOHNS, 2008), e que infecções por esses são atualmente reconhecidas como imunopatologias (RIBEIRO et al., 2000), araras infectadas por esses servirão de modelo à influência que a doença exerce sobre as proteínas de fase aguda.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Araras

A ordem Psittaciforme é constituída por cerca de 78 gêneros e 332 espécies (FORSHAW, 2006), distribuídas em três grandes famílias: Psittacidae, composta pelas subfamílias de Nestorinae, Micropsittinae, Psittacinae e Strigopinae; Cacatuidae, com duas subfamílias, Cacatuinae e Nymphicinae; e Loriidae (GUEDES et al., 2008). Nessas famílias podemos citar, como representantes mais notórios, papagaios, araras, periquitos, jandaias e maracanãs; cacatuas; e lóris, respectivamente (SICK, 1997). Os psitacídeos são aves que ocupam todo o globo terrestre, desde áreas tropicais até regiões frias (GALETTI et al., 2002). São encontradas 184 espécies no Velho Mundo e 148 no Novo Mundo, sendo que destas, cerca de 100 estão na América do Sul e 72 espécies no Brasil, que é considerado o país mais rico em representantes da família Psittacidae, tendo sido denominado nos primeiros mapas como “Terra dos Papagaios” (SICK, 1997). Nesse país, são encontrados representantes de todos os gêneros e o maior número de espécies (FORSHAW, 2006).

Esta ordem, embora apresente uma grande variação de tamanho, coloração e peso, possui características muito marcantes que facilitam seu reconhecimento imediato. Dessas, destacam-se o bico curto, alto, recurvado, de base larga e arredondado, e maxila bem móvel articulada ao crânio, com movimentos de extensão que aumentam a potência do bico, usado para partir sementes duras e cocos. Possuem, também, língua grossa, sensível e riquíssima em papilas gustativas. Nos representantes brasileiros, a pigmentação predominante é a verde, havendo frequentes sinais vermelhos nas rêmiges (penas dorsais das asas), na

borda das asas ou nas coberteiras (penas superiores que cobrem as demais com início na região escapular descendo pelo dorso da asa). A região perioftálmica é nua e de extensão variada. Um círculo estreito em volta da região é frequentemente destacado por colorido vivo, que pode ser realçado ainda mais por um segundo círculo, de plumas vivamente coloridas (SICK, 1997; COLLAR, 1997; ALLGAYER; CZIULIK, 2007).

As araras são as maiores aves pertencentes à ordem Psittaciforme (SICK, 1997), inseridas na família Psittacidae, distribuídas em três gêneros: *Anodorhynchus*, com três espécies; *Cyanopsitta*, com espécie única; e *Ara* representada por 15 espécies (GUEDES et al., 2008). Dentre estas últimas, apenas quatro podem ser encontradas no Brasil: *A. macao*, *A. chloroptera*, *A. ararauna* e *A. severus*. Já os gêneros *Anodorhynchus* e *Cyanopsitta* têm exemplares de todas as espécies na fauna brasileira, são eles *A. leari*, *A. glaucus* e *A. hyacinthinus*, e *C. spixii*, respectivamente (INSTITUTO ARARA AZUL, 2009).

O interesse dos humanos pelas araras é antigo e durante séculos elas vêm sendo capturadas por suas penas e para serem usadas como animais de estimação. Devido à sua grande popularidade, nove espécies são consideradas vulneráveis ou em perigo de extinção e acredita-se que duas já estejam extintas da natureza (GUEDES, 2004). Os principais fatores que ameaçam as araras são a destruição de habitat, caça clandestina ou captura para o comércio (SNYDER et al., 2000). Nesse contexto, o cerrado ocupa o segundo maior colocado em número de espécies ameaçadas, pois quase 80% da sua vegetação já foi convertida, principalmente em razão das pastagens intensivas e da disseminação da agricultura mecanizada (MARINI; GARCIA, 2005). Outros fatores como endogamia, distribuição geográfica restrita, baixa taxa de reprodução e grande tamanho corporal também predisõem à extinção (GALETTI et al., 2002).

2. Hemoparasitas Hemosporídeos Aviários

A ocorrência de hemoparasitas em aves é comum (SEBAIO et al., 2012) e os mais frequentemente encontrados pertencem à ordem Haemosporida e incluem os gêneros *Haemoproteus* spp, *Plasmodium* spp e *Leukocytozoon* spp (MITCHELL; JOHNS, 2008), sendo os primeiros os mais comumente diagnosticados em psitacídeos (GODOY, 2006). Os hemosporídeos são um grupo cosmopolita de

organismos protistas heteróxeos obrigatórios que parasitam anfíbios, répteis, mamíferos e aves e utilizam insetos dípteros hematófagos como vetores (BRAGA et al., 2011). As enfermidades oriundas desses parasitos são doenças importantes em pássaros de cativeiro e de vida livre (GRIM et al., 2003). Esses agentes apresentam patogenicidade variável conforme uma série de fatores, como a relação parasita-hospedeiro, o estresse e o cativeiro (ALMOSNY; MONTEIRO, 2006). Desse modo, o dano causado geralmente é reflexo da intensidade do parasitismo e do estado geral do hospedeiro, que determinam a gravidade dos sinais clínicos. O acometimento das células sanguíneas (eritrócitos e leucócitos) pode ser relacionado a ocorrências desde a morte súbita até casos assintomáticos (BELO, 2007). Portanto, hemoparasitos podem alterar a dinâmica da comunidade de hospedeiros que parasita, alterar a estrutura do grupo e o status social de indivíduos, podendo inclusive levar espécies de aves à extinção (SEBAIO et al., 2012).

Os estudos experimentais com hematozoários em aves passaram a ter relevância após a descoberta da similaridade entre esses parasitas e os da malária humana (SÁ, 2011). Por essa razão, o *Plasmodium* é o gênero de hemosporídeos mais estudado e conhecido, pois nele estão incluídos os agentes da malária humana e por isso sua infecção em aves é conhecida como malária aviária (VALKIÜNAS, 2005). Desde o início das pesquisas realizadas no Brasil relacionadas aos hemosporídeos, com ênfase no *Plasmodium*, muitos outros trabalhos vêm sendo conduzidos e têm demonstrado a prevalência, embora variável, desses parasitos na avifauna brasileira (BENNET; SOUZA, 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; FECCHIO et al., 2007, 2011; SEBAIO et al., 2012).

Estudos sobre a malária humana e aviária foram desenvolvidos por médicos e veterinários em diversos laboratórios e em diferentes partes do mundo, resultando em descobertas quase simultâneas sobre o ciclo biológico de seus parasitas (SÁ, 2011). Hoje, sabe-se que a infecção inicia quando os esporozoítos infectantes são introduzidos no hospedeiro quando este é picado por um mosquito. No corpo da ave, penetram nas células do sistema fagocítico mononuclear do endotélio dos capilares cerebrais, do baço, fígado, rins, pele e outros órgãos, onde passam por uma fase de multiplicação assexuada (esquizogonia exoeritrocitária), resultando na produção de muitos merozoítos. Esses merozoítos invadem a corrente sanguínea e penetram nas células eritrocitárias, onde iniciam uma segunda fase de multiplicação assexuada (esquizogonia eritrocítica) resultando na produção de cerca de 8-16 merozoítos por

célula que invadem novas células vermelhas. Este processo é repetido quase que indefinidamente e é responsável pela doença. À medida que a infecção progride, alguns merozoítos jovens se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos que circulam no sangue periférico até serem ingeridos pelo mosquito fêmea no repasto sanguíneo. Dentro do vetor, os gametócitos amadurecem em gametas masculinos e femininos, ocorre a fertilização e um zigoto móvel é formado no interior do intestino do vetor hematófago, dando origem a um processo conhecido como esporogonia. O zigoto penetra na parede do intestino e torna-se um oocisto conspícuo dentro do qual uma outra fase de multiplicação ocorre, resultando na formação de esporozoítos que migram para as glândulas salivares do vetor e serão injetados quando o mosquito alimenta-se de um novo hospedeiro (VALKIÜNAS, 2005; COX, 2010).

Os sinais clínicos e hematológicos da doença incluem anorexia, anemia hemolítica, leucocitose e linfocitose, alterações neurológicas e morte (VALKIÜNAS, 2005; MITCHELL; JOHNS, 2008). Por quase meio século após a descoberta do *Plasmodium*, clínicos e patologistas deixaram-se seduzir pela tentação de explicar esses fenômenos (como a anemia e a malária cerebral) como complicações mecânicas da doença, resultantes da ação direta de formas maduras do parasita, destruindo hemácias ou obliterando vasos capilares profundos (RIBEIRO et al., 2000). No entanto, agora foi reconhecido que este modelo é demasiado simplista e, em anos recentes, a malária tem sido considerada como uma síndrome complexa que afeta muitos órgãos (MAITLAND; MARSH, 2004). Os conceitos atuais tendem a considerar que a maior parte da patogenia da malária resulta da interação de distintos processos, e a dar mais ênfase ao efeito modulador de toxinas parasitárias na cascata da inflamação do que aos óbvios componentes mecânicos da infecção parasitária (YAZDANI et al., 2006).

Ribeiro e colaboradores (2000) consideram que o termo imunopatologia se aplica à hemoparasitose em questão; isto quer dizer que as alterações orgânicas decorrentes da infecção se devem ao estímulo provocado ao sistema imune, o que explica o fato de que na fase exoeritrocitária, isto é, quando os parasitos ainda não adentraram à circulação sanguínea, não existem sinais clínicos nem evidências de inflamação (VALKIÜNAS, 2005). No momento em que há invasão dos vasos ocorre a identificação desses hemoparasitas pelo sistema imunológico, iniciando-se a cascata de inflamação e a resposta de fase aguda, com a liberação de inúmeras

citocinas e proteínas, como explanado a seguir (MAITLAND; MARSH, 2004). A exacerbação dessa resposta é a principal responsável, portanto, pelos efeitos deletérios observados na doença e também pela imunidade humoral conferida após a primo infecção (ATKINSON et al., 2001; LEE et al., 2006; MENDES et al., 2006).

3. Resposta de Fase Aguda (RFA)

Após injúria, trauma ou infecção aos tecidos, uma cascata complexa de eventos fisiológicos, conhecida como resposta inflamatória, se inicia para conter os danos teciduais, eliminar o agente invasor e ativar os processos de reparação necessários para se reestabelecer a função normal do organismo (BAUMANN; GAULDIE, 1994). Em condições ótimas essa resposta inflamatória permanece confinada a uma área localizada. No entanto, dependendo do insulto, manifestações sistêmicas proeminentes podem ocorrer caso mediadores inflamatórios sejam libertados para a circulação (PORTH, 2003). Nesses casos, além de sobrevir uma reação local, ocorre também um reflexo sistêmico, chamado de resposta de fase aguda (RFA) (TREY; KUSHNER, 1995). A RFA representa uma reação precoce e complexa do organismo frente a uma variedade de insultos (KOJ, 1996). Diferentemente da imunidade celular e humoral específica, essa reação é inata e inespecífica e pode ser deflagrada perante inúmeras condições como infecções, traumas, cirurgias, doenças imunomediadas, câncer, exercício extenuante, estresse e outras causas (GABAY; KUSHNER, 2001). A RFA é observada em todas as espécies animais e é imprescindível para a sobrevivência durante a fase inicial da doença (CERÓN et al., 2005), tendo em vista que é essencial para a restauração da homeostase e por restringir a infecção ou injúria até que a resposta imune específica se desenvolva (TRAUTWEIN et al., 1994).

A resposta inflamatória é um processo altamente orquestrado e intrincado, e envolve inúmeros tipos de células e moléculas. Alguns desses iniciam, amplificam ou sustentam o processo; enquanto outros, por meio da modulação, atenuam o dano tecidual (GABAY; KUSHNER, 2001). Vários são os mediadores que participam ativamente na resposta inflamatória: 1) quimiocinas realizam quimiotaxia de leucócitos; 2) enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a permeabilidade vascular; 3) plasmina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados; 4) mediadores lipídicos,

como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos, participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; 5) citocinas induzem efeitos locais (expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas), facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos como indução de proteínas de fase aguda e febre (BILATE, 2007).

O processo se inicia no próprio tecido onde ocorreu a invasão por micro-organismos ou a lesão e a partir daí, são deflagradas uma série de respostas locais (GRUYS et al., 2005). O dano nos tecidos e endotélio desencadeia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (BILATE, 2007). Isso resulta em ativação de macrófagos, agregação de plaquetas, transudação de fluidos biológicos para os tecidos e migração de leucócitos circulantes para o sítio da inflamação (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). Os monócitos e macrófagos recrutados serão os maiores responsáveis pela produção de citocinas pro-inflamatórias - em especial interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (FNT) – e estas, por sua vez, terão papel central na regulação da RFA (GABAY; KUSHNER, 1999).

Estas citocinas se ligam a receptores em diferentes células e, com isso, influenciam órgãos responsáveis pela homeostase, como o sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso autônomo (SNA) e glândulas adrenais (GRUYS et al., 2006; PALTRINIERI, 2008). As alterações que se seguem irão contribuir com a capacidade de defesa ou de adaptação e refletem o restabelecimento dos inúmeros mecanismos necessários para manter um ambiente interno saudável (como a concentração de células sanguíneas e a temperatura corporal) (GABAY; KUSHNER, 1999). No SNC, estas citocinas induzem uma cascata de eventos que culminam na manifestação dos três maiores sinais da RFA, a febre, a leucocitose e as mudanças na concentração sérica das proteínas de fase aguda (PFA) (KARROW, 2006). Adicionalmente, amplas modificações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas e nutricionais irão se suceder, como o aumento do cortisol sanguíneo, a redução na concentração de tiroxina sérica, as alterações metabólicas (como lipólise, gliconeogênese, catabolismo muscular) e a redução na concentração sérica de ferro e zinco (CÉRON et al., 2005).

3.1. Proteínas de Fase Aguda (PFA)

O interesse científico pelo terceiro maior sinal da RFA iniciou em 1930, após a descoberta de altas concentrações de uma proteína (posteriormente denominada proteína C reativa) no soro de pacientes durante a fase aguda de pneumonia pneumocócica (TILLET; FRANCIS, 1930). As alterações sofridas pelas proteínas plasmáticas que acompanham os estados inflamatórios são hoje conhecidas pelo termo proteínas de fase aguda, e refletem a reorquestração do padrão de expressão gênica das proteínas secretadas pelos hepatócitos (TREY; KUSHNER, 1995). As PFA podem ser detectadas poucos dias após o estímulo, mas a cinética dessa resposta depende da espécie em questão e da extensão do dano tecidual (PETERSEN et al., 2004).

A síntese das PFA tende a sofrer modificações superiores a 25% após algum estímulo inflamatório, chegando ao seu pico em torno de 24 a 48 horas após o início da inflamação, embora isso seja passível de variações (MORLEY; KUSHNER, 1982; PETERSEN et al., 2004). Dessa forma, os níveis circulantes dessas proteínas podem aumentar (PFA positivas) ou reduzir (PFA negativas) (GABAY; KUSHNER, 2001) (Tabela 1). Como exemplos de PFA negativas, pode-se citar a pré-albumina e a albumina (GRUYS et al., 2005), sendo que esta representa a maior PFA negativa em todas as espécies animais e seu declínio pode ser explicado por uma maior perda renal e/ou gastrointestinal, associado à redução da síntese hepática. O decréscimo da produção de albumina pelo fígado é postulado para que os aminoácidos possam ser utilizados na produção das PFA positivas e de outros importantes mediadores da inflamação (CRAY et al., 2009). Já as PFA positivas representam a grande maioria das PFA, e pode-se exemplificá-las por meio da proteína C reativa (PCR) e da proteína amiloide sérica A (SAA), entre outras (GRUYS et al., 2005).

Segundo Gabay e Kushner (1999), existe uma diferença significativa na expressão das PFA entre as espécies, portanto, embora as concentrações dos inúmeros componentes da RFA aumentem em conjunto, nem todos aumentam de maneira uniforme em pacientes com a mesma doença. Tal fato demonstra que a RFA não é globalmente regulada e que diferentes padrões na produção ou na modulação de citocinas específicas podem variar conforme a natureza da doença em questão e do indivíduo que é acometido por ela. Um exemplo notável dessa

variação é a PCR que, após estímulo inflamatório, apresenta enorme aumento em humanos e coelhos, porém, é minimamente induzida em camundongos. Outro exemplo é a SAA, que virtualmente é uma PFA maior em todos os mamíferos, mas cujo produto gênico não é expresso no rato, mesmo que a transcrição do gene seja induzida (GABAY; KUSHNER, 2001).

De modo geral, as PFA positivas em homens e animais domésticos podem ser categorizadas em três grandes grupos (Tabela 2): (1) maiores, normalmente presentes em baixas concentrações no soro de animais saudáveis, menor que 0,1 μ g/dL, aumentando entre 100 e 1000 vezes após estímulo, atingindo pico entre 24 e 48 horas após a injúria e declinando rapidamente durante a convalescência: PCR e SAA; (2) moderadas, presentes no soro dos animais saudáveis, mas após estímulo elevam-se 5 a 10 vezes, com pico em 2 a 3 dias e queda mais lenta do que as maiores: haptoglobulina (Hp) (exceto em pássaros), fibrinogênio (Fb) e α -1 glicoproteína ácida (AGP); (3) menores, aumentam progressivamente e somente 50% a 100% dos seus valores basais: ceruplasmina (Cp) e componente do complemento C3 (ECKERSALL, 2000; PETERSEN et al., 2004; GRUYS et al., 2005)

A regulação da produção das PFA resulta de uma complexa interação entre múltiplos mediadores, incluindo citocinas, receptores, outras citocinas moduladoras e hormônios (GABAY; KUSHNER, 1999). De forma simplificada, esse mecanismo envolve as citocinas provenientes dos sítios inflamatórios (IL-1, IL-6 e FNT- α) e os glicocorticoides endógenos (SUFFREDINI et al., 1999). A maioria dessas citocinas apresenta múltiplas fontes, alvos e funções (GABAY; KUSHNER, 1999) e têm sido encontradas em um grande número de espécies animais, incluindo mamíferos, pássaros, peixes, répteis e invertebrados (BECK; HABICHT, 1986; HUANG et al., 1999; STAEHELI et al., 2001; BIRD et al., 2002; SCHEERLINCK). As citocinas atuam de maneira sinérgica: o FNT- α mobiliza aminoácidos periféricos por meio da proteólise muscular, disponibilizando mais moléculas para o fígado realizar a síntese de novas proteínas. A IL-1 é a chave da modulação da produção hepática por seu efeito inibitório sobre a síntese das PFA negativas, ao passo que estimula a fabricação das PFA positivas. Finalmente, a IL-6 induz a liberação das PFA na corrente sanguínea (PALTRINIERI, 2008). Os glicocorticoides, por sua vez, são hábeis em estimular diretamente a expressão de algumas PFA, contudo, sua principal função é a de potencializar o efeito da IL-1 e da IL-6 (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

Tabela 1. Relação das PFA positivas e negativas em mamíferos e aves.

	Mamíferos	Aves
PFA positivas		
	SAA	SAA
	PCR	PCR
	Hp	Transferrina
	AGP	AGP
	Fb	Fb
	Cp	Cp
PFA negativas		
	Albumina	Albumina
	Transferrina	Hp

* SAA: amiloide sérico A; PCR: proteína C reativa; Hp: haptoglobulina; AGP: α_1 -glicoproteína ácida; Fb: fibrinogênio; Cp: ceruloplasmina

Fonte: adaptada de Gruys et al. (2005).

Considerando as diferenças quanto ao papel das citocinas na indução das PFA, essas podem ser classificadas em tipo 1 e tipo 2 (TRAUTWEIN et al., 1994). As PFA do tipo 1 são induzidas pela IL-1 (e pelo FNT- α) ou por uma associação da IL-1 com a IL-6, ou ainda da IL-1, IL-6 e dos glicocorticoides; e as do tipo 2 são reguladas somente pela IL-6 (PETERSEN et al., 2004). Como exemplo das primeiras, podemos citar PCR, SAA, α_1 -glicoproteína ácida, componente C3 do complemento e haptoglobulina. Já as PFA do tipo 2 incluem α_2 -macroglobulina, α_1 -antiquimiotripsina, α_1 -antitripsina e fibrinogênio (BAUMANN; GAULDIE, 1994; TRAUTWEIN et al., 1994). As PFA do tipo 1 originam a primeira linha das proteínas inflamatórias que se caracterizam por um aumento sérico rápido (em torno de 4 horas) e marcante após o estímulo e pela rápida normalização, enquanto que as de segunda linha (tipo 2) possuem sua concentração sérica tardiamente aumentada, entretanto, permanecem elevadas por mais de duas semanas (PETERSEN et al., 2004).

Tabela 2. Relação das PFA maiores e moderadas nas diferentes espécies animais.

Espécie	Maior	Moderada
Gato	AGP, SAA	Hp
Galinha	Ausente	AGP, Cp, SAA, transferrina
Vaca	Hp, SAA	AGP, PCR, Fb
Cão	PCR, SAA	AGP, Cp, Hp
Cabra	Hp, SAA	Fb
Cavalo	SAA	Fb, Hp
Homem	PCR, SAA	AGP, Fb, Hp
Camundongo	Hp, SAA, amiloide sérico P	PCR, Fb
Primatas não humanos	PCR	α_2 -macroglobulina, Fb, SAA
Porco	Hp, SAA, PFA maiores	AGP,
Coelho	Hp, SAA	AGP, PCR, Fb
Rato	AGP, α_2 -macroglobulina	PCR, Fb, Hp
Ovelha	Hp, SAA	AGP, PCR

* SAA: amiloide sérico A; PCR: proteína C reativa; Hp: haptoglobulina; AGP: α_1 - glicoproteína ácida; Fb: fibrinogênio; Cp: ceruloplasmina

Fonte: adaptado de CRAY et al. (2009).

3.1.1. Proteína C reativa (PCR)

Foi a primeira PFA a ser descrita e foi assim nomeada à ocasião de sua descoberta por sua capacidade de se ligar ao polissacarídeo-C da bactéria *Pneumococcus pneumoniae* (TILLET; FRANCIS, 1930). A PCR é considerada um marcador sistêmico muito sensível de inflamação e danos teciduais em humanos e cães, sendo extensivamente utilizada como marcador de diagnóstico e prognóstico em diversas enfermidades (SANTOS et al., 2003; CASAS et al., 2008; SOUZA et al., 2008; VOLP et al., 2008; ECKERSALL; BELL, 2010). Essa proteína, quando ligada às bactérias, provoca a ativação do complemento, facilitando a fagocitose e

promovendo a interação entre a imunidade celular e humoral (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000).

A PCR ainda participa da resposta inflamatória induzindo a produção de citocinas inflamatórias (CERÓN et al., 2005). No entanto, apresenta também efeitos anti-inflamatórios ao inibir a quimiotaxia e modular a atividade de neutrófilos (VOLP et al., 2008).

3.1.2. Amiloide sérico A (SAA)

A SAA foi originalmente descrita como a principal PFA constituinte da amiloidose. Esta proteína é a precursora da proteína amiloide A, uma molécula insolúvel que tende a se depositar no interstício dos tecidos prejudicando sua função normal (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). Ela se eleva intensamente em processos inflamatórios, particularmente durante a resposta crônica, culminando em seu acúmulo em tecidos e articulações (LANDMAN et al., 1998).

Assim como a PCR, a SAA é considerada um marcador sensível de inflamação. Por ser uma lipoproteína, sugere-se que esteja associada à aterosclerose em humanos (MALLE; BEER, 1995). Acredita-se que a SAA atue induzindo a adesão e quimiotaxia de células fagocíticas e linfócitos (GABAY; KUSHNER, 2001).

3.1.3. α_2 -Macroglobulina

A α_2 -Macroglobulina é uma das 2 principais inibidoras de proteases no plasma humano. Essa PFA liga-se às enzimas proteolíticas liberadas nos tecidos, promovendo sua remoção por macrófagos e fibroblastos e, dessa maneira, minimiza danos aos tecidos (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). A α_2 -Macroglobulina atua também na hemostasia, coagulação e fibrinólise (MOSHAGE, 1997).

3.1.4. α_1 -Glicoproteína ácida (AGP)

A AGP é considerada um agente anti-inflamatório e imunomodulador por inibir a atividade de neutrófilos e do complemento (FOURNIER et al., 2000). Também tem

sido sugerido que esta proteína seja essencial para a manutenção da permeabilidade capilar, provavelmente pelo aumento da seletividade da carga iônica da barreira endotelial (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). É implicada, ainda, no transporte de inúmeros fármacos (CERÓN et al., 2005).

3.1.5. α -Antitripsina

A α -Antitripsina é um inibidor de proteases derivadas dos leucócitos, como a elastase. Esta PFA atua se ligando às proteases impedindo a degradação do colágeno e da elastina e, portanto, tem papel essencial na prevenção dos danos aos tecidos inflamados (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000).

3.1.6. Haptoglobulina (Hp)

A Hp é responsável por se ligar e remover a hemoglobina livre proveniente da hemólise intravascular e, dessa forma, elimina esse produto tóxico e pró-inflamatório, evita a perda renal de ferro e ainda impede que esse metal seja aproveitado pelas bactérias (PETERSEN et al., 2004; GRUYS et al., 2005). Atua também inibindo a quimiotaxia de neutrófilos e células fagocíticas (CERÓN et al., 2005).

3.1.7. Fibrinogênio (Fb)

O Fb promove a formação de fibrina, agregação plaquetária, proliferação de células endoteliais e da musculatura lisa vascular (VOLP et al., 2008). Essa PFA, ao se acumular no sítio da lesão e na presença de leucócitos e plaquetas, estimula a formação e crescimento dos fibroblastos, culminando em uma maior resistência ao tecido acometido (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; MURATA et al., 2004).

3.1.8. Ceruloplasmina (Cp)

A Cp é a principal glicoproteína responsável pelo transporte de cobre. Ela transfere o cobre para o citocromo C oxidase, que é um componente crítico para a produção de energia necessária durante a cicatrização de feridas (EBERSOLE;

CAPPELLI, 2000). Dessa maneira, a Cp é essencial para a formação e maturação de colágeno e elastina da matriz extracelular (CERÓN et al., 2005). Além de promover a cicatrização, esta proteína também protege as células e os tecidos contra íons superóxidos, gerados por fagócitos ao removerem restos de tecido ou microrganismos (MURATA et al., 2004).

3.1.9. Transferrina

Usualmente classificada como PFA negativa em mamíferos, a transferrina tem seus níveis elevados durante a RFA em aves (CHAMANZA et al., 1999; XIE et al., 2002a). Possivelmente atua na imunidade inata por sequestrar íons férricos impedindo que agentes patogênicos e parasitas os utilizem como nutrientes (MURATA et al., 2004).

3.2. Funções das PFA

Embora, em muitos casos, as funções das PFA não sejam completamente elucidadas, há um consenso de que elas são benéficas (PALTRINIERI, 2008). Essa conformidade é amplamente inferida e baseada no que se conhece sobre a atuação de várias dessas proteínas e da especulação lógica de como essas podem servir a propósitos úteis na inflamação, cicatrização e adaptação à infecção ou lesão (TREY; KUSHNER, 1995). A resposta inflamatória é um processo complexo que envolve muitos tipos celulares e moléculas. Alguns que iniciam, amplificam ou sustentam o quadro inflamatório; outros que atenuam e, dependendo, até resolvem o processo. Várias destas PFA têm potencial para influenciar um ou mais desses estágios da inflamação (GABAY; KUSHNER, 1999). De modo geral, essas proteínas contribuem com a defesa do corpo por modularem o sistema imunológico e possuem funções microbicidas e de fagocitose (PCR, C₃ e C₄, AGP), pela ação hemostática (fibrinogênio), por propriedades antitrombóticas (AGA), por transportarem moléculas e prevenir sua perda potencial (Hp, Cp) ou por proteger os tecidos de danos excessivos por meio dos mediadores inflamatórios (SAA, α 1-antitripsina) (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; PALTRINIERI, 2008;). No entanto, a maioria das PFA possui mais de uma função (PETERSEN et al., 2004).

3.3. PFA em Aves

É sabido que a resposta sistêmica à inflamação na espécie aviária se comporta como nas demais espécies animais, incluindo febre, catabolismo muscular, anorexia e modificações em proteínas plasmáticas específicas (KOUTSOS; KLASING, 2001). Chamanza e colaboradores (1999) demonstraram que as concentrações plasmáticas das PFA podem ser utilizadas para monitorar a saúde das aves e identificar moléstias não observadas ao exame físico. Portanto, pode-se afirmar que são úteis na determinação do diagnóstico e também do prognóstico de enfermidades em aves (RATH et al., 2009).

Ainda assim, comparada aos mamíferos, poucas PFA já foram pesquisadas em aves (ADLER et al., 2001). Embora vários estudos tenham sido publicados nos últimos anos (DELERS et al., 1983; GRIENINGER et al., 1986; CHAMANZA et al., 1999), o conhecimento sobre as proteínas relacionadas à RFA ficam muito aquém daquele já estabelecido em outros animais e no homem (XIE et al., 2002a). Em aves, proteínas como a transferrina (JELTSCH et al., 1987), albumina (HACHÉ et al., 1983) e pré-albumina (DUAN et al., 1991) já foram totalmente sequenciadas, contudo, outras PFA como a α_2 -macroglobulina (NAGASE et al., 1983) e fibrinogênio (WEISSBACH et al., 1991) ainda permanecem parcialmente mapeadas.

As PFA estudadas durante o processo inflamatório incluem a albumina (GRIENINGER, 1986), hemopexina (GRIENINGER, 1986; ADLER et al., 2001), Cp (BUTLER et al., 1972; BUTLER; CURTIS, 1977), AGP (DELERS et al., 1983, TAKAHASHI et al., 1994, NAKAMURA et al., 1996; INOUE et al., 1997; NAKAMURA et al., 1998, TAKAHASHI et al., 1998; ADLER et al., 2001), PCR (PATTERSON; MORA, 1965), Fb (PINDYCK et al., 1977), SAA (LANDMAN et al., 1998, CHAMANZA et al., 1999) e transferrina (TOHJO et al., 1995; TOHJO et al., 1996; XIE et al., 2002b; RATH, 2005; RATH et al., 2009; HORROCKS et al., 2011). Todas estas proteínas se comportam em frangos como PFA positivas. Adler e colaboradores (2001), ao examinarem o comportamento de várias dessas proteínas, alegaram que a AGP e a hemopexina são as mais responsivas aos estímulos inflamatórios. A AGP, ao ser analisada em frangos com infecção natural e induzida experimentalmente, teve suas concentrações aumentadas de forma proporcional à severidade da infecção, atingindo seu pico em torno de 48 horas e retornando aos valores basais por volta dos 7 dias após o estímulo inflamatório inicial (NAKAMURA

et al., 1996; INOUE et al., 1997; ADLER et al., 2001). A hemopexina alcança seu pico plasmático máximo 24 horas após a RFA e persiste elevada durante 336 horas, sendo um melhor indicador nos casos em que o início da infecção é desconhecido (ADLER et al., 2001).

A SAA ainda carece de investigações em aves, entretanto, já foi apontada como uma PFA maior ao ser estudada em frangos, demonstrando o típico comportamento desse tipo de proteína ao elevar-se rapidamente após a infecção e declinar-se subitamente conforme a inflamação crônica, sendo útil na detecção de lesões agudas e na determinação do estágio da inflamação (aguda *versus* crônica) (CHAMANZA et al., 1999). Landman e colaboradores (1998) também correlacionaram níveis elevados de SAA como sendo responsáveis pela amiloidose aviária.

Diferentemente dos mamíferos, nos quais a transferrina tem sua síntese reduzida durante a inflamação, em pássaros ela se comporta como uma PFA positiva (CHAMANZA et al., 1999; XIE et al., 2002a). Embora seus níveis plasmáticos elevem-se durante estados inflamatórios, essa variável não deve ser utilizada para detectar a severidade e cronicidade das lesões, pois suas concentrações não diferem entre enfermidades severas ou brandas, nem entre crônicas e agudas (CHAMANZA et al., 1999). A respeito da albumina, os pássaros são semelhantes aos mamíferos, isto é, essa PFA atua de maneira negativa, com reduções que variam de moderadas a severas conforme a gravidade e duração do processo inflamatório (XIE, et al., 2000; ADLER et al., 2001).

4. Eletroforese de Proteínas

As proteínas são compostos essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas à maioria das funções fisiológicas (SILVA et al., 2005), por isso, podem fornecer informações significantes em relação às bases moleculares da saúde e da doença (SRINIVAS, 2012). Por essa razão, suas análises são de grande interesse científico e, ao longo dos anos, vários estudos possibilitaram sua quantificação e sua caracterização (JACOX, 1959; WERNER, 1969; LAURELL, 1973; GRIENINGER et al., 1986; BRISCOE et al., 2010).

Entre os métodos de qualificação e quantificação das proteínas plasmáticas destaca-se a eletroforese, que tem se tornado um importante meio auxiliar de

diagnóstico (NAOUM, 1999). Atualmente, essa tecnologia já está disponível na maioria dos laboratórios de referência e é capaz de promover com alta qualidade a separação das frações proteicas com baixos custos e com amostras mínimas de sangue (CRAY; TATUM, 1998).

A eletroforese de proteínas vem sendo aplicada para fins de diagnóstico em humanos há mais de cinco décadas (OGRYZLO et al., 1959). Por meio desta técnica, o fracionamento das proteínas auxiliou na investigação de doenças infecciosas, inflamatórias e neoplásicas (OSSERMAN; LAWLOR, 1955; DERMER et al., 1980; HARRINGTON et al., 1986; KORKMAZ et al., 2002). O uso desta ferramenta na medicina veterinária é mais recente (CRAY et al., 2007) e, nos últimos 20 anos, foi aplicada de forma similar ao uso humano, incluindo-se a eletroforese de proteínas como meio de diagnóstico complementar de uma série de doenças em diferentes espécies (FACCHINI et al., 2010; YANG et al., 2012).

As proteínas séricas em aves foram primeiramente analisadas nos frangos em estudos imunológicos sobre as PFA (BRANDT et al., 1951; PATTERSON et al., 1962); já nos anos mais recentes, o foco das publicações tem se voltado para a aplicação da eletroforese na avaliação dessas moléculas (ARCHER; BATTISON, 1997; CRAY; TATUM, 1998; TATUM et al., 2000; LANZAROT et al., 2001; CRAY et al., 2007; ROMAN et al., 2009a). Os sistemas comerciais de eletroforese para análises de amostras humanas que estão à disposição já foram avaliados e bem documentados e são hoje amplamente aplicados a outras espécies, porém, os padrões eletroforéticos observados nas aves diferem daqueles observados nos mamíferos (CRAY et al., 2007). Essas diferenças incluem a presença da pré-albumina em inúmeras espécies e uma mudança das PFA espécie-específica (IVEY, 2000; XIE et al., 2002a; PROENÇA, 2010).

A eletroforese de proteínas pode fornecer informações valiosas tanto para exames de triagem, quanto para o auxílio de diagnósticos diferenciais em aves enfermas (FUDGE; SPEER, 2001). Ela determina de forma acurada a concentração de albumina e a distribuição de globulinas, sendo útil, portanto, na diferenciação das condições inflamatórias em agudas ou crônicas, no monitoramento da resposta terapêutica e na definição do prognóstico. Além disso, o proteinograma permite detectar enfermidades em aves nem sempre passíveis de diagnóstico pelos testes bioquímicos séricos de rotina (CRAY; TATUM, 1998; POLO et al., 1998).

A eletroforese envolve a migração de diferentes cargas de moléculas submetidas a um campo elétrico, promovendo, dessa forma, a separação das proteínas em frações (SRINIVAS, 2012). O exame consiste em aplicar a amostra de plasma ou soro em um meio sólido e submetê-la a um potencial elétrico, para que as proteínas percorram distâncias diferentes, formando bandas (NAOUM, 1999). Há várias técnicas de fracionamento proteico, no entanto, as técnicas de eletroforese mais comuns utilizadas na medicina veterinária têm como matriz, filme de agarose ou fita de acetato de celulose (SANTANA et al., 2008). O número de frações observadas varia conforme a espécie e a técnica empregada (ALBERGHINA, 2011). Utilizando-se a eletroforese em agarose, pode-se identificar, em espécies aviárias, seis bandas que incluem pré-albumina, albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β -globulina, γ -globulina (LUMEIJ, 1987). Uma vez que cada uma dessas frações representa um conjunto de diversas proteínas, a eletroforese em gel de agarose não tem como finalidade identificar proteínas específicas, mas sim fornecer os componentes principais de cada fração (Tabela 3) para facilitar o raciocínio clínico e auxiliar no diagnóstico de doenças que possuam padrão eletroforético característico. Dessa forma, para correta interpretação da eletroforese, faz-se necessário conhecer o significado de cada uma das bandas (SILVA et al., 2008).

A pré-albumina, denominada transtiretina no vocabulário médico humano, é inexistente na maioria dos mamíferos (HARR, 2002). Sua concentração varia marcadamente entre as espécies de psitacídeos, podendo representar mais de 75% do total de albumina (pré-albumina mais albumina) em algumas espécies, enquanto que em outras, contribui somente com 10%, podendo até estar ausente (CRAY; TATUM, 1998). Essa fração é responsável por transportar o hormônio tireoideo (HARR, 2002).

A albumina representa a maior fração proteica na maioria das aves (POLO et al., 1998), todavia, geralmente sua concentração é inferior à de mamíferos (LUMEIJ, 1987). É sintetizada no fígado e possui funções importantes no organismo, como manutenção da pressão oncótica e transporte do material resultante de várias substâncias endógenas e exógenas (FUDGE; SPEER, 2001). A hipoalbuminemia é uma condição altamente inespecífica e pode estar relacionada a síntese prejudicada (cirrose hepática), ingestão proteica inadequada (desnutrição), perdas (renais ou intestinais) e a processos inflamatórios (NAOUM, 1999; SILVA et al., 2008).

Tabela 3. Principais componentes das frações proteicas separadas por eletroforese observadas em aves.

Fração Pré-albumina	
Fração Albumina	
Fração α_1 -globulina	α_1 -antitripsina
Fração α_2 -globulina	α_2 -macroglobulina
Fração β -globulina	Fibrinogênio β -lipoproteína Transferrina Complemento
Fração γ -globulina	Imunoglobulinas Produtos da degradação do Complemento

Fonte: CRAY; TATUM, 1998

Em casos de doenças inflamatórias agudas ou crônicas, a redução na concentração normalmente está associada à elevação das globulinas (α -globulinas, β -globulinas, γ -globulinas), levando a um característico decréscimo na relação albumina:globulina (BRISCOE, 2010).

As globulinas se diferenciam eletroforeticamente da albumina por apresentarem maiores tamanho e peso molecular (SILVA et al., 2005). São classificadas como proteínas de fase aguda (α_1 -globulina, α_2 -globulina e β -globulina) e imunoglobulinas (γ -globulina) (ECKERSALL, 2008). As α -globulinas se dividem em duas frações, α_1 -globulina e α_2 -globulina, e representam normalmente 4% a 8% do total de proteínas (CRAY; TATUM, 1998).

Em aves, a principal α_1 -globulina é a α_1 -antitripsina (FUDGE; SPEER, 2001). Esta proteína é o componente mais importante entre os inibidores de proteases e tem como função neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas durante o processo inflamatório agudo (NAOUM, 1999), dessa forma, normalmente encontra-se elevada durante a resposta inflamatória aguda (FUDGE; SPEER, 2001). Em humanos, a fração α_1 -globulina é composta ainda pela α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -

lipoproteína e α_1 -fetoproteína, embora, na prática, a α_1 -antitripsina seja a única responsável pela coloração da fração α_1 -globulina (SILVA et al., 2005).

Em humanos, a banda α_2 -globulina é constituída por um grupo variado de proteínas, entre elas a α_2 -macroglobulina, haptoglobulina e ceruloplasmina (SILVA et al., 2008). A primeira é a principal representante desta zona em aves (CRAY; TATUM, 1998). Assim como a α_1 -antitripsina, a α_2 -macroglobulina também faz parte dos inibidores de proteases, aumentando, portanto, em processos inflamatórios agudos (NAOUM, 1999).

As β -globulinas contribuem com 12% a 20% na concentração de proteínas (CRAY; TATUM, 1998). De maneira geral, essas PFA aumentam em episódios de infecção e inflamação aguda, embora de modo não muito consistente (FUDGE; SPEER, 2001). As β -globulinas incluem transferrina, β -lipoproteína, complemento e fibrinogênio (CRAY; TATUM, 1998; ROMAN et al., 2009b).

As γ -globulinas representam aproximadamente 10% da concentração proteica total e podem ser divididas em duas frações em mamíferos, mas em aves normalmente somente uma banda pode ser visualizada (CRAY; TATUM, 1998). As γ -globulinas são formadas pelos vários tipos de imunoglobulinas e pela proteína C reativa, tendo neste grupo a IgG como a principal fração (SILVA et al., 2005). Suas concentrações tornam-se elevadas após a produção de anticorpos ser estimulada pela presença de antígenos ou em decorrência de desordens malignas nestas células (NAOUM, 1999).

OBJETIVOS

Este estudo teve como principais objetivos:

- Determinar o proteinograma de araras mantidas em cativeiro por meio de eletroforese de proteínas séricas;
- Correlacionar a espécie, sexo e o ambiente com possíveis variações no perfil eletroforético de proteínas;
- Averiguar se as infecções por hematozoários Hemosporídeos se prestam como modelo de resposta de fase aguda, acarretando modificações no proteinograma;
- Avaliar a eletroforese de proteínas como ferramenta diagnóstica.

REFERÊNCIAS

ADLER, K. L.; PENG, P. H.; PENG, R. K.; KLASING, K. C. The kinetics of hemopexin and α 1-acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens. **Avian Disease**, v. 45, n. 2, p. 289-296, 2001.

ALBERGHINA, D.; GIANNETTO, C.; VAZZANA, I.; FERRANTELLI, V.; PICCIONE, G. Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 23, p. 111-114, 2011.

ALLGAYER, M. C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 344-350, 2007.

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.

ARCHER, F. J.; BATTISON, A. L. Differences in electrophoresis patterns between plasma albumins of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and the chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Avian Pathology**, v. 26, p. 865-870, 1997.

ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; LEASE, J. K. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Disease**, v. 37, n. 1, p. 20-27, 2001.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BECK, G.; HABICHT, G. S. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, p. 7429-7433, 1986.

BELO, N. O. **Ocorrência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres da família Psittacidae mantidas em cativeiro no Brasil.** Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

BENNETT, G. F.; SOUZA, O. Blood parasites of some birds from São Paulo, Brazil **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 1-2, p. 117-134, 1980.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, 2007.

BIRD, S.; WANG, T; ZOU, J.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, C. J. The first cytokine sequence within cartilaginous fish: IL-1 in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 3329-3340, 2002.

BRAGA, E. M.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; VALKIÜNAS, G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, supl. 1, p. 3-11, 2011.

BRANDT, L. W.; CLEGG, R. E.; ANDREWS, A. C. The effect of age and degree of maturity on the serum proteins of the chicken. **Biology Chemistry**, v. 191, p. 105-111, 1951.

BRISCOE, J. A.; ROSENTHAL, K. L.; SHOFER, F. S. Selected complete blood cell count and plasma protein electrophoresis parameters in pet psittacine birds evaluated for illness. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2010.

BUTLER, E.J.; CURTIS, M. J. The effect *Escherichia coli* endotoxins on plasma histaminase activity in the domestic fowl and the involvement of ceruloplasmina. **Research in Veterinary Science**, v. 22, p. 267-270, 1977.

BUTLER, E.J.; CURTIS, M.J.; HARRY, E.G.; DEB, J.R. Effect of *Escherichia coli*

endotoxins on plasma para-phenylenediamine oxidase (caeruloplasmin) activity in the domestic fowl. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, p. 299-306, 1972.

CASAS, J. P.; SHAH, T.; HIGORANI, A. D.; DANESH, J.; PEPYS, M. B. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, p. 295-314, 2008.

CERÓN, J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CHAMANZA, R. M.; TOUSSAINT, J. M.; VANEDEREN, A. M.; VANVEEN, L.; HULSKAMPKOECH, C.; FABRI, T. H. F. Serum amyloid a and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. **The Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 158-162, 1999.

COLLAR, N. J. Family Psittacidae (parrots). In: HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world: sandgrouse to cuckoos**. Barcelona: Lynx Editions, 1997. p. 280-447.

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 5, 2010. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/5>.

CRAY, C. C.; TATUM, L. M. Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 12, n. 1, p. 4-10, 1998.

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

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.

DELERS, F. Characterization of a chicken hemoglobin-binding protein: a novel haptoglobin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 74A, n. 3, p. 745-748, 1983.

DELERS, F.; DOMINGO, M.; ENGLER, R. Immunological homology between chicken alpha 1-acid glycoprotein and as egg white glycoprotein. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 74, n. 3, p. 619-622, 1983.

DERMER, G. B.; SILVERMAN, L. M.; GENDLER, S. J.; TÖKÉS, Z. A. Incidence of a split α_2 -glycoprotein band in the electrophoretic pattern for serum of adenocarcinoma patients. **Clinical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 392-395, 1980.

DUAN, W.; ACHEN, M. G.; RICHARDSON, S. J.; LAWRENCE, M. C.; WETTENHALL, R. E.; JAWOROWSKI, A.; SCHREIBER, G. Isolation, characterization, cDNA cloning and gene expression of an avian transthyretin. Implication for the evolution of structure and function of transthyretin in vertebrates. **European Journal of Biochemistry**, v. 200, p. 679-687, 1991.

EBERSOLE, J.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontology**, v. 23, p. 19-49, 2000.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 151, n. 7, p. 577-584, 2000.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117-156.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

FACCHINI, R. V.; BERTAZZOLO, W.; ZULIANI, D.; BONFANTI, U.; CALDIN, M.; AVALLONE, G.; ROCCABIANCA, P. Detection of biclonal gammopathy by capillary zone electrophoresis in a cat and a dog with plasma cell neoplasia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 4, p. 440-446, 2010.

FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. **Neotropical Biology Conservation**, v. 2, n. 3, p. 127-135, 2007.

FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E. M.; MARINI, M. A. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. **Emu - Austral Ornithology**, v. 111, p. 132-138, 2011.

FORSHAW, J. M. **Parrots of the World**. New Jersey: Princeton University Press, 2006. 242p.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 157-171, 2000.

FUDGE, A. M.; SPEER, B. Selected controversial topics in avian diagnostic testing. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 2, p. 96-101, 2001.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001. Disponível em: <http://www.immuneweb.xmu.edu.cn/reading/innate/1.pdf>.

GALETTI, M.; GUIMARÃES JR, P. R.; MARSDEN, S. J. Padrões de riqueza, riscos de extinção e conservação dos psitacídeos neotropicais. In: GALETTI, M.; GUIMARÃES JR, P. R. **Ecologia e Conservação de Psitacídeos no Brasil**. Belo Horizonte: Melopstacus, 2002. p. 17-26.

GODOY, S. N. **Patologia comparada de psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de São Paulo**. São Paulo: USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2001. 214 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada).

GODOY, S. N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 222-251.

GREFFE, A.; FRIEDRICHS, K.; HARR, K.; CONCORDET, D.; TRUMEL, C.; BRAUN, J. Reference values: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 3, p. 288-298, 2009.

GRIENINGER, G.; LIANG, T. J.; BEUVING, G.; GOLDFARB, V.; METCALFE, S. A.; MULLER-EBERHARD, U. Hemopexin is a developmentally regulated, acute-phase plasma protein in the chicken. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 33, p. 15719-15724, 1986.

GRIM, K. C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSON, N.; CUTCHAN, T. F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguin (*Spheniscus demersus*). **Parasitology Research**, v. 80, p. 634-637, 2003.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J.; van DIJK, E.; MELOEN, R. H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 229-232, 2006.

GUEDES, N. M. R. Management and conservation of the large macaws in the wild. **Ornitologia Neotropical**, v. 15 (suplemento), p. 279-283, 2004.

GUEDES, N. M. R.; SCHERER, P. N.; CARCIOFI, A. C.; WERTHER, K.; BIASIA, I.; GIOVANARDI, A. A.; CAVALHEIRO, M. de L. Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**, 2008. p. 146-173.

HACHÉ, R. J.; WISKOCIL, R.; VASA, M.; ROY, R. N.; LAU, P. C.; DEELEY, R. G. The 5' noncoding and flanking regions of the avian very low density apolipoprotein II and serum albumin genes. Homologies with the egg white protein genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 4556-4564, 1983.

HARRINGTON, M. G.; MERRIL, C. R.; ASHER, D. M.; GAJDUSEK, C. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 279-283, 1986.

HORROCKS, N. P. C.; TIELEMAN, I.; MATSON, K. D. A simple assay for measurement of ovotransferrin – a marker of inflammation and infection in birds. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 5, p. 518-526, 2011.

HUANG, H.; POTTER, A. A.; CAMPOS, M.; LEIGHTON, F. A.; WILLSON, P. J.; HAINES, D. M.; YATES, W. D. Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part II: roles of proinflammatory cytokines. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 69-78, 1999.

INOUE, M.; SATOH, W.; MURAKAMI, H. Plasma α 1-acid glycoprotein in chickens infected with infectious bursal disease virus. **Avian Disease**, v. 41, n. 1, p. 164-170, 1997.

INSTITUTO ARARA AZUL. **Projeto Arara Azul, Araras Brasileiras**, 2009. Disponível em: <http://www.projetoararaazul.org.br/arara/Home/AAraraAzul/Ararasbrasileiras/tabid/310/Default.aspx>.

IVEY, E. S. Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 14, n. 2, p. 103-106, 2000.

JACOX, R. F. Analysis of the proteins of rat serum by starch electrophoresis and by cationic detergent analysis. I. Identification of an unusual globulin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 110, p. 341-353, 1959.

JELTSCH, J. M.; HEN, R.; MAROTEAUX, L.; GARNIER, J. M.; CHAMBON, P. Sequence of the chicken ovotransferrin gene. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 7643-7645, 1987.

KARROW, N. A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, n. 2, p. 144-158, 2006.

KOJ, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. **Biochim Biophys Acta**, v. 1317, p. 84-94, 1996.

KORKMAZ, C.; OZDOGAN, H.; KASAPÇOPUR, Ö.; YAZICI, H. Acute phase response in familial Mediterranean fever. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, p. 79-81, 2002.

KOUTSOS, E. A.; KLASING, K. C. The acute phase response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 128, p. 255-263, 2001.

LANDMAN, W. J. M.; GRUYS, E.; GIELKENS, A. L. J. Avian amyloidosis. **Avian Pathology**, v. 27, n. 5, p. 437-449, 1998.

LANZAROT, M. P.; MONTESINOS, A.; SAN ANDRÉS, M. I.; RODRÍGUEZ, C.; BARAHONA, M. V. Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values

of free-living nestling peregrine falcons in Spain. **Journal of Wildlife Disease**, v. 37, n. 1, p. 172-177, 2001.

LAURELL, C. B. Electrophoresis, specific protein assays, or both in measurement of plasma proteins? **Clinical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 99-102, 1973.

LEE, K. A.; MARTIN II, L. B.; HASSELQUIST, D.; RICKLEFS, R. E.; WIKELSKI, M. Contrasting adaptive immune defenses and blood parasite prevalence in closely related *Passer* sparrows. **Oecologia**, v. 150, p. 383-392, 2006.

LUMEIJ, J. T. The diagnostic value of plasma proteins and non-protein nitrogen substances in birds. **Veterinary Quarterly**, v. 9, n. 3, p. 262-268, 1987.

MAITLAND, M.; MARSH, M. Pathophysiology of severe malaria in children. **Acta Tropica**, v. 90, n. 2, p. 131-140, 2004.

MALLE, E.; BEER, F. C. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 26, n. 6, p. 427-435, 1996.

MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 95-102, 2005.

MENDES, L.; PIERSMA, T.; HASSELQUIST, D.; MATSON, K. D.; RICKLEFS, R. E. Variation in the innate and acquired arms of the immune system among five shorebird species. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 284-291, 2006.

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

MORLEY, J. J.; KUSHNER, I. Serum C-reactive protein levels in disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 389, p. 406-418, 1982.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **Journal of Pathology**, v. 181, p. 257-266, 1997.

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

NAGASE, H.; HARRIS JR., E. D. Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. Mechanism of inhibition studied with collagenase and thermolysin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 7490-7498, 1983.

NAKAMURA, K.; IMAI, K.; TANIMURA, N. Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. **Journal of Comparative Pathology**, v. 114, p. 11-21, 1996.

NAKAMURA, K.; MITARAI, Y.; YOSHIOKA, M.; KOIZUMI, N.; SHIBAHARA, T.; NAKAJIMA, Y. Serum levels of interleukin-6, alpha1-acid glycoprotein, and corticosterone in two-week-old chickens inoculated with Escherichia coli lipopolysaccharide. **Poultry Science**, v. 77, n. 6, p. 908-911, 1998.

NAOUM, P. C. **Eletroforese - técnicas e diagnóstico**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1999. 154 p.

OGRYZLO, M. A.; MACLACHLAN, M.; DAUPHINEE, J. A.; FLETCHER, A. A. The serum proteins in health and disease: filter paper electrophoresis. **The American Journal of Medicine**, v. 27, n. 4, p. 596-616, 1959.

OSSERMAN, E. F.; LAWLOR, D. P. Abnormal serum and urine proteins in thirty-five cases of multiple myeloma, as studied by filter paper electrophoresis. **The American Journal of Medicine**, v. 18, n. 3, p. 462-476, 1955.

PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 26-35, 2008.

PATTERSON, L. T.; MORA, E. C. The C-reactive protein response and disease resistance in the domestic fowl. **Texas Reports on Biology & Medicine**, v. 23, p. 600-606, 1965.

PATTERSON, R.; YOUNGNER, J. S.; WEIGLE, W. O.; DIXON, F. J. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. **The Journal of Immunology**, v. 89, n. 2, p. 272-278, 1962.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

PINDYCK, J.; MOSESSON, M. W.; BANNERJEE, D.; GALANAKIS, D. The structural characteristic of chicken fibrinogen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 492, p. 377-386, 1977.

POLO, F. J.; PEINADO, V. I.; VISCOR, G.; PALOMEQUE, J. Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. **Avian Disease**, v. 42, p. 523-535, 1998.

PORTH, C. M. **Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 915 p.

PROENÇA, L. M. **Proteinograma sérico e parâmetros hematológicos de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro**. Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. 51 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

RATH, N. C. Ovotransferrin as an avian acute phase protein and its immunomodulatory function. In: International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins, 5, March, 2005. Dublin, Irlanda. **Proceedings...** Dublin, 2005. p. 18.

RATH, N. C.; ANTHONY, N. B.; KANNAN, L.; HUFF, E.; HUFF, G. R.; CHAPMAN, H. D.; ERF, G. F.; WAKENELL, P. Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. **Poultry Science**, v. 88, p. 2069-2074, 2009.

RENTAS. **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Animais Silvestres**, 2001. Disponível em: http://www.rentas.org.br/pt/trafico/rel_rentas.asp.

RIBEIRO, C. T.; FERREIRA da CRUZ, M. F. The new and the old in malaria immunopathology. **Ciência e Cultura**, v. 52, n. 4/5, p. 269-281, 2000.

RIOND, B.; WENGER-RIGGENBACH, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 1, p. 73-77, 2009.

ROMAN, Y.; BOMSEL-DEMONTY, M. C.; LEVRIER, J.; CHASTE-DUVERNOY, D.; JALME, M. S. Effect of hemolysis on plasma protein levels and plasma electrophoresis in bird. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 1, p. 73-80, 2009a.

ROMAN, Y.; LEVRIER, J.; ORDONNEAU, D.; CHASTE-DUVERNOY, D.; BOMSEL-DEMONTY, M. C.; JALME, M. S. Location of the fibrinogen and albumin fractions in plasma protein electrophoresis agarose gels of five taxonomically distinct bird species. **Revue Medicine Veterinaire**, v. 160, n. 3, p. 160-165, 2009b.

SÁ, M. R. Os estudos em malária aviária e o Brasil no contexto científico internacional (1907-1945). **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 18, n. 2, p. 499-518, 2011.

SANTANA, A. M.; FAGLIARI, J. J.; CAMARGO, C. M. Proteinograma sérico de veados-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) criados em cativeiro obtidos por eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida (SDS PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1560-1563, 2008.

SANTOS, W. B.; MESQUITA, E. T.; VIEIRA, R. M. R.; OLEJ, B.; COUTINHO, M.; AVEZUM, A. Proteína-C-reativa e doença cardiovascular. As bases da evidência científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 4, p. 452-456, 2003.

SCHEERLINCK, J. Y.; YEN, H. Veterinary applications of cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 17-22, 2005.

SEBAIO, F.; BRAGA, E. M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M. A. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 7-15, 2012.

SICK, H. Ordem Psittaciformes. In: SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 351-382.

SILVA, D. G. K. C.; TEODORO, G. M.; SENA, L. V.; SOUSA, Z. M.; REZENDE, A. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no hospital de pediatria – Hosped/UFRN da cidade de Natal – RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 239-242, 2005.

SILVA, R. O. de P.; LOPES, A. de F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

SNYDER, N.; MCGOWAN, o.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. Parrots. Status survey and conservation action plan 2000-2004. **The World Conservation Union**. 2000. Disponível em: http://www.parrots.org/pdfs/our_publications/psittascene/2000/00May43.pdf

SONG, C.; DINAN, T.; LEONARD, B. E. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. **Journal of Affective Disorders**, v. 30, p. 283-288, 1994.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and C-reactive protein (CRP) in

patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

SRINIVAS, P. R. Introduction to Protein Electrophoresis. In: KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. **Protein Electrophoresis: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2012. p. 23-28.

STAEHELI, P.; PUHLER, F.; SCHNEIDER, K.; GÖBEL, T. W.; KASPERS, B. Cytokines of birds: conserved functions - a largely different look. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 21, p. 993-1010, 2001.

SUFFREDINI, A. F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J.J.; O'GRANDY, N. P. New insights into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, n. 4, p. 203-214, 1999.

TAKAHASHI, K.; NAJI, N.; AKIBA, Y.; TAMURA, K. Plasma alpha 1-acid glycoprotein concentration in broilers: Influence of age, sex and injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **British Poultry Science**, v. 35, p. 427-432, 1994.

TAKAHASHI, K.; MIYAKE, N.; OHTA, T.; AKIBA, Y.; TAMURA, K. Changes in plasma alpha 1-acid glycoprotein concentration and selected immune response in broiler chickens injected with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **British Poultry Science**, v. 39, p. 152-155, 1998.

TATUM, L. M.; ZAIAS, J.; MEALEY, B. K.; CRAY, C; BOSSART, G. D. Protein electrophoresis is a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 4, p. 497-502, 2000.

TILLET, W.; FRANCIS T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. **Journal Experimental Medicine**, v. 52, p. 561-571, 1930.

TOHJO, H.; MIYOSHI, F.; UCHIDA, E.; NIIYAMA, M.; SYUTO, B.; MORITSU, Y.; ICHIKAWA, S.; TAKEUCHI, M. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of

chicken serum in acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine. **Poultry Science**, v. 74, p. 648-655, 1995.

TOHJO, H.; YADATSU, M.; UCHIDA, E.; NIIYAMA, M.; SYUTO, B.; MORITSU, Y.; ICHIKAWA, S.; TAKEUCHI, M. Polyacrylamide gel electrophoretic serum protein patterns of acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine in young broiler chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 267-268, 1996.

TRAUTWEIN, C.; BÖKER, K.; MANNS, M. P. Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defense mechanisms. **Gut**, v. 35, p. 1163-1166, 1994.

TREY, J. E.; KUSHNER, I. Critical reviews in oncology. **Hematology**, v. 21, p. 1-18, 1995.

VALKIÜNAS, G. **Avian Malaria Parasite and other Haemosporidia**. Florida: CRC press, 2005. 946p.

VOLP, A. C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINQUETA, P. C.; BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537-549, 2008.

WEISSBACH, L.; ODDOUX, C.; PROCYK, R.; GRIENINGER, G. The beta chain of chicken fibrinogen contains an atypical thrombin cleavage site. **Biochemistry**, v. 30, p. 3290-3294, 1991.

WERNER, M. Serum protein changes during the acute phase reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 25, n. 2, p. 299-305, 1969.

WOODWORTH-LYNAS, C. B.; CAINES, J. R.; BENNETT, G. F. Prevalence of avian haematozoa in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 515-526, 1989.

XIE, H.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M.; HOLT, P.; RATH, N. C. Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. **Poultry Science**, v. 79, p. 33-40, 2000.

XIE, H.; RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. **Poultry Science**, v. 81, p. 112-120, 2002a.

XIE, H.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M.; RATH, N. C. Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-granulocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 805-815, 2002b.

YANG, Y.; AN, T.; GONG, D.; LI, D.; PENG, J.; LENG, C.; YUAN, Z.; TONG, G.; TIAN, Z.; ZHANG, D. Identification of porcine serum proteins modified in response to HP-PRRSV HuN4 infection by two-dimensional differential gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3-4, p. 237-246, 2012.

YAZDANI, S. S.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S.; CHITNIS, C. E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 187-203, 2006.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO

As florestas brasileiras abrigam os maiores representantes dos psitacídeos: as araras. No Brasil, oito espécies de araras são conhecidas: *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Anodorhynchus leari*, *Anodorhynchus glaucus*, *Cyanopsitta spixii* (em extinção), *Ara ararauna*, *Ara macao*, *Ara severus* e *Ara chloroptera* (INSTITUTO ARARA AZUL, 2009; IUCN, 2011). Há um grande número de espécies mantidas em cativeiro, não apenas como animais de estimação, como em zoológicos e criatórios de preservação (STORM, 1996).

Atrativos como beleza, coloração, inteligência e aptidão em interagir com os humanos tornaram as araras um dos psitacídeos da fauna brasileira mais comumente apreciadas como animais de companhia (SICK, 1997; RENCTAS, 2001). O sucesso na criação de psitacídeos em cativeiro, bem como sua conservação em vida livre, depende de boas práticas de manejo e do controle e tratamento de doenças, uma vez que essas aves são suscetíveis a diversas enfermidades (GODOY, 2006). O médico veterinário tem papel ímpar no contexto de saúde animal e para que o clínico estabeleça diagnósticos, prognósticos, institua terapias e aplique medidas profiláticas, é necessária a utilização de indicadores para a avaliação fisiológica desses indivíduos (GOMES et al., 2011).

Dentre as doenças que acometem os psitacídeos, destacam-se as de origem infecciosa como as principais promotoras de óbito na ordem em questão (GODOY, 2001). É sabido que, independente do agente etiológico, a resposta de fase aguda é

o ponto comum a qualquer enfermidade, assim sendo, a comunidade científica vem focando sua atenção nas proteínas de fase aguda como ferramentas de diagnóstico (HORROCKS et al., 2011). A identificação de tais proteínas representa um grande atrativo na medicina aviária, pois é uma técnica útil na constatação de diversas enfermidades, requer pequeno volume de sangue e dispensa anticorpos específicos.

Neste contexto, a realização de estudos nessa área é imprescindível em decorrência da escassez de informações a respeito de valores de referência regionais sobre proteinograma em aves de companhia e vida livre. Pesquisas dessa natureza podem colaborar para o diagnóstico e prognóstico de inúmeras enfermidades em pássaros, tendo-se em vista que tal contribuição requer o conhecimento prévio de dados referenciais para cada espécie, visto que esses variam consideravelmente entre os indivíduos (LANZAROT et al., 2001).

O objetivo do presente estudo foi determinar o proteinograma pela técnica de eletroforese em gel de agarose de araras de cativeiro, assintomáticas, previamente testadas, positivas e negativas para hemoparasitoses causadas por Hemosporídeos aviários, assim como confrontar os resultados dessa ferramenta diagnóstica com outros dados laboratoriais e comparar o perfil eletroforético das proteínas de fase aguda nos animais infectados com àquele dos animais não infectados. Ademais, objetivou-se identificar se as variáveis espécie, sexo e habitat interferem nos valores das frações proteicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras

Foram utilizadas amostras de sangue de 102 araras de cativeiro incluindo-se seis espécies distintas e híbridas: *Ara ararauna* (n = 49), *Ara chloroptera* (n = 24), *Anodorhynchus hyacinthinus* (n = 10), *Ara macao* (n = 9), *Ara rubrogenis* (n = 2), *Ara glaucogularis* (n = 1) e híbridas (*Ara ararauna* e *Ara chloroptera*) (n = 7). As amostras foram colhidas independentemente de espécie, sexo e idade; incluindo-se somente indivíduos clinicamente saudáveis, adultos e fora da fase reprodutiva. A higidez dos animais foi assegurada mediante realização de exames clínicos e

laboratoriais, abrangendo-se neste último, perfis hematológicos e bioquímicos (anexo I). Para a determinação de processo inflamatório, utilizou-se como parâmetro a contagem total de leucócitos superior ao dobro do valor de referência (RITCHIE et al., 1994).

Os métodos experimentais deste projeto foram previamente considerados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UnB (nº 62.084/2010).

Os animais eram oriundos de três criadouros distintos situados no Estado de Goiás e no Distrito Federal e, dessa forma, foram classificados em três grupos conforme suas respectivas alocações originais (Tabela 4):

- Grupo 1 (G1): Criadouro de Aves Apoená (Corumbá de Goiás/GO - 15°49'13,80"S e 48°28'25,56"O);
- Grupo 2 (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Brasília/DF - 15°50'23,50"S e 47°55'54,95"O);
- Grupo 3 (G3): Criadouro comercial Zoobotânica Abreu e Lima (Brasília/DF - 15°49'20,62"S e 47°44'27,36"O).

Para a separação eletroforética de proteínas em filmes de agarose, foram utilizadas amostras de soro previamente colhidas, examinadas, sexadas, testadas para hemoparasitas Hemosporídeos aviários e armazenadas a -20°C, e gentilmente cedidas pela M.Sc. Roberta Rendy Ramos.

Tabela 4. Distribuição por grupos das araras conforme a espécie.

Espécie	G1	G2	G3	Total
<i>A. ararauna</i>	19	20	10	49
<i>A. chloroptera</i>	13	9	2	24
<i>A. hyacinthinus</i>	7	3	0	10
<i>A. macao</i>	0	5	4	9
<i>A. rubrogenis</i>	0	2	0	2
<i>A. glaucogularis</i>	0	1	0	1
Híbridas	0	0	7	7
Total	39	40	23	102

(G1): Criadouro de Aves Apoená; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima.

2. Colheita, processamento e armazenamento das amostras

As colheitas de sangue foram realizadas nas instalações dos criadouros referentes à procedência de cada ave. Para a obtenção de tais amostras, os animais foram contidos quimicamente com anestesia volátil utilizando-se isoflurano¹ em oxigênio a 100%², através de máscara e/ou sonda endotraqueal.

O volume de sangue correspondente a no máximo 1% do peso do animal (em média 3 mL) foi obtido por meio de venopunção das veias jugular ou braquial. Essas amostras foram fracionadas e acondicionadas em tubos, sendo uma das alíquotas armazenada em anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e a outra em tubos sem anticoagulante. Ambas amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento de seus processamentos.

3. Análises laboratoriais

3.1. Local da realização dos exames laboratoriais

Os hemogramas foram realizados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária. A eletroforese das proteínas foi realizada no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular do Hospital Veterinário. Ambos são pertencentes à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal.

3.2. Determinação do hemograma

As amostras de sangue foram diluídas com *Natt & Herrick* na proporção 1:200 e as células (hemácias, leucócitos e trombócitos) foram determinadas por meio de contagem em Câmara de Neubauer Improved[®].

¹ Isoforine[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, SP, Brasil.

² Conques Slim, HB Hospitalar Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

3.3. Determinação de proteínas totais

Para a obtenção do soro e realização dos ensaios bioquímicos, as amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.000 rpm durante cinco minutos. As proteínas totais foram mensuradas por meio de aparelho analisador de bioquímicos semiautomático³ com uso de kits comerciais⁴, em consonância com as recomendações do fabricante.

3.4. Sexagem

O sexo das aves foi determinado por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP), tendo-se em vista que as araras são animais monomórficos.

3.5. Identificação de amostras positivas e negativas para Hemosporídeos

A ocorrência de infecção por Hemosporídeos foi determinada por pesquisa previa em microscopia ótica e Reação em Cadeia da Polimerase (RCP).

3.6. Determinação do proteinograma sérico

O fracionamento proteico foi obtido por meio da técnica de eletroforese em filme de agarose⁵ recomendada por Cray e Tatum (1998), e em consonância com as especificações fornecidas pelo fabricante. Para tanto, foram utilizadas amostras previamente descongeladas e isentas de hemólise ou lipemia aparente. Uma alíquota de 0,4 µL de soro sanguíneo foi depositada no fosso do filme de agarose e este, em seguida, foi assentado no porta filme. O porta filme foi, então, depositado na cuba⁶ previamente preenchida com 80 mL de tampão tris⁷ de pH 9,5 gelado (2 a 8°C), de modo que os polos negativos do filme coincidissem com os da cuba. Em

³ Bio-2000®, Bioplus – Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil.

⁵ CELMGEL®, CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil.

⁶ Cuba para eletroforese C-90 – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil.

⁷ Tampão Tris 9,5 CELM, CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil.

seguida, as amostras foram submetidas à corrente elétrica de 100 volts pelo período de 20 minutos, em fonte apropriada⁸.

Findo o tempo necessário para a separação das proteínas, a fonte foi imediatamente desligada e o filme foi retirado do porta filme para ser corado. Este permaneceu imerso em 200 mL de corante *amido black* por um período de cinco minutos, sendo em seguida colocado no mesmo volume de ácido acético a 5% para a remoção do excesso de corante, durante período idêntico ao anterior. Em seguida, o filme foi submetido a uma temperatura em torno de 60°C até que o mesmo ficasse completamente seco. Após, procedeu-se a retirada de restos de corante, submergindo-se, mais uma vez, o filme em ácido acético 5%. O filme, então, já exibindo nitidamente as frações, foi seco novamente. As análises de corrida foram realizadas por densitometria mediante escaneamento⁹, e as frações proteicas foram definidas mediante seleção manual dos pontos de separação. O valor absoluto (g/dL) de cada proteína foi calculada em função da porcentagem referente a cada fração sobre as proteínas totais, previamente conhecidas.

4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software SAS 9.2[®]. Todos os resíduos tiveram distribuição normal, verificada através do teste de Kolmogorv-Smirnov. Para se comparar os efeitos sexo, local e diagnóstico de Hemosporídeos em araras, para as diversas medidas hematológicas e bioquímicas, foi utilizado um modelo de análise de variância de efeitos mistos. Considerou-se a espécie da arara o efeito aleatório e local, sexo e positividade ou negatividade para Hemosporídeos os efeitos fixos do modelo. Correção de Bonferroni foi empregada para se ajustar as comparações pré-especificadas, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

⁸ Fonte FEA – 250, CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil.

⁹ Scanner SDS-60, CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil.

RESULTADOS

Os indivíduos foram separados em machos e fêmeas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primeiros representaram 60,78% (62/102) do total da amostra, enquanto que o sexo feminino contribuiu com 39,22% (40/102). A distribuição dos animais por sexo em cada grupo está demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição de araras conforme o sexo nos grupos.

Local	Fêmeas (40/102)	Machos (62/102)
G1 (39/102)	14	25
G2 (40/102)	13	27
G3 (23/102)	13	10
Total	40	62

(G1): Criadouro de Aves Apoena; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima.

As araras foram avaliadas quanto ao parasitismo por Hemosporídeos e classificadas como positivas e negativas. Do total de 102 amostras examinadas, 85,29% (87/102) foram negativas para a hemoparasitose em questão, enquanto 14,71% (15/102) foram diagnosticadas positivamente para Hemosporídeos. A distribuição de animais infectados de acordo com a espécie em cada grupo está relacionada na tabela 6.

O perfil eletroforético das proteínas e as frações observadas podem ser observadas nas figuras 1 e 2.

Na avaliação dos fatores analisados, o “local” foi a variável de efeito e influenciou os resultados considerados sobre leucócitos e frações proteicas, exceto as duas frações de α -globulinas. Já o fator “sexo” merece crédito somente sobre a variável pré-albumina. A presença de parasitismo por Hemosporídeos não se mostrou estatisticamente significativa em relação às proteínas nem à contagem de leucócitos. Na análise estatística, o fator “espécie” de arara foi considerado efeito aleatório e, por essa razão, sua possível influência sobre as outras variáveis não foi inferida. Os resultados dos valores médios e desvios padrão de leucócitos e frações proteicas nas araras fêmeas e machos, positivas e negativas para infecção por Hemosporídeos de todos os criadouros amostrados estão descritos nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 6. Número de araras negativas e positivas para Hemosporídeos distribuídas por espécie em cada grupo.

	Negativo	Positivo
G1 (n=39)		
<i>A. ararauna</i> (19/39)	43,58% (17/39)	5,13% (2/39)
<i>A. chloroptera</i> (13/39)	25,64% (10/39)	7,69% (3/39)
<i>A. hyacintinus</i> (7/39)	12,82% (5/39)	5,12% (2/39)
Total	82,05% (32/39)	17,94% (7/39)
G2 (n=40)		
<i>A. ararauna</i> (20/40)	42,50% (17/40)	7,50% (3/40)
<i>A. chloroptera</i> (9/40)	20,00% (8/40)	2,50% (1/40)
<i>A. hyacintinus</i> (3/40)	7,50% (3/40)	0% (0/40)
<i>A. macao</i> (5/40)	7,50% (3/40)	5,00% (2/40)
<i>A. rubrogenis</i> (2/40)	5,00% (2/40)	0% (0/40)
<i>A. glaucogularis</i> (1/40)	2,50% (1/40)	0% (0/40)
Total	85,00% (34/40)	15,00% (6/40)
G3 (n=23)		
<i>A. ararauna</i> (10/23)	39,13% (9/23)	4,34% (1/23)
<i>A. chloroptera</i> (2/23)	8,69% (2/23)	0% (0/40)
<i>A. macao</i> (4/23)	13,04% (3/23)	4,34% (1/23)
Híbrida (7/23)	30,43% (7/23)	0% (0/40)
Total	91,30% (21/23)	8,69% (2/23)
Total (n=102)	85,30% (87/102)	14,70% (15/102)

(G1): Criadouro de Aves Apoena; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima.

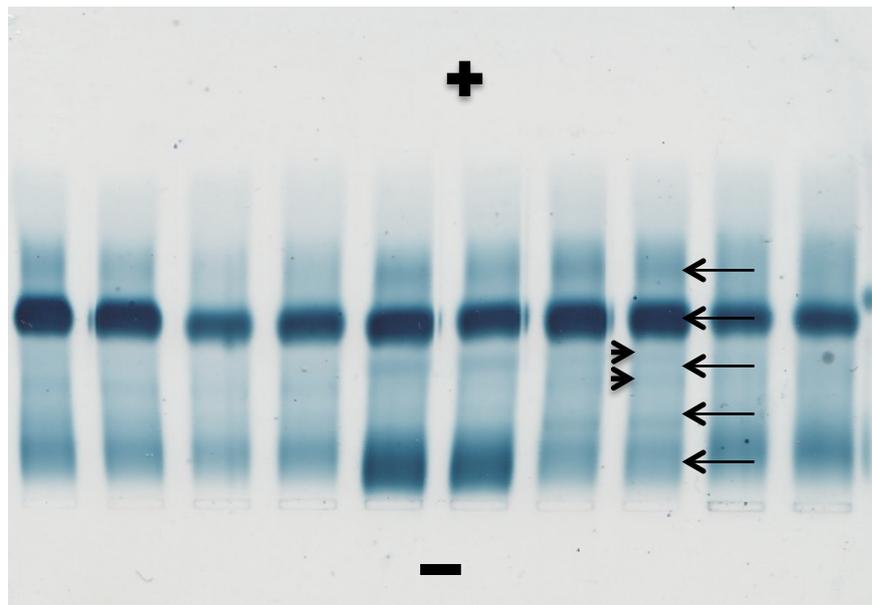


Figura 1. Corrida eletroforética. Do pólo positivo (+) para o negativo (-): pré-albumina, albumina, α -globulinas, β -globulina e γ -globulina. Notar a divisão da fração α -globulina em duas subfrações distintas, α_1 -globulina e α_2 -globulina (cabeças de seta).

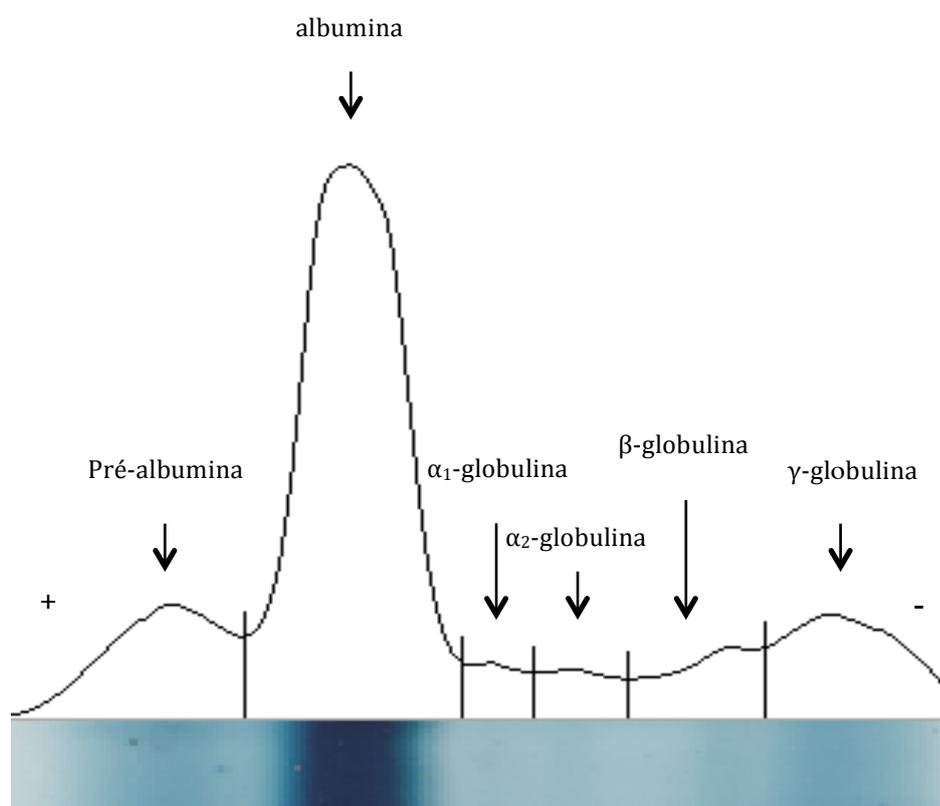


Figura 2. Gráfico de corrida eletroforética normal para psitacídeos.

Tabela 7. Valores médios e desvios padrão de leucócitos e proteínas totais e valores absolutos e relativos (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas araras positivas e negativas para infecção por Hemosporídeos de todos os criadouros amostrados.

Parâmetro	Positivos (15/102)	Negativos (87/102)	VR
Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	$14,38 \pm 2,07^a$	$13,59 \pm 1,41^a$	$18,92 \pm 5,56$
PT (g/dL)	$3,14 \pm 0,18^a$	$3,16 \pm 0,13^a$	$2,50 \pm 0,70$
Pré-albumina (g/dL)	$0,39 \pm 0,03^a$	$0,40 \pm 0,01^a$	$0,30 \pm 0,10$
(%)	$(13,5 \pm 5,2)$	$(13,2 \pm 4,5)$	
Albumina (g/dL)	$1,53 \pm 0,10^a$	$1,63 \pm 0,05^a$	$1,50 \pm 0,40$
(%)	$(46,8 \pm 10,8)$	$(51,0 \pm 8,1)$	
α_1 -Globulina (g/dL)	$0,13 \pm 0,01^a$	$0,12 \pm 0,01^a$	$0,30 \pm 0,10^*$
(%)	$(3,9 \pm 1,5)$	$(3,6 \pm 1,6)$	
α_2 -Globulina (g/dL)	$0,16 \pm 0,01^a$	$0,14 \pm 0,01^a$	
(%)	$(5,2 \pm 2,2)$	$(4,5 \pm 1,9)$	
β - Globulina (g/dL)	$0,25 \pm 0,03^a$	$0,25 \pm 0,02^a$	$0,30 \pm 0,20$
(%)	$(7,8 \pm 2,4)$	$(7,4 \pm 3,3)$	
γ - Globulina (g/dL)	$0,69 \pm 0,08^a$	$0,64 \pm 0,06^a$	$0,30 \pm 0,10$
(%)	$(22,8 \pm 8,9)$	$(20,3 \pm 6,0)$	

Nenhum dos valores diferiram entre si; VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (RITCHIE et al., 1994), * os autores não fragmentaram a α -Globulina em duas frações.

Tabela 8. Valores médios e desvios padrão de leucócitos e proteínas totais e valores absolutos e relativos (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas araras fêmeas e machos de todos os criadouros amostrados.

Parâmetro	Fêmeas (40/102)	Machos (62/102)	VR
Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	15,20 \pm 1,76 ^a	12,77 \pm 1,58 ^a	18,92 \pm 5,56
PT (g/dL)	3,18 \pm 0,16 ^a	3,12 \pm 0,14 ^a	2,50 \pm 0,70
Pré-albumina (g/dL)	0,36 \pm 0,02 ^a	0,44 \pm 0,02 ^b	0,30 \pm 0,10
(%)	(11,4 \pm 4,0)	(14,5 \pm 4,5)	
Albumina (g/dL)	1,63 \pm 0,08 ^a	1,54 \pm 0,07 ^a	1,50 \pm 0,40
(%)	(51,9 \pm 8,3)	(49,4 \pm 8,7)	
α_1 -Globulina (g/dL)	0,13 \pm 0,01 ^a	0,12 \pm 0,01 ^a	0,30 \pm 0,10*
(%)	(3,7 \pm 1,3)	(3,7 \pm 1,8)	
α_2 -Globulina (g/dL)	0,14 \pm 0,01 ^a	0,15 \pm 0,01 ^a	
(%)	(4,2 \pm 1,8)	(4,8 \pm 2,1)	
β -Globulina (g/dL)	0,25 \pm 0,03 ^a	0,24 \pm 0,02 ^a	0,30 \pm 0,20
(%)	(7,4 \pm 2,6)	(7,5 \pm 3,5)	
γ -Globulina (g/dL)	0,70 \pm 0,07 ^a	0,62 \pm 0,06 ^a	0,30 \pm 0,10
(%)	(21,4 \pm 6,5)	(20,1 \pm 6,5)	

Valores médios seguidos por letras diferentes entre as colunas são significativos ao nível de 5% pelo teste de Bonferroni; VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (RITCHIE et al., 1994), * os autores não fragmentaram a α - Globulina em duas frações.

A alteração proteica mais observada nos indivíduos do G2 foi a hipergamaglobulinemia [valor de referência: 0,30 \pm 0,10 g/dL (RITCHIE et al., 1994)] em 95% dos indivíduos (38/40), sendo que 75% (30/40) destes possuíam concentrações de γ -globulina superiores àquelas observadas em psitacídeos com enfermidades crônicas [0,57 g/dL (BRISCOE et al., 2010)]. Dentre estes últimos, 16,66% (5/30) apresentaram também hiperbetaglobulinemia [valor de referência: 0,30 \pm 0,20 g/dL (RITCHIE et al., 1994)], 13,33% (4/30) hipoalbuminemia [valor de referência: 1,50 \pm 0,40 g/dL (RITCHIE et al., 1994)], 10% (3/30) concentrações inferiores de pré-albumina [valor de referência: 0,30 \pm 0,10 g/dL (RITCHIE et al., 1994)], 23% (7/30) associação de hipergamaglobulinemia com uma ou mais alterações de proteinograma relacionadas às frações supracitadas e 3% (1/30) incluíram aumentos das β e γ globulinas e decréscimos na pré-albumina e albumina. Nenhuma das amostras analisadas possuíam alterações em α -globulinas [valor de referência: 0,30 \pm 0,10 g/dL (RITCHIE et al., 1994)]. Ainda pôde ser associada leucopenia [contagem de leucócitos inferior ao valor de referência menos dois

desvios padrão $18,92 \pm 5,56$ (RITCHIE et al., 1994)] em 26,66% (8/30) desses animais. Um exemplo de psitacídeo do G2 com hipergamaglobulinemia e baixa concentração de pré-albumina é demonstrado em gráfico de corrida de eletroforese na figura 3.

Tabela 9. Valores médios e desvios padrão de leucócitos e proteínas totais e valores absolutos e relativos (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas araras conforme o criadouro amostrados.

Parâmetro	G1 (39/102)	G2 (40/102)	G3 (23/102)	VR
Leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$)	$15,60 \pm 1,78^a$	$12,37 \pm 1,73^b$	$13,65 \pm 2,00^{ab}$	$18,92 \pm 5,56$
PT (g/dL)	$3,18 \pm 0,16^a$	$3,12 \pm 0,14^a$	$3,10 \pm 0,17^a$	$2,50 \pm 0,70$
Pré-albumina (g/dL)	$0,45 \pm 0,03^a$	$0,37 \pm 0,03^b$	$0,40 \pm 0,03^b$	$0,30 \pm 0,10$
(%)	($15,4 \pm 4,0$)	($12,0 \pm 4,8$)	($11,9 \pm 3,9$)	
Albumina (g/dL)	$1,46 \pm 0,08^a$	$1,55 \pm 0,08^{ab}$	$1,75 \pm 0,10^b$	$1,50 \pm 0,40$
(%)	($49,0 \pm 7,7$)	($47,7 \pm 8,4$)	($57,2 \pm 7,1$)	
α_1 -Globulina (g/dL)	$0,13 \pm 0,01^a$	$0,12 \pm 0,01^a$	$0,12 \pm 0,02^a$	$0,30 \pm 0,10^*$
(%)	($4,0 \pm 1,5$)	($3,4 \pm 1,7$)	($3,7 \pm 1,5$)	
α_2 -Globulina (g/dL)	$0,15 \pm 0,01^a$	$0,15 \pm 0,01^a$	$0,14 \pm 0,02^a$	
(%)	($5,0 \pm 1,8$)	($4,6 \pm 2,2$)	($4,0 \pm 1,7$)	
β -Globulina (g/dL)	$0,21 \pm 0,03^a$	$0,30 \pm 0,03^b$	$0,23 \pm 0,03^a$	$0,30 \pm 0,20$
(%)	($6,4 \pm 2,0$)	($8,9 \pm 4,0$)	($6,8 \pm 2,3$)	
γ -Globulina (g/dL)	$0,70 \pm 0,07^a$	$0,80 \pm 0,07^b$	$0,53 \pm 0,08^a$	$0,30 \pm 0,10$
(%)	($20,2 \pm 5,4$)	($23,4 \pm 6,1$)	($16,5 \pm 6,7$)	

(G1): Criadouro de Aves Apoená; (G2): Fundação Jardim Zoológico de Brasília; (G3): Criadouro Zoobotânica Abreu e Lima; Valores médios seguidos por letras diferentes entre as colunas são significativos ao nível de 5% pelo teste de Bonferroni. VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (RITCHIE et al., 1994), * os autores não fragmentaram a α -Globulina em duas frações.

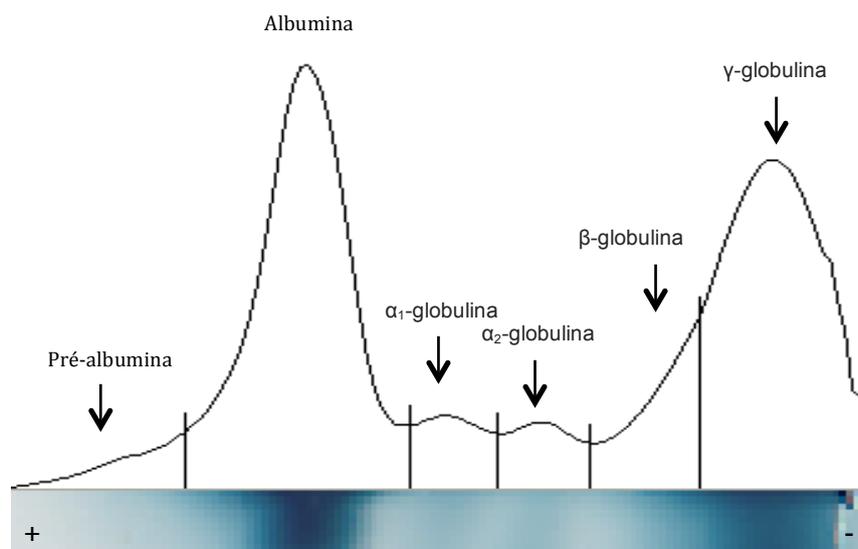


Figura 3. Gráfico de corrida eletroforética de psitacédeo alocado em G2 com hipergamaglobulinemia. Observar o perfil eletroforético, do ânodo para o cátodo: pré-albumina (0,14 g/dL), albumina (1,50 g/dL), α_1 -globulina (0,19 g/dL), α_2 -globulina (0,18 g/dL), β -globulina (0,35 g/dL) e γ -globulina (1,38 g/dL).

A representação gráfica dos valores de proteínas totais (g/dL) nas diferentes espécies de araras é demonstrada na figura 4.

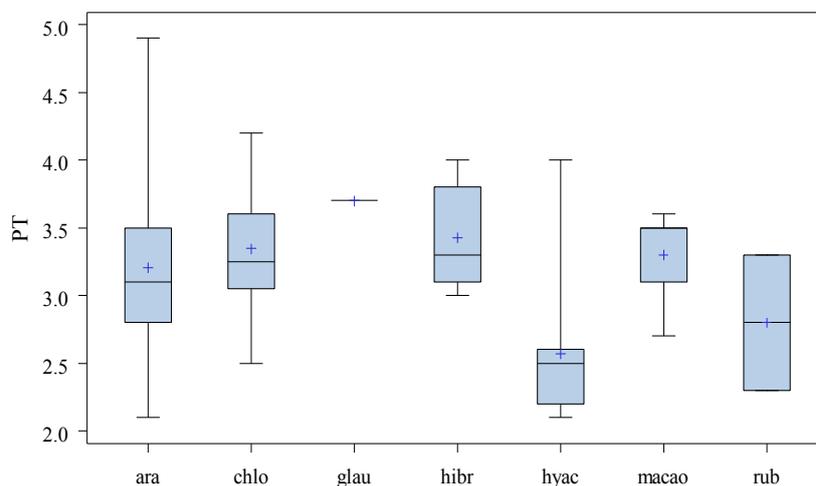


Figura 4. Representação gráfica das médias, medianas, valores mínimos e máximos de proteínas totais (g/dL) nas diferentes espécies de araras. (ara): *A. ararauna* (n = 49); (chlo): *A. chloroptera* (n = 24); (glau): *A. glaucogularis* (n = 1); (hibr): híbridas (n = 7); (hyac): *A. hyacintinus* (n = 10); (macao): *A. macao* (n = 9); (rub): *A. rubrogenis* (n = 2).

Os valores médios e desvios padrão das frações proteicas (g/dL) nas espécies de araras podem ser vistas na tabela 10.

Tabela 10. Valores médios e desvios padrão das proteínas totais (g/dL) e valores absolutos (g/dL) e relativos (%) (médias e desvios padrão) de frações proteicas nas espécies de araras negativas para Hemosporídeos. Valores relativos apresentados entre parênteses, abaixo dos valores absolutos.

Espécies	Proteína total	Pré-albumina	Albumina	α₁- Globulina	α₂- Globulina	β - Globulina	γ - Globulina
<i>A. ararauna</i> (n = 43)	3,23 ± 0,61	0,40 ± 0,12 (13,1 ± 4,3)	1,69 ± 0,40 (51,6 ± 8,6)	0,10 ± 0,06 (3,5 ± 1,7)	0,14 ± 0,07 (4,7 ± 2,0)	0,23 ± 0,10 (6,7 ± 2,6)	0,67 ± 0,27 (20,4 ± 5,8)
<i>A. chloroptera</i> (n = 20)	3,28 ± 0,36	0,45 ± 0,15 (13,3 ± 4,5)	1,58 ± 0,28 (47,9 ± 7,7)	0,12 ± 0,04 (3,7 ± 1,2)	0,14 ± 0,06 (4,3 ± 1,7)	0,25 ± 0,11 (7,8 ± 2,7)	0,75 ± 0,22 (23,0 ± 6,0)
<i>A. glaucogularis</i> (n = 1)	3,70	0,54 (14,7)	1,45 (39,3)	0,16 (4,4)	0,12 (3,3)	0,36 (9,8)	1,05 (28,5)
<i>A. hyacintinus</i> (n = 8)	2,61 ± 0,59	0,42 ± 0,12 (17,6 ± 5,7)	1,33 ± 0,52 (49,2 ± 5,9)	0,09 ± 0,05 (3,7 ± 1,9)	0,14 ± 0,03 (5,4 ± 1,7)	0,16 ± 0,03 (6,9 ± 2,2)	0,47 ± 0,21 (17,3 ± 3,2)
<i>A. macao</i> (n = 6)	3,32 ± 0,27	0,32 ± 0,18 (9,8 ± 4,8)	1,59 ± 0,38 (44,8 ± 12,2)	0,16 ± 0,06 (4,3 ± 1,9)	0,18 ± 0,09 (5,6 ± 3,2)	0,34 ± 0,16 (10,2 ± 4,2)	0,73 ± 0,22 (25,3 ± 9,8)
<i>A. rubrogenis</i> (n = 2)	2,80 ± 0,71	0,30 ± 0,10 (10,6 ± 0,9)	1,38 ± 0,49 (48,6 ± 5,6)	0,15 ± 0,11 (4,9 ± 2,4)	0,13 ± 0,01 (4,8 ± 1,6)	0,40 ± 0,14 (15,6 ± 9,0)	0,44 ± 0,16 (15,7 ± 1,6)
Híbridas (n = 7)	3,34 ± 0,38	0,47 ± 0,07 (13,8 ± 2,7)	1,97 ± 0,28 (57,6 ± 5,9)	0,15 ± 0,05 (4,3 ± 1,2)	0,14 ± 0,08 (4,1 ± 1,6)	0,18 ± 0,09 (5,2 ± 2,3)	0,51 ± 0,18 (14,9 ± 5,1)

DISCUSSÃO

No presente estudo, o padrão de fracionamento proteico por eletroforese em gel de agarose foi semelhante àqueles previamente descritos em literatura (CRAY; TATUM, 1998; TATUM et al., 2000; FUDGE; SPEER, 2001; CRAY et al., 2007). Corroborando os dados já consumados em publicações pregressas com frangos (TOHJO et al., 1996; XIE et al., 2002) e outras espécies aviárias (IVEY, 2000; TATUM et al., 2000; LANZAROT et al., 2001; BRISCOE, 2010), foi possível observar 6 frações proteicas nas amostras de soro de araras, incluindo-se pré-albumina, albumina, α_1 , α_2 , β e γ globulinas. Os valores da soma dessas frações neste estudo comportaram-se de acordo com os encontrados em psitacídeos por Ritchie e colaboradores (1994).

De acordo com Naoum (1999), a zona pré-albumina foi evidenciada como uma banda fraca e espalhada, com velocidade migratória superior à albumina (Figura 2). A migração rápida em direção ao anodo observada no presente estudo é a responsável pela sua identificação em psitacídeos (CRAY et al., 2007) e explica sua rara exibição em mamíferos (RIOND et al., 2009), pois nesses últimos a velocidade de migração da pré-albumina é similar à da albumina, culminando em sobreposição das duas bandas, levando à não identificação da primeira (RITCHIE et al., 1994). Sua concentração pode variar marcadamente entre as diferentes espécies de psitacídeos, chegando a ser superior à de albumina em cacatuas (CRAY; TATUM, 1998). Os valores obtidos no presente estudo para tal proteína contribuem com uma pequena parcela do total de albumina e assemelham-se àqueles descritos na literatura para araras (RITCHIE et al., 1994).

A segunda e maior banda observada na eletroforese correspondeu à fração albumina, tal como observado em outras espécies de psitacídeos, (CRAY; TATUM, 1998; TATUM et al., 2000; CRAY et al., 2007). A albumina é a proteína de maior concentração no soro de aves saudáveis (CRAY et al., 2007) e sua aferição pela eletroforese é mais precisa do que por outras técnicas (LUMEIJ et al., 1990; LUMEIJ, 1987; MÜLLER; BRUNNBERG, 2010). Os valores aqui obtidos encontram-se em consonância com aqueles averiguados em estudo antecedente (PROENÇA, 2010).

Concordando com Cray et al., (2007), a fração α -globulina pôde ser fragmentada em duas partes distintas α_1 e α_2 globulinas, embora tal distinção nem sempre fosse claramente demarcada (2 animais, dado não apresentado), dificuldade também relatada por outros autores (CRAY; TATUM, 1998). Em oposição às elevadas concentrações de α_1 e α_2 globulinas verificadas em mamíferos (ECKERSALL, 2008), foram observadas percentagens baixas dessas proteínas na pesquisa corrente. Ainda assim, os valores alcançados encontram-se em conformidade com aqueles verificados por Eckersall (2008) em aves, caso os dois segmentos sejam somados ($\alpha_1 + \alpha_2 = \alpha$ -globulina). A constatação de médias (g/dL) em araras positivas para Hemosporidioses de $0,12 \pm 0,01$ (*versus* $0,13 \pm 0,01$ nos negativos) e $0,14 \pm 0,01$ (*versus* $0,16 \pm 0,01$ nos negativos) de α_1 e α_2 globulinas, respectivamente, exclui a perspectiva de resposta inflamatória aguda, pois, de acordo com Briscoe e colaboradores (2010), na presença de enfermidades agudas é possível obter médias superiores à $0,8$ g/dL de α_1 ou α_2 globulinas.

Conforme Naoum (1999), a zona β -globulina representa uma combinação de proteínas responsáveis pelas etapas finais de processos agudos ou crônicos. Segundo Murata et al. (2004), tais componentes contribuem com a remoção de debris inflamatórios e promovem a cicatrização. As médias verificadas neste experimento revelaram valores em consenso daqueles publicados para *Ara* spp. híbridas (RITCHIE et al., 1994; ECKERSALL, 2008).

A última banda visualizada representa os produtos da degradação do complemento e as imunoglobulinas (NAOUM, 1999). Esta fração é composta pelas cinco maiores classes de imunoglobulinas que são IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Apenas a IgG apresenta migração por toda a banda, de forma que alterações na fração γ -globulina refletem o que ocorre com esta imunoglobulina (SILVA et al., 2008). Por essa razão, um aumento zona γ -globulina, tal como verificado neste estudo, conjectura ativação da resposta imune (CRAY et al., 2005) ou pressupõe a existência de enfermidades crônicas (FUDGE; SPEER, 2001). Os valores aqui observados são superiores àqueles publicados previamente por Ritchie e colaboradores (1994), provavelmente pelo fato de que tais autores utilizaram araras jovens. Sabidamente, indivíduos mais novos possuem concentrações inferiores de imunoglobulinas, refletindo em menores frações de γ -globulinas, pois a carga de estímulos imunológicos aumenta conforme a exposição (ECKERSALL, 2008).

Assim, as araras amostradas no presente trabalho, por serem mais velhas, possuíram maiores concentrações séricas de anticorpos de memória denotando sua apresentação pregressa a uma quantidade superior e mais variada de antígenos. Tal fato reitera a afirmativa de que os valores de referência publicados devem ser usados apenas como uma orientação aproximada e que uma análise das informações consultadas deve ser previamente realizada (LUMEIJ, 2008).

Levando-se em consideração que a RFA e a subsequente mudança do perfil das PFA pode ocorrer secundariamente a diversos estímulos (CRAY et al., 2009) e somando-se isso ao fato de que classicamente as infecções por protozoários prestam-se como modelos de indução ao processo inflamatório (SHERMAN; HULL, 1960; FARMER; BREITENBACH, 1968; WILLIAMS, 2005; MATIJATKO et al., 2007), intencionou-se, por meio deste estudo, verificar as alterações no proteinograma de aves positivas para Hemosporídeos. Contudo, contrariamente ao que a literatura afirma a respeito do fato de tal hemoparasitose ser considerada uma enfermidade capaz de provocar reações inflamatórias (RIBEIRO et al., 2000; YAZDANI et al., 2006), não foram evidenciadas alterações significativas em leucócitos totais bem como nas PFA entre os indivíduos positivos e negativos para tal enfermidade (Tabela 7).

Possivelmente as hemoparasitoses provocadas pelos Hemosporídeos não se prestam como modelo de RFA, pois em muitos casos não representam grande patogenicidade. Diversos autores (GODOY, 2006; ALMOSNY; MONTEIRO, 2006; BELO, 2007) afirmam que a gravidade do quadro está amplamente relacionada à interação parasita-hospedeiro e que, de modo geral, as aves estão bem adaptadas aos Hemosporídeos, não sofrendo transtornos em decorrência da infecção. Quando essa interação é desequilibrada, os animais acometidos pela doença costumam apresentar anemia, leucocitose, alterações na AST, ALT e creatinina (WILLIAMS, 2005; HARR, 2006). Segundo os achados de Ramos (2012), os valores de eritrograma, leucograma e dos demais parâmetros não diferiram significativamente entre os indivíduos positivos e negativos (Anexo I), portanto, pode-se afirmar que as aves positivas encontravam-se em equilíbrio com os parasitas, visto não demonstrarem evidência significativas de enfermidade aos exames clínico e laboratorial. Tal premissa leva a crer que o quadro não representava gravidade àqueles indivíduos e que em consonância à afirmação de Gabay e Kusher (2001), a

ausência de alterações nas PFA simplesmente reflete a baixa extensão e severidade do processo inflamatório.

Apesar das afirmações supracitadas serem plausíveis ao explicarem a inobservância de alterações compatíveis com processo inflamatório, talvez as conclusões apresentadas pelo estudo de Williams (2005) sejam as mais críveis para tal acontecimento, ao demonstrarem que galinhas domésticas não apresentaram mudanças nas PFA após a fase aguda. Embora não se trate da mesma espécie, é possível supor que as araras do presente trabalho se encontrassem na fase crônica da doença. De acordo com Valkiūnas (2005) e Cox (2010), a cronicidade é caracterizada pela baixa contagem de parasitas no esfregaço sanguíneo, ausência dos achados hematológicos de anemia e leucocitose e inexistência de sinais clínicos de enfermidade, o que legitima a suposição sobre o estágio da enfermidade, tendo em vista que os indivíduos aqui estudados não exibiram alterações laboratoriais (Anexo I) ou clínicas e apresentavam baixa parasitemia (Anexo II), verificada em trabalho precedente (RAMOS, 2012).

Segundo a literatura, dentre os fatores determinantes de variabilidade fisiológica nos constituintes sanguíneos das aves destacam-se aqueles relacionados às espécies, sexo, idade, manejo reprodutivo e nutricional (CARDOSO; TESSARI, 2003). O número reduzido de algumas espécies do gênero *Ara* spp. aqui analisados, assim como a disparidade entre eles não permitiu que comparações e conclusões suficientes à respeito desta variável fossem possíveis. Utilizando-se como exemplo as variações observadas nas proteínas totais, a análise visual do *boxplot* (Figura 4) permite inferir que as espécies de *A. ararauna* e *A. chloroptera* sofreram as maiores dispersões, o que pode levar à conclusão errônea de que são amostras mais heterogêneas do que as demais, quando na verdade correspondem a um maior número de indivíduos amostrados. A mesma premissa pode ser utilizada ao explicar a homogeneidade observada nos únicos dois indivíduos de *A. rubrogenis*, portanto, as informações explanadas no presente trabalho referentes à cada espécie de maneira individual devem ser extrapoladas de maneira diligente e criteriosa.

De acordo com as pesquisas, é bastante evidente a discrepância entre os resultados obtidos a respeito das proteínas séricas ao se comparar espécies dessemelhantes. Segundo Leishchinsky e Klasing (2001), a disparidade genética é a promotora dessas diferenças, pois determina maior ou menor expressão de citocinas, pró ou anti-inflamatórias. Sendo assim, quanto maior o distanciamento

genético entre as espécies avaliadas, maior a probabilidade deste fator determinar variabilidade sobre o proteinograma. Em mamíferos e herbívoros, por exemplo, somente cinco frações podem ser identificadas na eletroforese de proteínas (ECKERSALL, 2008; RIOND et al., 2009; ALBERGHINA et al., 2011), enquanto que as aves possuem uma fração adicional, a pré-albumina. Diferenças evidentes também são percebidas mesmo entre famílias aviárias da mesma ordem (ARCHER; BATTISON, 2007), porém, ao considerar dados sobre membros incluídos na mesma família Psittacidae, tais como as aves estudadas nesta pesquisa, a variável “espécie” não parece exercer influência sobre as PFA (POLO et al., 1998; VALLE et al., 2008; GOMES et al., 2011).

Corroborando os achados em outros estudos (VALLE et al., 2008; GOMES et al., 2011), diante da análise comparativa dos resultados e das diferenças evidenciadas em alguns componentes do proteinograma, a variável “local” parece ser o fator determinante dessa variabilidade. Todavia, diferentemente da proposta idealizada pelos autores supracitados, o estudo atual propõe que as condições de saúde das aves, e não o ambiente propriamente dito, incluindo-se o clima, manejo nutricional e tipo de alocação, devam ser implicados em tais disparidades. A possível presença de uma enfermidade crônica nos indivíduos provenientes da Fundação Jardim Zoológico de Brasília (G2) parece ser a explicação mais crível para as variações observadas no proteinograma. A apreciação integral das frações proteicas permite pressupor que há uma tendência à elevação das PFA positivas, ao passo que há declínio das PFA negativas, nas amostras oriundas do G2 (Tabela 9). As frações β e γ globulinas encontram-se significativamente mais altas nesse grupo do que nos demais. Segundo Fudge e Speer (2001), padrões dessa natureza são comuns em animais com doenças crônicas e podem representar estímulos imunológicos que culminem na síntese de imunoglobulinas, que são os principais componentes das γ -globulinas ou mesmo em uma ou mais das proteínas dispostas na fração β -globulina (Fb, transferrina, β -lipoproteína, complemento). Outros pesquisadores ressaltaram condições semelhantes ao estudarem aves acometidas por doenças crônicas. Cray e Tatum (1998) observaram hiperbetaglobulinemia em pássaros com clamidiose; tendência idêntica foi notada em psitacídeos com aspergilose (IVEY, 2000; CRAY et al., 2009); Hoefler e colaboradores (1996) perceberam não somente o aumento da fração β como também da γ -globulina,

assim como pôde ser visto na infecção parasitária crônica da sarcocistose em diversos indivíduos da ordem Psittaciforme (CRAY et al., 2005). Adicionalmente a essas evidências, há tendências inferiores de pré-albumina e albumina no grupo em questão (Tabela 9).

Classicamente, a contagem de leucócitos tem sido empregada para avaliar estados inflamatórios e/ou infecciosos (PORTH, 2003). Essas células de defesa ao serem recrutadas secundariamente a algum desses estados, são sintetizadas e liberadas pela medula óssea. À medida que a enfermidade progride, a leucocitose pode convergir em leucopenia, caso a demanda supere a capacidade da medula óssea em produzir tais células brancas (LATIMER; BIENZLE, 2010). Além do consumo excessivo, a leucopenia pode refletir um decréscimo na produção por parte da medula óssea (MITCHELL; JOHNS, 2008), tendo as causas virais como a associação mais frequente com essa hiporresponsividade medular em psitacídeos (SCHOEMAKER et al., 2000). Apoiado nesse argumento e comprovando a suposição de Ramos (2012), considerando-se que há uma inclinação à leucopenia no grupo de araras da Fundação Jardim Zoológico de Brasília (G2) [valores médios de leucócitos ($\times 10^3 \times \mu\text{L}^{-1}$) $12,37 \pm 1,73$ (valor de referência em araras: $18,92 \pm 5,56$, RITCHIE et al., 1994)] e uma leucopenia evidente em 26,66% dos indivíduos que apresentaram hipergamaglobulinemia, há uma forte tendência a concluir que as araras desse grupo possam apresentar alguma enfermidade crônica. É razoável sugerir a possibilidade de alguma doença contagiosa, considerando o acometimento coletivo, porém, o conjunto de dados incita a deduzir que tal doença crônica não seja causada por Hemosporídeos, visto que outro grupo (G1) teve um número maior de aves diagnosticadas com esses parasitos (G1: 7 positivos *versus* G2: 6 positivos) e que não existem outras evidências hematológicas secundárias à hemoparasitose (RAMOS, 2012).

A premissa de que a eletroforese de proteínas é uma ferramenta diagnóstica superior à contagem de leucócitos baseia-se no fato descrito anteriormente de que a leucocitose pode não ocorrer mesmo na presença de infecção ou inflamação. O estudo realizado por Hawkey e Hart (1988) corrobora os resultados observados no presente trabalho, pois ao investigarem aves acometidas por infecções bacterianas, concluíram que 21% dos pássaros tiveram concentrações elevadas de PFA positivas sem aumento do número de leucócitos. Por outro lado, Briscoe e colaboradores (2010), ao realizarem comparações semelhantes, observaram desfecho inverso,

entretanto, atribuíram esse fato a um possível erro humano durante a interpretação da eletroforese ou à extrapolação incorreta dos valores de referência empregados na pesquisa. Cray e Tatum (1998) estimaram que 30% das aves aparentemente saudáveis possuíam alterações nas frações proteicas não acompanhadas de mudanças nas análises hematológicas e bioquímicas de rotina. Assim, o médico veterinário pode deixar de diagnosticar enfermidades em um terço de seus pacientes caso a eletroforese de proteínas não seja aplicada em conjunto com as análises hematológicas corriqueiramente utilizadas na medicina aviária.

O julgamento de que uma possível enfermidade crônica exerça a responsabilidade sobre os resultados obtidos subsidia-se nos conhecimentos previamente reportados, porém, não há como descartar por completo que a origem das alterações observadas não seja proveniente de outras causas que não inflamatórias. Para tal ponderação seria necessário um conhecimento mais aprofundado a respeito da alimentação, manejo, exames diagnósticos complementares entre outros, o que foge do escopo deste estudo. Mesmo assim, é possível descartar alguns fatores comumente associados à essa variabilidade. Por exemplo, deficiências nutricionais poderiam explicar a hipoalbuminemia, mas não a elevação das β e γ globulinas (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000); e fatores desencadeante de estresse (clima, manejo, aglomeração, recinto e outros) não se encaixam em nenhuma das variações, pois o aumento do cortisol influencia quase que exclusivamente a fração γ -globulina e, ainda assim, suprimindo a síntese de imunoglobulinas e não o contrário, e também culminaria em leucocitose e não leucopenia (SONG et al., 1994; ECKERSALL, 2008).

Afora a interferência evidente do “local”, a variável “sexo” exerceu influência sobre uma das frações proteicas, a pré-albumina. Há relatos de que o gênero tenha importância sobre as PFA, no entanto, sempre com conotação sobre gestação, ovipostura ou lactação (CARDOSO; TESSARI, 2003; CERÓN et al., 2005). As fêmeas aqui estudadas não se encontravam em fase reprodutiva, mas mesmo assim seus níveis de pré-albumina foram inferiores aos dos machos. Até o momento não há precedentes de associação semelhantes descritos na literatura. Pelo contrário, estudos em araras (POLO et al., 1998; VALLE et al., 2008; GOMES et al., 2011) e em humanos (SACHS; BERNSTEIN, 1986; VERRING et al., 1990) concluíram não haver influência do sexo sobre o parâmetro em questão. A falta de informações a

respeito desse assunto dificultou conclusões precisas, contudo, é possível especular que a ingestão proteica esteja relacionada com essa distinção.

Tal como a albumina, a pré-albumina é sintetizada no fígado a partir dos aminoácidos provenientes da dieta e sua concentração sérica é ajustada conforme se aumenta ou reduz a ingestão proteica (ECKERSALL, 2008). Sabe-se que os machos apresentam maior massa corporal do que as fêmeas e que os primeiros tendem a ingerir porções maiores de alimento (RITCHE et al., 1994), o que pode justificar a diferença encontrada no presente estudo. Os achados de Verring e colaboradores (1990) corroboram a possibilidade de tal hipótese ao demonstrarem correlação positiva entre ingestão proteica e concentrações de pré-albumina e ainda oferecem uma explicação para a falta de acompanhamento por parte da albumina. Segundo os autores, a pré-albumina é significativamente mais responsiva à oferta proteica do que a albumina, justificando a não observância do fator “sexo” sobre a última (VERRING et al., 1990).

Embora a dieta seja argumento útil sobre as divergências em relação à pré-albumina e o “sexo” tenha interferido significativamente somente nesta fração, é notória a observação de que as fêmeas apresentaram médias superiores em relação a todos os demais parâmetros (Tabela 8), o que leva a refletir sobre o significado do gênero no arranjo das proteínas séricas e a ratificar a asserção de que mais estudos são necessários para se estabelecer o papel desta variável sobre as PFA.

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo realizado em criadouros de aves no Distrito Federal e Goiás nos permitem concluir que:

- O padrão de fracionamento proteico por eletroforese em gel de agarose foi semelhante àqueles descritos em literatura em araras, sendo possível identificar seis bandas, que incluem pré-albumina, albumina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas;

- A maioria das diferenças estatísticas encontradas está relacionada ao local em que as amostras foram colhidas. Essas observações nos permitem inferir que devem ser evitadas extrapolações de valores de referência para araras alojadas em criatórios distintos.

- A presença de enfermidade subclínica, e não o manejo ou a dieta, parece ser a principal responsável pela discrepâncias entre leucócitos e frações proteicas observadas entre os criatórios.

- Aumentos nos níveis de β e γ globulinas, associados a decréscimos em pré-albumina e albumina devem estar relacionados à doença crônica.

- São necessários mais estudos para avaliar a influência do sexo sobre a pré-albumina.

- As infecções crônicas por hemoparasitoses causadas por Hemosporídeos aviários não se prestam como modelo para avaliar a resposta de fase aguda e suas proteínas relacionadas.

- A eletroforese de proteínas é uma ferramenta diagnóstica bastante sensível, mas não específica.

- A análise das frações proteicas é mais sensível do que a contagem de leucócitos na triagem de doenças inflamatórias e/ou infecciosas.

REFERÊNCIAS

ALBERGHINA, D.; GIANNETTO, C.; VAZZANA, I.; FERRANTELLI, V.; PICCIONE, G. Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 23, p. 111-114, 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.

ARCHER, F. J.; BATTISON, A. L. Differences in electrophoresis patterns between plasma albumins of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and the chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Avian Pathology**, v. 26, n. 4, p. 856-870, 2007.

BELO, N. O. **Ocorrência de Plasmodium spp. em aves silvestres da família Psittacidae mantidas em cativeiro no Brasil**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

BRISCOE, J. A.; ROSENTHAL, K. L.; SHOFER, F. S. Selected complete blood cell count and plasma protein electrophoresis parameters in pet psittacine birds evaluated for illness. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2010.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frango de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 419-424, 2003.

CERÓN, J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 5, 2010. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/5>.

CRAY, C.; TATUM, L. M. Applications of protein electrophoresis in avian diagnostic. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 12, n.1, p. 4-10, 1998.

CRAY, C.; ZIELEZIENSKI-ROBERTS, K.; BONDA, M.; STEVENSON, R.; NESS, R.; CLUBB, S.; MARSH, A. Serologic diagnosis of sarcocystosis in psittacine birds: 16 cases. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 19, n. 3, p. 208-215, 2005.

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

CRAY, C.; RODRIGUEZ, M.; ARHEART, K. L. Use of refractometry for determination of psittacine plasma protein concentration. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 4, p. 438-442, 2008.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.

CRAY, C.; REAVILL, D.; ROMAGNANO, A.; SANT, F. V.; CHAMPAGNE, D.; STEVENSON, R.; ROLFE, V.; GRIFFIN, C.; CLUBB, S. Galactomannan Assay and Plasma Protein Electrophoresis Findings in Psittacine Birds With Aspergillosis. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 2, p.125-135, 2009.

EBERSOLE, J.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontology**, v. 23, p. 19-49, 2000.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117-156.

FARMER, J. N.; BREITENBACH, R. P. Plasmodium lophurae infections and related serum protein changes in 2-week-old normal and hormonally bursectomized chickens. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 137-149, 1968.

FUDGE, A. M.; SPEER, B. Selected controversial topics in avian diagnostic testing. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 2, p. 96-101, 2001.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001. Disponível em: <http://www.immuneweb.xxmu.edu.cn/reading/innate/1.pdf>.

GODOY, S. N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 222-251.

GOMES, D. M.; SILVA, M. N.; SILVA, R. M. M.; DÓREA, R. D.; BASTOS, B. L.; AYRES, M. C. C. Hemograma e bioquímica clínica sanguínea de araras (*Ara sp.*) mantidas em sítios ecológicos no estado da Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 699-711, 2011.

HARR, K.E. Diagnostic Value of Biochemistry. In: HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, T.L. **Clinical Avian Medicine**. Spix Publishing, Inc., Florida. cap. 23, 2006. p. 611-630.

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

HOEFER, H. L.; KIEHN, T. E.; FRIEDAN, T. R. Systemic *Mycobacterium tuberculosis* in a green winged macaw. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS. Proceedings...Tampa, Flórida, 1996, p. 167-168.

HORROCKS, N. P. C.; TIELEMAN, I.; MATSON, K. D. A simple assay for measurement of ovotransferrin – a marker of inflammation and infection in birds. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 5, p. 518-526, 2011.

HYSLOP, N. S. G. Application of an improved system of electrophoresis in acrylamide gel to studies on the sera of diferente species. **Journal Clinical Pathology**, v. 25, p. 508-511, 1972.

INSTITUTO ARARA AZUL. **Projeto Arara Azul, Araras Brasileiras**, 2009. Disponível em: <http://www.projetoararaazul.org.br/arara/Home/AAraraAzul/Ararasbrasileiras/tabid/310/Default.aspx>.

IUCN, INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **Red List of Threatened Species**, 2011. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>.

IVEY, E. S. Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian **Medicine and Surgery***, v. 14, n. 2, p. 103-106, 2000.

LANZAROT, M. P.; MONTESINOS, A.; SAN ANDRÉS, M. I.; RODRÍGUEZ, C.; BARAHONA, M. V. Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. **Journal of Wildlife Disease**, v. 37, n. 1, p. 172-177, 2001.

LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. Determination and Interpretation of the Avian Leukogram. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. j. **Veterinary Hematology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 345-358.

LESHCHINSKY, T. V.; KLASING, K. C. Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 629-638, 2001.

LUMEIJ, J. T. Avian Clinical Biochemistry In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 839-864.

LUMEIJ, J. T. The diagnostic value of plasma proteins and non-protein nitrogen substances in birds. **Veterinary Quarterly**, v. 9, n. 3, p. 262-268, 1987.

LUMEIJ, J. T.; de BRUIJNE, J. J.; KWANT, M. M. Comparasion of diferente methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. **Avian Pathology**, v. 19, p. 255-261, 1990.

MATIJATKO, V.; MRLJAK, V.; KIS, I.; KUCER, N.; FORSEK, J.; TANJA ZIVICNJAK, T.; ROMIC, Z.; SIMEC, Z.; CERON, J. J. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 242-250, 2007.

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

MÜLLER, K.; BRUNNBERG, L. Determination of plasma albumina concentration in healthy and disease turtles: a comparasion of protein electrophoresis and the bromcresol green dye-binding method. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 79-82, 2010.

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

NAOUM, P. C. **Eletroforese - técnicas e diagnóstico**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1999, 154 p.

POLO, F. J.; PEINADO, V. I.; VISCOR, G.; PALOMEQUE, J. Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. **Avian Disease**, v. 42, n. 3, p. 523-535, 1998.

PORTH, C. M. **Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 915 p.

PROENÇA, L. M. **Proteinograma sérico e parâmetros hematológicos de papagaios-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e araras-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro**. Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. 51 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

RAMOS, R. R. **Estudo da ocorrência de *Plasmodium* spp. em araras mantidas em cativeiro e suas prováveis alterações laboratoriais**. Brasília: UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012. 85 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal).

RENTAS. **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Animais Silvestres**, 2001. Disponível em: http://www.rentas.org.br/pt/trafico/rel_rentas.asp.

RIBEIRO, C. T.; FERREIRA da CRUZ, M. F. The new and the old in malaria immunopathology. **Ciência e Cultura**, v. 52, n. 4/5, p. 269-281, 2000.

RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Florida: Wingers Publishing, 1994. 1407 p.

RIOND, B.; WENGER-RIGGENBACH, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 1, p. 73-77, 2009.

ROMAN, Y.; LEVRIER, J.; ORDONNEAU, D.; CHASTE-DUVERNOY, D.; BOMSEL-DEMONTY, M. C.; JALME, M. S. Location of the fibrinogen and albumin fractions in plasma protein electrophoresis agarose gels of five taxonomically distinct bird species. **Revue Medicine Veterinaire**, v. 160, n. 3, p. 160-165, 2009.

SACHS, E.; BERNSTEIN, L. H. Protein markers of nutrition status as related sex and age. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 339-341, 1986.

SCHOEMAKER, N. J.; DORRESTEIN, G. M.; LATIMER, K. S.; LUMEIJ, J. T.; KIK; M. J. L.; VAN DER HAGE, M. H.; CAMPAGNOLI, R. P. Severe leukopenia and liver

necrosis in young African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. **Avian Disease**, v. 44, n. 2, p. 470-478, 2000.

SHERMAN, I. W.; HULL, R. W. Serum alterations in avian malária. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 171-176, 1960.

SICK, H. Ordem Psittaciformes. In: SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 351-382.

SILVA, R. O. de P.; LOPES, A. de F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

SONG, C.; DINAN, T.; LEONARD, B. E. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. **Journal of Affective Disorders**, v. 30, p. 283-288, 1994.

SPAGNOLO, V.; CRIPPA, V.; MARZIA, A.; ALBERTI, I.; SARTORELLI, P. Hematologic, biochemical, and protein electrophoretic values in captive tawny owls (*Strix aluco*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 2, p. 225-228, 2008.

STORM, J. Husbandry. In: BEYNON, P. H.; CHITTY, J. **Bsava Manual of Psittacine Birds**. Cheltenham: BSAVA, 1996. p. 11-16.

TATUM, L. M.; ZAIAS, J.; MEALEY, B. K.; CRAY, C; BOSSART, G. D. Protein electrophoresis is a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 4, p. 497-502, 2000.

TOHJO, H.; YADATSU, M.; UCHIDA, E.; NIIYAMA, M.; SYUTO, B.; MORITSU, Y.; ICHIKAWA, S.; TAKEUCHI, M. Polyacrylamide gel electrophoretic serum protein patterns of acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine in young broiler chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 267-268, 1996.

WILLIAMS, R. B. Avian malária: clinical and chemical pathology of Plasmodium gallinaceum in the domesticated fowls *Gallus gallus*. **Avian Pathology**, v. 34, n. 1, p. 29-47, 2005.

VALKIÜNAS, G. **Avian Malaria Parasite and other Haemosporidia**. Florida: CRC press, 2005, 946p.

VALLE, S. F.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, R. A.; BARCELLOS, L. J. G.; HLAVAC, N. R. C.; FRANÇA, R. T.; LOCATELLI, M. L. **Parâmetros hematológicos de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Araras canindé (*Ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro comercial**. *Ciência Rural*, v. 38, n. 3, p. 711-716, 2008.

VEERING, B. T.; BURM, A. G. L.; SOUVERIJN, J.H. M.; SERREE, J.M. P.; SPIERDIJK, J. The effect of age on serum concentrations of albumin and a-glycoprotein. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 201-206, 1990.

YAZDANI, S. S.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S.; CHITNIS, C. E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 187-203, 2006.

XIE, H.; RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. **Poultry Science**, v. 81, p. 112-120, 2002.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acredita-se que este estudo contribuiu com a pesquisa relacionada a psitacídeos, mais precisamente às araras, ao compartilhar informações nacionais referentes às proteínas totais e suas frações, bem como às mudanças sofridas por essas em estados de saúde e enfermidade. Ao suprir a falta de dados referentes a essas espécies em nosso país, torna-se mais provável minimizar as interferências regionais que diferem da realidade do Brasil e, com isso, diminuir as falhas na extrapolação de dados estrangeiros.

Em vista dos resultados obtidos nesta pesquisa, é válido propor que a eletroforese de proteínas seja uma ferramenta diagnóstica apropriada para avaliar e gerir problemas de saúde aviários. Ao contrário de teses individuais, a ferramenta diagnóstica representa um pensamento mais abrangente do processo, e sua adequada seleção e interpretação permite uma eleição mais sensata de exames específicos, o que é fortemente recomendado. As alterações proteicas demonstradas reforçam a importância dessa ferramenta e confirmam o valor de sua utilização a fim de evitar falsas conclusões a respeito do estado de saúde dos animais, especialmente as aves, visto que estas nem sempre exibem sinais clínicos.

A eletroforese de proteínas deve ser preferida à contagem de leucócitos, especialmente em doenças crônicas ou naquelas em que sabidamente há hiporresponsividade da medula óssea. Um diagnóstico confiável é a base para conclusões prognósticas, medidas profiláticas e correta monitorização de animais

portadores. Dessa forma, a triagem realizada por meio da técnica de eletroforese permite que os indivíduos portadores de alguma enfermidade sejam identificados de forma mais acurada, restringindo os riscos para eles mesmos e para o bando.

A pesquisa em aves tem muitos limitadores que culminam em várias considerações e conclusões insuficientes. Por essas razões, mais estudos são necessários para que se adquira o conhecimento pleno a respeito da resposta de fase aguda e das proteínas relacionadas. Fazem-se necessárias mais pesquisas que ponderem a influência de variáveis como espécie, sexo e ambiente sobre as proteínas de fase aguda, assim como é imprescindível que se caracterize, de forma controlada, as infecções agudas das crônicas para que se determine de forma precisa as proteínas envolvidas nos distintos processos. Quando estas presumíveis investigações progredirem, provavelmente será possível identificar qual ou quais dessa(s) proteína(s) é(são) o(s) melhor(es) marcadore(s) da resposta de fase aguda em aves e psitacídeos, iniciando-se, assim, uma nova etapa na investigação do processo imune nessas espécies.

ANEXO I

Resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos nas araras positivas e negativas para a infecção por hemoparasitos de todos os criadouros amostrados.

Tabela i. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos nas araras positivas e negativas para a infecção por hemoparasitos de todos os criadouros amostrados.

	Parâmetro	Positivos (15/102)	Negativos (87/102)	VR
Hemograma	VG (%)	40,75±3,38 ^a	41,19 ±4,14 ^a	40 ±7,7
	Hemácias (x10 ⁶ x µL ⁻¹)	2,66 ±0,47 ^a	2,64 ±0,53 ^a	2,7 ±0,7
	Hemoglobina (g/dL)	13,58±1,57 ^a	14,19 ±1,69 ^a	11,00±2,9
	Trombócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	38,18±9,45 ^a	37,17±15,9 ^a	NI
	PPT (g/dL)	4,23±0,60 ^a	4,32 ±0,62 ^a	2,86±0,8
	Leucócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	11,55±5,72 ^a	13,17± 6,81 ^a	18,92±5,56
	Heterófilos (x10 ³ x µL ⁻¹)	10,18±4,06 ^a	7,72±4,45 ^a	10,00±3,80
	Linfócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	4,25 ±4,76 ^a	4,98±3,87 ^a	8,00±3,10
	Eosinófilos (x10 ³ x µL ⁻¹)	0,11±0,30 ^a	0,092±0,23 ^a	0
	Monócitos (x10 ³ x µL ⁻¹)	0,49±0,66 ^a	0,29± 0,45 ^a	0,756±0,44
	Basófilos (x10 ³ x µL ⁻¹)	0,10 ±0,13 ^a	0,17 ±0,22 ^a	0,15±0,22
Bioquímicos	PT (g/dL)	3,15±0,61 ^a	3,23±0,58 ^a	2,5±0,7
	Albumina (g/dL)	0,92±0,21 ^a	0,99±0,24 ^a	1,2±0,3
	Globulina (g/dL)	2,23 ±0,54 ^a	2,24±0,50 ^a	1,3 ±0,6
	Razão A/G	0,43 ±0,14 ^a	0,46±0,17 ^a	0,8±0,2
	Creatinina (mg/dL)	0,25±0,08 ^a	0,27±0,10 ^a	0,4±0,07
	ALT (UI/L)	50,3±42,10 ^a	56,49±45,09 ^a	4±3
	AST (UI/L)	173,06±111,99 ^a	171,84±102,24 ^a	101±24
	FA (UI/L)	128,94±91,45 ^a	123,28±78,54 ^a	1200±390
	Ácido úrico (mg/dL)	4,70 ±3,14 ^a	3,97 ±2,38 ^a	1,9±2,5
	CK (UI/L)	338,19±156,97 ^a	351,77±432,06 ^a	540 267
	Cálcio (mg/dL)	9,16±1,87 ^a	8,60 ±1,47 ^a	10±0,47

Volume globular (VG); PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT); Albumina/Globulina (A/G); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Fosfatase alcalina (FA); Creatinina-quinase (CK); NI: Não informado; Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si; VR: Valor de referência para *Ara ararauna* (RITCHIE et al., 1994).

ANEXO II

Resultado dos métodos diagnósticos de araras positivas para Hemosporídeos por método de microscopia óptica (M.O.) e RCP.

Tabela ii. Percentual de araras positivas para Hemosporídeos por método de diagnóstico de microscopia óptica (M.O.) e PCR.

Método	Positivas (15/102)
M.O.	4,16%
RCP "Haem"	13,54%
RCP "rPLU"	7,29%

"Haem": PCR para *Plasmodium* spp/*Haemoproteus* spp.; "rPLU": RCP para *Plasmodium* spp.