

CAMPOS, S.D.E.¹; SÓCCIO, J.M.D.^{1*}; OLIVEIRA, R.R.G.C.¹; VELHO, P. B.²; MAIA, A.L.P.S.³; PEREIRA, A.M.⁴; ALMOSNY, N.R.P.⁵

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DE 9 PINGÜINS-DE-MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*, FOSTER 1781) MANTIDOS EM CATIVEIRO.

INTRODUÇÃO: Os Pingüins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*, Foster 1781) são aves marinhas habitantes de regiões frias do hemisfério sul (Stoskopf, 1986; Williams, 1995; Ruppolo & Santos, 1998; Cranfield, 2003; Ruppolo et al., 2004; Rigo et al., 2007). Após o período reprodutivo, que ocorre entre os meses de setembro e março, exemplares adultos e jovens deixam as colônias e iniciam uma migração acompanhando as correntes marítimas e o deslocamento dos cardumes de anchoita (*Engraulis anchoita*) que compõem até 72% de sua dieta (Williams, 1995; Silva Filho, 2006). Por procurarem alimentos a grandes distâncias das áreas de reprodução, alguns animais, em especial os jovens podem se perder do grupo na corrente das Malvinas chegando às costas Sul e Sudeste do Brasil, de onde são resgatados e levados para os Jardins Zoológicos ou Centros de Recuperação e, apesar de consideradas aves extremamente resistentes, é freqüente se observar alterações clínicas nestes indivíduos recém-chegados (Stoskopf, 1986; Ruppolo & Santos, 1998; Ruppolo et al., 2004; Silva Filho, 2006). Estes se apresentam fracos e cansados, em decorrência do longo percurso, dificuldade na caça e busca por alimentos, doenças e contaminação por derramamento de óleo (Ruppolo et al., 2004; Silva Filho, 2006). A ordem Sphenisciformes constitui uma das ordens de aves com maior carência em padrões hematológicos disponíveis na literatura (Coles, 1986; Hawkey et al., 1989). Atualmente a realização de exames complementares em hematologia tem se tornado um instrumento bastante útil na avaliação do curso e prognóstico de muitas enfermidades e assim como em mamíferos domésticos, fatores como a espécie, idade, sexo, estado físico e nutricional do animal e estação do ano podem determinar variações no perfil hematológico dos pingüins (Hawkey et al., 1989).

O objetivo deste trabalho foi relatar os achados hematológicos da avaliação de nove Pingüins-de-magalhães jovens, durante uma investigação sobre as possíveis causas de sua mortalidade, correlacionando com as alterações clínicas evidenciadas e com a situação de cativeiro, comparando com os resultados demonstrados na literatura existente.

MATERIAL E MÉTODOS: Para o presente estudo nove Pingüins-de-magalhães jovens (*Spheniscus magellanicus*), mantidos em cativeiro no Zoológico de Niterói, pertencentes a um plantel de aproximadamente 50 animais dentre os quais alguns

¹ Graduando de Medicina Veterinária, UFF. Faculdade de Veterinária - Centro de Ciências Médicas (CCM) / Universidade Federal Fluminense (UFF) - Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, CEP: 24.230-340, Niterói, RJ. email: s.destri@gmail.com

² Mestrando do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária- Bolsista CAPES, UFF.

³ Médico Veterinário chefe da Seção de veterinária da Fundação Jardim Zoológico de Niterói.

⁴ Doutorando do programa de pós-Graduação em Medicina Veterinária- Bolsista CAPES, UFF.

⁵ Professor associado II da disciplina de Laboratório Clínico Veterinário II- Faculdade de Veterinária, UFF.

havia apresentado alterações clínicas, foram submetidos a exame físico após contenção mecânica segundo a técnica descrita por Silva Filho et al (2006). Após estarem corretamente posicionados realizava-se a abertura do bico para inspeção de suas mucosas. Inspeccionaram-se os animais a procura de ferimentos na cavidade oral, geralmente provocados pela ingestão de peixes que em vida livre não participam de seus hábitos alimentares. A palpação da musculatura peitoral foi realizada para determinação do escore corporal. Em seguida procedeu-se a coleta de amostras sanguíneas. Foram coletados aproximadamente 3mL de sangue de cada animal, a partir de punção na veia metatársica média, sendo as amostras acondicionadas em tubos contendo anticoagulante EDTA. Foi confeccionado esfregaço sanguíneo no momento da coleta. As amostras de sangue total foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Universitário Veterinário Professor Firmino Mársico Filho, da Universidade Federal Fluminense, onde o material foi processado. Os hemogramas foram realizados a partir de contagem manual de hemácias, trombócitos e leucócitos em hemocítmetro (Câmara de Neubauer Improved[®]) com diluição de 1:200 em solução fisiológica. Um contador automático de células T-890 (Coulter Corp, Hialeah, Flórida, USA) foi utilizado para as dosagens de hemoglobina. Os resultados encontrados foram conferidos na lâmina de esfregaço sanguíneo e o hematócrito foi mensurado com o auxílio de uma régua após centrifugação em microcentrífuga modelo 241 (Fanem, São Paulo, Brasil). Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol e corados em solução de Giemsa (Merck, São Paulo, Brasil). A leitura da lâmina consistiu somente na avaliação morfológica de leucócitos (leucocitoscopia) e hemácias (hematoscopia) e pesquisa de hematozoários, em objetiva de imersão, sendo demais resultados encontrados nas contagens globais conferidos na lâmina e correlacionados com os valores de normalidade presentes na Tabela 1. Para o cálculo da média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos encontrados foi utilizado o programa EXCEL (Microsoft[®]). Como não havia valores disponíveis de Leucometria global e trombócitos para a referida espécie (*Spheniscus magellanicus*), os resultados destes parâmetros foram comparados a valores da espécie *Spheniscus humboldti*, sendo considerados como normalidade 13.000 ± 3.700 leucócitos/ μL e 18.300 ± 4.600 trombócitos/ μL (Villouta et al., 1997).

Tabela 1: Valores Hematológicos de referência para a espécie *Spheniscus magellanicus*.

Hemograma	
Parâmetros	Valores de Referência*
Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,57 – 2,41
Hemoglobina (g/dL)	12,1 – 15,7
Volume Globular (%)	38 – 46
VGM ¹ (fL)	181 – 249
CHGM ² (%)	30,3 – 35,9
Trombócitos**	13700 – 22900
Leucometria Global**	9300-16700

* Hawkey et al., **Villouta et al.

¹ Volume Globular Médio, ² Concentração de Hemoglobina Globular Média

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Ao exame clínico foram detectadas mucosas hipocoradas em aproximadamente 50% dos animais avaliados e peso abaixo do

esperado, além de, intensa dispnéia, desidratação e eventualmente lesões sugestivas de trauma em diferentes regiões do corpo. Os animais apresentavam, ainda, alterações gastrointestinais, evidenciadas por mudança na coloração das fezes. Os resultados hematológicos dos nove Pingüins-de-magalhães avaliados encontram-se na tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Resultados do eritrograma, contagem de trombócitos e leucometria global de nove Pingüins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro na Fundação Zoológico de Niterói.

Animal N°	Hematimetria (x10⁶/µL)	HGB* (g/dL)	Volume Globular (%)	VGM** (fL)	CHGM*** (%)	Trombócitos (/µL)	LG**** (/µL)
1	1,44	16,2	45	312,5	36	22140	59900
2	1,86	17,9	42	225,8	42,6	17160	48800
3	1,00	15,9	38	380	41,8	18480	37500
4	1,13	12,0	29	256,6	41,4	14520	51500
5	1,38	16,4	41	297,1	40	22620	55400
6	1,37	14,8	37	270,1	40	17000	83000
7	1,47	15,6	38	258,5	41	41250	146300
8	1,43	16,8	42	293,7	40	12350	20200
9	0,79	11,1	27	341,7	41	32000	68000
MÉD ¹ ± DP ²	1,0 – 1,6	13,1 – 17,3	32 – 43,4	248,3 – 337,5	38,6 – 42,2	12722 – 31172	24600 – 102187

*Hemoglobinometria, ** Volume Globular Médio, *** Concentração de Hemoglobina Globular Média,

**** Leucometria Global

¹ Média, ² Desvio Padrão

Tabela 3: Resultados da avaliação morfológica de esfregaços sangüneos (hematoscopia, leucocitoscopia e pesquisa de hemoparasitas) de nove Pingüins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro na Fundação Zoológico de Niterói.

Animal N°	Hematoscopia	Leucocitoscopia	Pesquisa de Hemoparasitas
1	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados
2	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados
3	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos com morfologia normal e alguns segmentados	Não foram encontrados
4	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados
5	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados
6	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados
7	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados
8	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos com morfologia normal	Não foram encontrados
9	Anisocitose e Policromasia	Heterófilos hipersegmentados, degranulação dos heterófilos, monócitos ativados	Não foram encontrados

De acordo com os resultados do eritrograma (Tabela 2) 33,3% e 88,9% dos pingüins avaliados demonstraram diminuição do volume globular e hematimetria, respectivamente, caracterizando anemia, embora não se possa descartar a hipótese de uma redução fisiológica no volume globular em pingüins jovens, uma vez que os valores de normalidade empregados foram relativos a animais adultos (Hodges, 1977; Kostelecka-Myrcha & Myrcha, 1980; Stoskopf et al, 1980; Hawkey et al, 1984). Mudanças no tamanho dos eritrócitos das aves incluem microcitose,

macrocitose e anisocitose (Thrall, 2004). Em aves, os eritrócitos jovens possuem tamanho menor do que os maduros e deste modo, as anemias microcíticas associadas à policromasia são consideradas regenerativas (Almosny & Monteiro, 2006). Entretanto, em 88,9% dos animais estudados, o VGM estava acima dos valores de referência e nos demais estava dentro dos limites esperados para a espécie, indicando a presença de um componente arregenerativo na eritropoiese desses exemplares, que em aves pode estar associado às doenças fúngicas e bacterianas, doença inflamatória crônica, doença renal ou hepática crônica ou neoplasias (Almosny & Monteiro, 2006). Entretanto, não se pode descartar a existência de sinais de regeneração, evidenciados à hematoscopia (Tabela 3) em função da anisocitose e policromasia (Almosny & Monteiro, 2006). Observou-se também que, em relação à hemoglobinometria (HGB), 22,2% demonstraram baixos valores de hemoglobina, sustentando a hipótese de anemia. 55,6% dos animais obtiveram valores aumentados de hemoglobinometria e 100% altas Concentrações de Hemoglobina Globular Média (CHGM), que podem ser devidos à hemólise iatrogênica e/ou processos hemolíticos (Thrall, 2004). Os resultados encontrados neste trabalho revelaram que 22,2% dos pingüins avaliados apresentavam aumento na contagem de trombócitos, 11,1% apresentavam trombocitopenia, enquanto a maioria das aves apresentou resultados dentro dos valores de normalidade. Tais variações não foram consideradas significantes devido ao fato de que os valores de referência utilizados pertenciam à espécie (*Spheniscus humboldti*) e não ao Pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), cujos valores de referência não foram encontrados. De acordo com Thrall (2004), a trombocitopenia pode resultar de uma redução na produção medular ou aumento do consumo periférico e, eventualmente pode ser associada à septicemia ou coagulação intravascular disseminada. Na avaliação dos esfregaços sanguíneos não foram encontrados hemoparasitas, o que contrasta com o comum achado de malária (*Plasmodium elongatum* e *Plasmodium relictum*) em pingüins de vida livre e de cativeiro (Clarke & Kerry, 1993). Por outro lado, um resultado negativo para hemoparasitas não descarta a possibilidade de infecção (Thrall, 2004).

Na Leucometria Global 100% dos animais apresentaram leucocitose, heterófilos apresentando alterações tóxicas (hipersegmentação e degranulação), além de monócitos ativados (Tabela 3). As leucocitoses em animais selvagens estão freqüentemente associadas ao estresse, entretanto, os processos infecciosos agudos, em especial de origem bacteriana, em geral estão acompanhados de leucocitose com aumento de heterófilos (Almosny & Monteiro, 2006). Os heterófilos são funcionalmente equivalentes aos neutrófilos de mamíferos. Eles participam ativamente em lesões inflamatórias e são fagócitos (Topp & Carlson, 1972). Os grânulos dos heterófilos contêm lisozimas e proteínas necessárias para atividade bactericida. Em resposta à severa doença sistêmica, heterófilos de aves apresentam alterações tóxicas, assim como as evidenciadas nos Pingüins-de-magalhães do presente estudo, semelhantes àquelas encontradas em neutrófilos de mamíferos. Heterófilos tóxicos têm aumento de basofilia citoplasmática, vacuolização e granulação anormal, (como degranulação) e degeneração do núcleo da célula (Thrall, 2004) Já os monócitos possuem atividade fagocítica e migram para os tecidos, transformando-se em macrófagos (Harmon & Blisson,

1993). Estas células possuem substâncias químicas ativas que estão envolvidas na inflamação e destruição de organismos invasores. Monócitos possuem, ainda, um importante papel imunológico no processamento de antígenos (Dieterien-Lievre, 1988). Portanto, a leucocitose, que se demonstrou inclusive bastante marcante em alguns indivíduos, associada à toxicidade dos heterófilos e presença de monócitos ativados sugeriu a presença de um processo inflamatório, com componente infeccioso associado, provavelmente relacionado a uma severa infecção bacteriana nos pingüins deste estudo.

CONCLUSÃO: Com este trabalho pode-se concluir, correlacionando os resultados hematológicos com os dados clínicos, que os pingüins apresentavam um marcante processo inflamatório com componente infeccioso associado, provavelmente de origem bacteriana, além de outros processos, desordens gastro-intestinais e desidratação. Embora a avaliação dos parâmetros hematológicos não permita o diagnóstico preciso sobre localização do processo infeccioso e sobre qual foi a desordem primária, os exames foram essenciais para delineamento e prognóstico da doença. Muitas vezes a presença desordens múltiplas nos animais leva ao aparecimento de sinais clínicos inespecíficos, sendo assim necessários exames complementares e mais estudos acerca dos Pingüins-de-magalhães para que os diagnósticos sejam cada vez mais precisos e o tratamento iniciado precocemente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Almosny N.R.P.; Monteiro A.O. 2006. Patologia Clínica. In: Cubas Z.S.; Silva J.C.R.; Catão-Dias J.L. Tratado de Animais Selvagens. São Paulo: Roca. Cap.59, p.939-966
- Clarke J.R.; Kerry K.R. 1993. Diseases and parasites of penguins. Korean J. Polar Res. 4: p.79-96
- Coles E.H. 1986. Avian hematology and blood chemistry. In: E. H. Coles. Veterinary Clinical Pathology. 4ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company p. 291-300
- Cranfield R.M. 2003. Sphenisciformes (Penguins). In: Fowler M.E. & Miller R.E. Zoo & Wild Animal Medicine. 3ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company p.103-110
- Dieterien-Lievre F. Birds. In: Rawley A.F.; Ratcliffe N.A. 1988. Vertebrate blood cells. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p.257-336
- Harmon B.G.; Blisson J.R. 1993. Disassociation of bacterial and fungistatic activities from the oxidative burst of avian macrophages. Am J Vet Res 51: p.71-75
- Hawkey C.M.; Hart M.G.; Samour H.J. 1984. Age-related changes and haemopathological responses in Chilean flamingos (*Phoenicopterus chilensis*). Avian Pathology, 13:p.223-229.
- Hawkey C.M.; Horsley D.T.; Keymer I.F. 1989. Haematology of wild penguins (Sphenisciformes) in the Falkland Islands. Avian Pathology, 18:p.495-502
- Rigo G.M.;Fonseca G.; Velloso M. 2007. Ocorrência de animais marinhos na zona entre mares em Ilha Comprida, SP. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, p.1-2
- Hodges R.D. 1977. Normal avian (poultry) haematology. In: Comparative Clinical Haematology, p.485-517. Edited by Archer, R.K. and Jeffcott, L.B. Oxford: Blackwell

- Kostelecka-Myrcha A.; Myrcha A. 1980. Hematological studies of Antarctic birds. II Changes of the hematological indices during the development of the Pygoscelid penguins. Polish Polar Research 1: p.175-181.
- Ruppolo V.; Adornes A.C.; Nascimento A.C.; Silva Filho R.P. 2004. Reabilitação de pingüins afetados por petróleo. Clínica Veterinária, ano IX, n.51, p.78-83
- Ruppolo V.; Santos M.C.O. 1998. Aves e mamíferos visitantes da costa brasileira. Clínica Veterinária, ano , n.20, p.37-40
- Silva Filho R.P.; Ruppolo V. 2006. Sphenisciformes (Pingüim). In Cubas Z.S., Silva J.C.R.; Catão-Dias J.L. Tratado de Animais Selvagens. São Paulo: Roca. Cap.21, p.309-323
- Stoskopf M.K. 1986. Penguin and Alcid Medicine. In: Fowler M.E. Zoo & Wild Animal Medicine. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company p.189-194
- Stoskopf M.K.; Yarborough B.A.; Beall F.B. 1980. Baseline hematology of the African black-footed penguin. In: The Comparative Pathology of Zoo Animals, p. 647-652. Edited by Montali, R.J. and Migaki, G. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Thrall M.A. 2004. Hematology of Birds. In: Thrall M.A. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Cap17. p.225-258
- Topp R.C; Carlson H.C. 1972. Studies on avian heterophils. II: histochemistry. Avian Dis. 16: p.369-373
- Villouta G., Hargreaves R. & Riveros V. 1997. Haematological and clinical biochemistry findings in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). Avian Pathology, 26:851-858
- Williams T.D. 1995. The penguins. Oxford University Press, p.1-258