

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Veterinária



Dissertação

**Curva de parâmetros sanguíneos e de peso em (*Spheniscus magellanicus*)
(Foster, 1781) pinguins de Magalhães com aspergilose durante reabilitação**

Aryse Moreira Martins

Pelotas, 2015

Aryse Moreira Martins

**Curva de parâmetros sanguíneos e de peso em (*Spheniscus magellanicus*)
(Foster, 1781) pinguins de Magalhães com aspergilose durante reabilitação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M379c Martins, Aryse Moreira

Curva de parâmetros sanguíneos e de peso em (Spheniscus magellanicus) (Foster, 1781) pinguins de Magalhães com aspergilose durante reabilitação / Aryse Moreira Martins ; Mario Carlos Araújo Meireles, orientador ; Melissa Orzechowski Xavier, coorientadora. — Pelotas, 2015.

58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Aspergillus. 2. Hematócrito. 3. Proteínas plasmáticas totais. 4. Pinguins-de-Magalhães. I. Meireles, Mario Carlos Araújo, orient. II. Xavier, Melissa Orzechowski, coorient. III. Título.

CDD : 598.441

Aryse Moreira Martins

Curva de parâmetros sanguíneos e de peso em (*Spheniscus magellanicus*) (Foster, 1781) pinguins de Magalhães com aspergilose durante reabilitação

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Neuschrack Albano
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande de Sul

Profa. Dra. Patricia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe, guerreira, inspiração de caráter e bondade! Obrigada pelo apoio e amor incondicional! À minha irmã e meu cunhado sempre importantes no incentivo para seguir buscando meus sonhos. À minha sogra pelo apoio constante.

Ao meu amor Joe, você sempre acreditou tanto em mim, as vezes, e muitas vezes, até mais que eu! Obrigada pelo incentivo e por me fazer tão feliz!

Ao diretor do museu oceanográfico, Lauro Barcellos, que mantém esse lugar maravilhoso sempre de portas abertas para a sociedade, me sinto grata por poder disfrutar de um local tão incrível como este.

Aos meus mais que colegas de trabalho, meus amigos! Andrea, Paula, Thaíse, Silvia, Vanessa e Pedro, agradeço por compreenderem minha ausência diversas vezes neste período, por me apoiarem e estarem sempre comigo. Me sinto privilegiada por ter no trabalho a minha segunda família! E claro, à parte, agradeço ao pai dessa família! E não há outra forma de denominar esse amigo incrível, a pessoa com o maior coração que já conheci. Neneco, obrigada pelo apoio e amizade!

Aos colegas do Micvet, pelos quais possuo grande carinho, agradeço a compreensão pelo meu distanciamento e carinho com que sempre fui tratada. Em especial à Ângela, também pessoa maravilhosa, sempre solícita e me 'salvando' diversas vezes.

À minha co orientadora incrível, sempre tão carinhosa e de contribuição valiosa para o resultado deste trabalho. Mel, muito obrigada por tudo!

E ao meu grande orientador Mário. Obrigada por me aceitar como orientada, por me dar esta oportunidade única, de mesmo já atuando no mercado de trabalho, poder seguir na busca do conhecimento, e por compreender minhas limitações.

Por fim, a todos que fazem parte da minha vida, amigos, professores, colegas, pessoas que não citei, mas estão no meu coração! Obrigada!!!

Resumo

MARTINS, Aryse Moreira. **Curva de parâmetros sanguíneos e de peso em (*Spheniscus magellanicus*) (Foster, 1781) pinguins de Magalhães com aspergilose durante reabilitação.** 2015. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Parâmetros sanguíneos básicos e peso corpóreo são rotineiramente utilizados para monitoramento do estado geral de Pinguins-de-Magalhães em reabilitação, sendo inclusive considerados critérios para liberação de acordo com protocolos estabelecidos. No entanto, estudos mostrando o perfil de variação destes parâmetros durante o desenvolvimento da aspergilose nestes animais não são conhecidos. Neste sentido, este trabalho objetivou determinar curva de peso, de hematócrito (Ht) e de proteínas plasmáticas totais (PPT) em pinguins com aspergilose. O estudo do tipo caso-controle retrospectivo foi realizado com pinguins em reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos, (CRAM-FURG) em Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, os quais foram classificados em dois grupos, sendo o grupo caso composto por pinguins com aspergilose, confirmada *post mortem* a partir de achados necroscópicos associados ao cultivo microbiológico e a histopatologia, e o grupo controle composto por pinguins saudáveis, que foram liberados. Para a determinação das curvas, foram coletados dados de nove amostras sequenciais, realizadas em média a cada sete dias, durante um período máximo de 81 dias, sendo estes submetidos a análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Bonferroni. Ao todo, 140 animais foram estudados (50% casos e 50% controles). Pinguins com aspergilose diferiram significativamente do grupo controle em todos os parâmetros analisados. O peso médio, na primeira coleta foi de 2.747g no grupo caso e 2.875g no grupo controle. Os animais com aspergilose apresentaram média de peso menor que animais liberados ao longo de toda a reabilitação. O ganho de peso dos animais com aspergilose ocorreu somente nas três primeiras coletas, com estabilização ou perda de peso nas coletas posteriores, até seu desfecho. Em relação ao hematócrito (Ht) o valor médio na primeira coleta, foi de 38% e 44% nos grupos caso e controle, respectivamente. No grupo de pinguins com aspergilose foi detectado um declínio progressivo na curva dos valores de Ht ao longo do período de reabilitação, os quais permaneceram abaixo do limite inferior de referência para a espécie ($42\% \pm 4\%$) desde a terceira coleta até seu desfecho, enquanto o grupo controle apresentou valores dentro da referência para a espécie em todas as coletas. A primeira coleta de dados de PPT demonstrou um valor médio similar, de 6,4g/dL e 6g/dL, entre os grupos caso e controle, respectivamente. No entanto, na análise da curva, o grupo com aspergilose apresentou aumento progressivo desses valores durante toda a reabilitação, alcançando um valor médio de 10,3g/dL na nona coleta, diferentemente do grupo controle, que permaneceu estável a partir da sexta coleta, com valores entre 7,9 e

8g/dL. Neste trabalho podemos observar que estes parâmetros, além de serem critérios para liberação de pinguins também podem ser utilizados como indicadores de animais potencialmente infectados, uma vez que o resultado das curvas geradas a partir das análises mostraram diferenças pontuais no grupo de pinguins com aspergilose quando comparado com animais saudáveis. O estabelecimento desse perfil pode servir como parâmetro para início de terapia preemptiva para aspergilose ou de investigação diagnóstica mais específica.

Palavras-chave: *Aspergillus*; hematócrito; proteínas plasmáticas totais; pinguins-de-Magalhães

Abstract

MARTINS, Aryse Moreira. **Curve of blood parameters and weight in (*Spheniscus magellanicus*) (Foster, 1781) Magellanic penguins with aspergillosis during rehabilitation.** 2015. 58f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Basic blood parameters and body weight are routinely used to monitor the general condition of Magellanic penguins in rehabilitation, including being considered criteria for release in accordance with established protocols. However, studies showing the variation of these parameters during the development of aspergillosis in these animals is not known. Thus, this study aimed to determine the curve of weight, hematocrit (Ht) and total plasma proteins (PPT) in penguins with aspergillosis. The study of retrospective case-control was carried out with penguins during rehabilitation at Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) in Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, which were classified into two groups: the case group composed by penguins with aspergillosis, confirmed *post mortem* from necroscopic findings associated with microbiological culture and histopathology, and the control group consisted by healthy penguins, which were released. For the determination of the curves, data were collected from nine sequential samples, performed on average every seven days for a maximum period of 81 days, which underwent to analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Bonferroni. A total of 140 animals were studied (cases 50% and 50% control). Penguins with aspergillosis were significantly different from the control group in all analyzed parameters. The average weight in the first collection was 2.747g in the case group, and 2.875g in the control group. Animals with aspergillosis showed a lower mean weight than animals released throughout the rehabilitation. The weight gain of the animals with aspergillosis occurred only in the first three collections, with stabilization or weight loss in later collections until the last collection. Regarding the hematocrit (Ht) the average value in the first collection, was 38% and 44% in the case and control groups, respectively. In the group of penguins with aspergillosis a progressive decline was detected in the curve of Ht values throughout the rehabilitation period, which remained below of the lower reference limit for the specie ($42\% \pm 4\%$) from the third until the last collection, while the control group had values within the reference for the specie in all samples. The first collection of PPT data showed a similar average value of 6.4g/dL and 6g/dL, between case and control groups, respectively. However, the analysis of the curve of the group with aspergillosis showed progressive increase of these values throughout the rehabilitation, reaching an average of 10,3g / dL in the ninth collection, unlike the control group, which remained stable since the sixth collection, values between 7.9 and 8 g / dL. In this work we can see that these parameters besides being penguins criteria for release can also be used as indicators of potentially infected animals, as a result of the curves generated from the analysis showed significant differences in

penguins group with aspergillosis when compared with healthy animals. The establishment of this profile can be used as parameters for early preemptive therapy for aspergillosis or more specific diagnosis.

Key words *Aspergillus*; hematocrit; total plasma protein; Magellanic penguin

Lista de figuras

- Figura 1 Curva de peso corpóreo médio dos pinguins ao longo da reabilitação, demonstrando diferença significativa entre o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) em algumas coletas. *P<0,05..... 36
- Figura 2 Média de ganho de peso entre as coletas realizadas ao longo da reabilitação de pinguins, comparando o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados). *P<0,05..... 37
- Figura 3 Média de hematócrito dos pinguins ao longo da reabilitação, comparando o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) *P<0,05..... 38
- Figura 4 Média de proteínas plasmáticas totais dos pinguins ao longo da reabilitação, comparando o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) *P<0,05..... 40

Lista de tabelas

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Número de pinguins incluídos nas análises em cada coleta de acordo com o grupo pertencente: caso (animais que foram a óbito por aspergilose) ou controle (animais liberados)..... | 34 |
|----------|---|----|

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|-----------|--|
| CRAM-FURG | Centro de Recuperação de Animais Marinhos |
| FURG | Universidade Federal do Rio Grande |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| Ht | Hematócrito |
| IDGA | Imunodifusão Radial Dupla em Gel de Ágar |
| IUCN | International Union for Conservation of Nature |
| PAS | Ácido periódico de Schiff |
| PDA | Ágar Potato Dextrose |
| PPT | Proteínas plasmáticas totais |
| TRI | Trato respiratório inferior |

Sumário

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Introdução..... | 12 |
| 2 | Revisão de Literatura..... | 15 |
| 2.1 | <i>Spheniscus magellanicus</i>..... | 15 |
| 2.2 | Reabilitação de <i>Spheniscus magellanicus</i>..... | 17 |
| 2.3 | <i>Aspergillus</i> spp. | 19 |
| 2.4 | Aspergilose em aves..... | 20 |
| 2.5 | Aspergilose em pinguins em cativeiro..... | 21 |
| 2.6 | Diagnóstico da aspergilose em pinguins..... | 22 |
| 2.7 | Prevenção e tratamento da aspergilose em pinguins..... | 25 |
| 3 | Artigo..... | 28 |
| 4 | Considerações Finais..... | 44 |
| | Referências | 45 |
| | Anexos..... | 52 |

1 Introdução

A aspergilose é uma doença fúngica de importância na área de medicina veterinária. Embora possa acometer diversas espécies animais, é de extrema relevância na sanidade de aves, as quais possuem particularidades tanto na anatomia como fisiologia do sistema respiratório, o que as torna mais suscetíveis à doença (FRIEND, 1999; TELL, 2005).

Fungos *Aspergillus* são os causadores desta enfermidade e estes são considerados oportunistas, na medida em que apesar de estarem presentes em todos os ambientes (ubíquos) e se dispersarem pelo ar (anemófilos), são capazes de causar doença em indivíduos com imunidade comprometida, sendo rara a sua ocorrência em animais hígidos e considerados em equilíbrio fisiológico (RAPER; FENNEL, 1965; LACAZ, 2002; SIDRIM; ROCHA 2004).

A aspergilose é uma das doenças de maior importância em pinguins em cativeiro, correspondendo a *causa mortis* de mais de 50% de *Spheniscus magellanicus* (pinguins-de-Magalhães) em reabilitação. Esta alta porcentagem se deve principalmente a predisposição destes animais à doença, associada a dificuldade de diagnóstico precoce e, conseqüentemente, de tratamento imediato (JONES; OROSZ, 2000; XAVIER et al., 2007).

No Brasil, a ocorrência do *S. magellanicus* é comum durante o inverno austral, quando estas aves migram desde suas colônias localizadas na Patagônia Argentina (42°S) e Ilhas Malvinas (54°S), até o litoral sudeste brasileiro podendo, em alguns casos, chegar ao litoral nordeste, como o estado do Ceará (03°S). A migração destes animais ocorre devido ao acompanhamento de seu alimento, já que, durante o inverno cardumes de peixes como a *Engraulis anchoita* (anchoita) sobem em direção ao litoral brasileiro através da corrente de águas frias denominada corrente das Malvinas (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Durante este processo migratório que ocorre anualmente, os pinguins ficam expostos a diversos perigos, dentre os quais pode-se citar a captura incidental em redes de pesca e pesca de espinhel, ausência de alimento devido a sobrepesca, interação negativa com embarcações, e poluição dos oceanos como a contaminação por óleos (BOERSMA, 2008). Ao serem impactados por ações antrópicas que não causem a morte imediata dos indivíduos, os pinguins tendem a sair do oceano devido a sua debilidade, indo parar nas praias. Neste momento entram em ação Centros de Recuperação específicos para reabilitação de animais marinhos (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2008; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Os Centros de Recuperação de Animais Marinhos possuem como objetivo resgatar e reabilitar animais debilitados pelas mais diversas causas, e devolvê-los saudáveis e selvagens à natureza a fim de que estes sigam seu ciclo biológico, colaborando para a conservação. Durante o processo de reabilitação dos pinguins, estes animais debilitados tornam-se suscetíveis ao desenvolvimento da aspergilose (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2008; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014; XAVIER et al., 2007).

A aspergilose não possui sinais clínicos específicos, podendo o animal apresentar dispneia, inapetência, apatia e/ou regurgitação e emaciação quando a enfermidade encontra-se em estágio avançado. O diagnóstico precoce desta enfermidade é muito difícil e oneroso para os Centros de Recuperação e, apesar de estudos neste sentido estarem em progresso, o tratamento precoce ainda é inviável (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014; XAVIER; MADRID, 2014).

Embora exames sanguíneos básicos, como o hematócrito e dosagem de proteínas plasmáticas totais, sejam dificilmente utilizados para diagnósticos definitivos, estes podem ser ferramentas muito úteis quando aliados a exames clínicos, para compor o diagnóstico de determinadas doenças (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). De fato, estudos recentes demonstram o valor destes parâmetros no auxílio do diagnóstico da aspergilose em diversas espécies de aves (BLACK et al., 2013; CRAY et al., 2009, GRACZYK et al., 1998). No entanto, no caso da aspergilose em pinguins não existem estudos que determinem o perfil sanguíneo e clínico dos indivíduos doentes. A comparação de parâmetros sanguíneos e clínicos dos animais doentes com saudáveis poderá determinar um padrão de variação durante a reabilitação que auxilie no diagnóstico presuntivo da aspergilose em *S. magellanicus* futuramente.

Este trabalho teve como objetivo determinar a curva de ganho de peso e de parâmetros sanguíneos em *Spheniscus magellanicus* (pinguins-de-Magalhães) com aspergilose em reabilitação. Como objetivos específicos pode-se listar:

- Comparar a curva de peso e de ganho de peso de *Spheniscus magellanicus* reabilitados com animais que vieram a óbito por aspergilose.
- Comparar a curva de hematócrito apresentada por animais que foram liberados e animais que vieram a óbito por aspergilose.
- Comparar a curva de proteínas plasmáticas totais apresentada por animais que foram liberados e animais que vieram a óbito por aspergilose.
- Avaliar o tempo decorrido desde a chegada dos pinguins para reabilitação até o início de alterações dos valores na curva dos parâmetros avaliados .

2 Revisão da Literatura

2.1 *Spheniscus magellanicus*

Os pinguins são aves da ordem Sphenisciformes, pertencentes a família Spheniscidae, organizados em seis gêneros e 18 espécies que estão distribuídas somente no hemisfério sul, e não necessariamente associadas ao gelo. Das espécies de pinguins que existem, somente duas se reproduzem estritamente na Antártica. As demais espécies podem ser encontradas na Nova Zelândia, Galápagos, África do Sul, Ilhas subantárticas, e na América do Sul, como é o caso do *Spheniscus magellanicus*. Este pinguim se reproduz na Patagônia Argentina e Chilena, e nas Ilhas Malvinas (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014; WILLIAMS, 1995).

São aves marinhas, não voadoras, que possuem asas adaptadas em forma de nadadeira, o que lhes confere uma alta capacidade de mergulho rápido. Suas penas de tamanho pequeno, presentes em alta densidade e minuciosamente organizadas ao longo de todo o corpo do animal, com exceção das patas e bico, permitem que estas aves permaneçam por um longo período de tempo dentro da água, sem ocorrer hipotermia. As patas possuem membranas interdigitais as quais possibilitam melhor desempenho na água (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Os *S. magellanicus* não possuem dimorfismo sexual acentuado, sendo geralmente os machos um pouco maiores que as fêmeas, porém sem distinção determinante aos olhos. Neste sentido, é possível diferenciar somente filhotes, juvenis e adultos. Enquanto filhotes possuem plumão com coloração acinzentada em todo o corpo, juvenis apresentam plumão e penas com coloração acinzentada no dorso e cabeça, e branca no ventre, e os adultos, animais com mais de um ano de idade, possuem dorso e cabeça pretos e ventre branco, com duas listras pretas no pescoço (HEREDIA et al., 2008).

Durante o verão austral os *S. magellanicus* estão em suas colônias se reproduzindo. Em meados de setembro, os machos chegam à colônia e organizam seu ninho, que é feito em formato de tocas superficiais no solo. Em seguida, chegam as fêmeas, quando ocorre a cópula. A incubação dos ovos dura aproximadamente 42 dias e a fêmea pode pôr até três ovos, sendo mais comum o nascimento de um ou dois filhotes. O cuidado parental é compartilhado entre macho e fêmea, e se estende ao longo de aproximadamente dois meses, quando os filhotes realizam a muda de penas para juvenis e se tornam independentes (WILLIAMS, 1995; YORIO et al., 2001).

Anualmente, ao fim dos cuidados com o filhote, entre os meses de fevereiro e março, os pinguins adultos realizam a muda de penas, processo no qual substituem todas as penas antigas por penas novas. Este processo gera um grande estresse ao animal, já que durante a muda, os pinguins permanecem em terra havendo restrição alimentar (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Após o período reprodutivo e muda de penas, os pinguins deixam a colônia e começam sua migração. Enquanto os adultos reprodutivos permanecem mais próximos à colônia na costa Argentina, os juvenis e adultos não reprodutivos tendem a se afastar mais da colônia em busca de alimento. Os pinguins desta espécie tendem a ficar entre 60 e 100km da costa durante seu período pelágico. A alimentação desta ave consiste basicamente de peixes, como *Sardinella brasiliensis* (sardinhas), *Engraulis anchoita* (anchoita) e *Merluccius hubbsi* (merluza comum), porém também podem se alimentar de moluscos e crustáceos (CRISSEY et al., 2002; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

O *S. magellanicus* está classificado como “Quase ameaçado” na lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature), sendo sua população mundial estimada em 1.300.000 pares. Estudos apontam que existe flutuação entre as diferentes colônias, ou seja, enquanto algumas aumentam o número de indivíduos, outras diminuem. Entretanto, de um modo geral, a população mundial vem sofrendo rápido declínio, sendo a poluição dos oceanos por óleo o principal risco para a espécie atualmente (IUCN, 2014).

2.2 Reabilitação de *Spheniscus magellanicus*

Durante a migração anual dos pinguins, estes indivíduos estão expostos a diversos riscos. Quando impactados por fatores antrópicos ficam debilitados, interrompendo seu ciclo natural de migração e culminando com sua saída da água e permanência na orla da praia. Animais contaminados por óleos de origem fóssil comumente chegam à costa com baixo peso corporal, anêmicos e desidratados. Em adição, pode-se encontrar casos de intoxicação pela ingestão incidental do contaminante, além de queimaduras de pele e mucosas pelo produto (HEREDIA, 2008).

Esta demanda de pinguins debilitados por ações antropogênicas ocorrente nas costas da Argentina, Uruguai e Brasil, demonstra a necessidade da criação de Centros de Reabilitação de Animais Marinhos que possuem, em sua maioria, o objetivo de reabilitar animais marinhos e devolvê-los saudáveis e selvagens à natureza (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2008). Em especial, no sul do Rio Grande do Sul, na cidade de Rio Grande, existe o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) pertencente a Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Este Centro atua principalmente com pinguins-de-Magalhães contaminados por hidrocarbonetos e se tornou referência nacional na reabilitação de animais oleados.

A primeira medida a ser tomada após o resgate de pinguins debilitados é a estabilização, que consiste em procedimentos para restabelecer parâmetros vitais do animal. Dentre estes, estão a reversão do quadro de hipotermia ou hipertermia (valor de referência: 39 a 41°C); o descanso; a reidratação do animal; e a alimentação gradual com reposição vitamínica, visando a recuperação do peso corporal. Em caso de pinguins oleados, somente após estar estabilizado o animal será encaminhado para a despetrolização, ou seja, o banho para retirada do contaminante que recobre o corpo da ave (RUOPPOLO et al., 2004).

Ao longo do processo de recuperação, alguns parâmetros são avaliados rotineiramente visando o acompanhamento do estado de saúde do animal. Hematócrito (Ht), proteínas plasmáticas totais (PPT) e peso são os dados básicos, determinados por protocolos nacionais e internacionais, que devem ser acompanhados durante a reabilitação de aves marinhas (HEREDIA et al., 2008, RUOPPOLO et al., 2004, OILED WILDLIFE CARE NETWORK, 2000).

O hematócrito (Ht) é a porção de células vermelhas em relação ao volume sanguíneo total (LORENZI, 1999). A interpretação do resultado do hematócrito, associado aos dados clínicos e/ou outros exames pode culminar no diagnóstico presuntivo ou definitivo de diversas doenças (CAMPBELL, 1994). A anemia se caracteriza pela diminuição da concentração de eritrócitos ou hemoglobina, podendo em alguns casos, ser evidenciada através da queda dos valores de hematócrito. Em contrapartida, o aumento dos valores de hematócrito pode indicar tanto uma policitemia, ou seja, aumento de eritrócitos circulantes no sangue (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007), quanto um processo de desidratação (RUSSEL et al., 2003).

O plasma sanguíneo é composto por mais de 100 diferentes proteínas (PPT), sendo a albumina e as globulinas as principais. A albumina é responsável pela regulação osmótica do plasma e é importante para o transporte de substâncias na circulação, como hormônios e lipídeos em geral, enquanto que as globulinas atuam nos processos infecciosos e inflamatórios (LORENZI, 1999). Assim, a taxa de PPT pode aumentar quando há inflamações ou infecções, bem como em quadros de hiperproteinemia sem que isso seja um indicativo de doença, como ocorre em fêmeas ovíparas, antes da ovipostura. Nestes casos, o aumento na taxa de PPT, induzido por estrógeno, durante a vitelogênese, é decorrente do aumento de proteínas envolvidas na formação do ovo, (HARR, 2002).

Existem poucos estudos em relação aos perfis hematológicos e parâmetros clínicos em *S. magellanicus*. Alguns dados em pinguins de vida livre e pinguins em cativeiro são conhecidos, e podem servir como base para comparação em estudos presentes e futuros (GHEBREMESKEL et al., 1989; HAWKEY et al., 1989; RODRIGUES et al., 2010). Em estudo com pinguins em vida livre, foi demonstrado que a média de hematócrito dessas aves é 42%. Além disso, não observou-se variação significativa desses valores nos períodos pré e pós muda. Em pinguins em reabilitação, os animais aptos a liberação apresentaram hematócrito médio de 43%, valor semelhante aos animais de vida livre (HAWKEY et al., 1989; MARTINS et al., 2015).

Em análises considerando as proteínas plasmáticas totais (PPT) apresentadas por esses animais, observou-se que há diferença significativa entre o período pré muda, onde essas aves possuem média de 5,3g/dL e o período pós muda, com PPT média de 3,8g/dL para aves de vida livre (GHEBREMESKEL et al.,

1989). Pinguins em reabilitação aptos à liberação apresentaram a média de PPT de 5,8g/dL (MARTINS et al., 2015).

Em situações favoráveis, a reabilitação de pinguins dura em média 45 dias. Quanto menor o tempo em reabilitação, menor a chance do animal desenvolver doenças secundárias ao cativeiro. Dentre estas doenças, destacam-se o *bumblefoot* ou pododermatite, caracterizada por lesões na região plantar da ave, decorrente do piso inadequado aliado ao rápido ganho de peso do indivíduo em reabilitação; a malária aviária, adquirida principalmente por animais que passam o verão nos Centros de Reabilitação; e a aspergilose, doença fúngica oportunista não transmissível, a qual acomete principalmente o trato respiratório (SILVA FILHO; RUOPPOLO, 2014; VASTREELS; PARSONS, 2014; XAVIER et al., 2007).

2.3 *Aspergillus* spp.

O *Aspergillus*, causador da aspergilose, foi descrito pela primeira vez pelo botânico e padre Antonio Micheli, em 1729. Em 1965, Raper & Fennell identificaram 132 espécies dentro do gênero e, nos anos dois mil mais de 250 espécies já eram conhecidas, sendo 20 destas consideradas patogênicas. Atualmente, em função de novos métodos de identificação e classificação baseados em filogenia, morfologia e técnicas biomoleculares novas espécies de *Aspergillus* têm sido descritas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

O *Aspergillus* está dentro da divisão Eucomycota, subdivisão Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales, família Aspergillaceae. Fungos deste gênero estão distribuídos mundialmente, e são facilmente encontrados nos mais diversos ambientes como a água, a terra, o ar, além de alimentos e plantas (LATGÉ, 1999; XAVIER; OSÓRIO, 2009).

Estes fungos apresentam formas anamórficas e teleomórficas. Enquanto a reprodução assexuada é realizada através de conídios originados de uma célula conidiogênica, a reprodução sexuada ocorre através de ascósporos contidos em ascos (LACAZ et al., 2002; LATGÉ, 1999).

Macroscopicamente, fungos *Aspergillus* formam colônias filamentosas de crescimento rápido que possuem variações morfológicas de acordo com cada espécie. Em geral, caracterizam-se por apresentar colônias com textura entre algodonosa e pulverulenta, podendo chegar a rugosa com aspecto coriáceo. Quanto

à coloração da superfície das colônias, estas podem variar entre verde, amarelo, alaranjado, castanho ou preto. E o anverso geralmente apresenta cores branca, dourada ou acastanhada (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Microscopicamente, os fungos deste gênero apresentam hifas hialinas e septadas, medindo aproximadamente 4µm de espessura e se bifurcando em ângulo de 45°. A estrutura de frutificação é formada por uma célula pé denominada conidióforo e uma dilatação no ápice designada vesícula. As espécies podem ser unisseriadas ou bisseriadas, sendo a diferença entre esses grupos a presença de métulas em espécies bisseriadas, as quais se projetam da vesícula sustentando as células conidiogênicas (fiálides), enquanto que nas espécies unisseriadas, as fiálides são originadas diretamente da vesícula. As fiálides produzem diariamente milhões de propágulos fúngicos denominados conídios. A identificação das espécies de *Aspergillus* deve ser realizada através de chaves de identificação, observando-se as características macro e micro morfológicas apresentadas pelo fungo (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; KLICH, 2002).

2.4 Aspergilose em aves

A aspergilose é considerada uma enfermidade não contagiosa e oportunista, sendo fatores como a exposição ao agente infeccioso, quantidade de conídios inalados, virulência da cepa e resposta imune do hospedeiro determinantes para o desenvolvimento da doença (BEERNAERT, 2008; LATGÉ, 1999).

A infecção ocorre, principalmente, a partir da inalação de propágulos fúngicos presentes no ambiente, acometendo primariamente o trato respiratório, com invasão tecidual e possibilidade de disseminação pela corrente sanguínea ou por contiguidade, para outros órgãos. Mais raramente, a aspergilose pode acometer primariamente outros órgãos, como a pele, olhos, sistemas nervoso central, digestório, hepático ou renal (XAVIER et al., 2011).

O agente etiológico de maior importância é o *Aspergillus seção fumigati*, responsável por entre 90-95% dos casos de aspergilose. Dentre as prováveis causas para este grande número, pode-se citar a característica de termotolerância apresentada pela espécie, a qual permite o crescimento e a reprodução do microrganismo na temperatura corporal elevada das aves (39°- 41°C), bem como o diminuto tamanho dos conídios (2-3µm) que proporciona maior facilidade de

inalação por parte dos hospedeiros, e a produção de grande quantidade de gliotoxina, um metabólito imunossupressor produzido pelo fungo em invasão tecidual, cujas aves apresentam grande sensibilidade (LACAZ et al., 2002; LEWIS et al., 2005; TELL, 2005).

A aspergilose em aves pode causar grande prejuízo econômico e/ou ecológico. Em criadouros comerciais de aves de produção, a aspergilose é considerada a principal doença fúngica, sendo responsável por mais de 50% da mortalidade em lotes de aves ainda na primeira semana de vida, ou mesmo ainda dentro dos ovos (ANDREATTI-FILHO, 2000; TELL, 2005; TESSARI et al., 2004).

No caso de aves silvestres selvagens ou em cativeiro, a aspergilose também possui grande importância, já sendo relatada em inúmeras espécies, dentre elas, psitacídeos (GERMAN, 2000), *Eudromia elegans* (martinetas) (BLACK et al., 2013), *Larus cachinnans* (gaivotas) (NARDONI, 2006), *L. occidentalis*, *L. delawarensis*, *Uria aalge* (arau-comum), *Phalacrocorax penicillatus*, *P. auritus* (biguás) (BURCO et al., 2012), *Falco rusticolus*, *F. peregrinus*, *F. biamircus*, *F. cherrug* (falcões) (DI SOMMA et al., 2007). Em adicional, essa doença já foi relatada em diversas espécies de pinguins, como o *Pygocelis papua* (pinguim getoo) (FLACH et al., 1990), *Spheniscus demersus* (pinguim-africano) (BECHERT et al., 2008), *Spheniscus humboldti* (pinguim-de-Humboldt) (BUNTING et al., 2009) e *Spheniscus magellanicus* (pinguim-de-Magalhães) (CARRASCO et al., 2001; XAVIER et al., 2007).

2.5 Aspergilose em pinguins em cativeiro

Pinguins em reabilitação possuem inúmeros fatores predisponentes para o desenvolvimento da aspergilose. Primeiramente possuem uma anatomia particular das aves, a qual dificulta a defesa do animal contra esse microrganismo invasor. A ausência de epiglote, a ausência de diafragma, e a limitada camada de células ciliadas pseudoestratificadas no trato respiratório superior facilitam a penetração e manutenção dos conídios no trato respiratório inferior (TRI), possibilitando sua colonização e infecção. Em adição, os pinguins possuem sacos aéreos, que são estruturas providas de oxigênio em abundância e secreções respiratórias, as quais servem de substrato para o microrganismo, e pouco vascularizadas, o que dificulta o aporte de células de defesa para o local infectado (BAUCK, 1994; TELL, 2005).

Essas características morfológicas associadas ao estresse causado pelo manejo dos animais em reabilitação e pela migração, aos quadros de desidratação, à desnutrição, aos traumatismos e à intoxicação por petróleo, que contribuem para a imunossupressão do animal, conseqüentemente facilitam o desenvolvimento da aspergilose (CARRASCO et al., 2001; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2014).

A principal via de infecção pelo *Aspergillus* é o trato respiratório superior, a partir da inalação dos conídios que estão dispersos no ambiente. Após a inalação, os conídios tendem a se instalar no TRI, principal sistema acometido pela aspergilose (XAVIER; MADRID, 2014).

A aspergilose em pinguins apresenta-se especialmente na forma crônica com manifestação tardia dos sinais clínicos, podendo acontecer também a morte súbita do animal sem prévia apresentação de sinais (CARRASCO et al., 2001; XAVIER et al., 2011). Quando manifestados, os sinais clínicos da aspergilose em pinguins não são específicos. A forma aguda, apesar de mais rara, pode ocorrer quando o indivíduo é exposto a inóculos fúngicos de alta concentração, com quantidade massiva de conídios, os quais colonizam e invadem um órgão vital (AGUILAR; REDIG, 1995; REDIG, 2000; XAVIER et al., 2011).

Considerando-se que a reabilitação de animais marinhos, não diferentemente de animais terrestres, possui diversas limitações dentre as quais se destaca a limitação financeira, o diagnóstico precoce da aspergilose através de exames mais elaborados se torna inviável, dificultando conseqüentemente, a aplicação de um tratamento precoce e eficaz. Dessa forma, a aspergilose é considerada a doença que mais leva pinguins em reabilitação ao óbito (XAVIER et al., 2007).

2.6 Diagnóstico da aspergilose em pinguins

Para um diagnóstico presuntivo da aspergilose, pode-se contar com o auxílio de exames laboratoriais inespecíficos e clínicos. O hemograma de aves infectadas pode apresentar alterações como leucocitose com heterofilia em estágio inicial, monocitose com heterófilos tóxicos em estágio mais avançados e linfopenia, além de anemia não regenerativa (BLACK et al., 2013; REDING, 1993). Em adição, a eletroforese pode acusar inflamação crônica, caracterizada por hiperproteinemia. No caso da aspergilose, estudos recentes sugerem a utilização da eletroforese para complementação do diagnóstico da doença em aves (BLACK et al., 2013; CRAY et

al., 2009), inclusive em *S.humboldti* (pinguins-de-Humboldt) (DAVIDOW et al., 1997) a partir da detecção de decréscimo da concentração plasmática de albumina e aumento de globulinas.

Outra possível forma de diagnóstico presuntivo desta doença é a observação dos sinais clínicos como apatia, perda de apetite, regurgitação, perda de peso corporal e dispneia (FRIEND, 1999; RISI et al., 2003; TELL, 2005, XAVIER et al., 2007). Apesar de esses sinais clínicos não serem específicos para a aspergilose, sua detecção em pinguins em reabilitação podem indicar a doença, devido a sua alta prevalência nessas aves em cativeiro, seja temporário ou permanente. Entretanto deve-se elucidar que os sinais clínicos podem não ser evidenciados mesmo que a ave esteja desenvolvendo a doença e, na maioria das vezes, quando aparecem, a doença já está em fase avançada, o que dificulta o tratamento precoce, com chance de sucesso (CABANA et al., 2007; XAVIER et al., 2007).

Considerando-se métodos diagnósticos definitivos, podemos citar a associação entre cultivo microbiológico e histopatologia como o padrão ouro para o diagnóstico da aspergilose em pinguins. Essa associação se faz necessária para que a invasão tecidual seja detectada na histopatologia, uma vez que por serem fungos presentes em abundância em todos os ambientes, um cultivo positivo pode tanto significar doença quanto contaminação, podendo gerar um diagnóstico falso-positivo (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007; XAVIER; FARIA, 2009).

Para o cultivo micológico pode-se utilizar ágar Sabouraud dextrose, e para identificação das espécies, ágar Czapeck, ágar Malte e ágar Potato Dextrose (PDA). Os isolados de *Aspergillus* seção *fumigati*, apresentam crescimento rápido (24-48 horas), colônias pulverulentas de coloração do verso azul-esverdeada e reverso branco. Microscopicamente apresentam conidióforos lisos e hialinos, vesícula piriforme e fiáides unisseriadas distribuídas somente nos 2/3 superiores da vesícula (KLICH, 2002; XAVIER; FARIA, 2009).

Na histopatologia, utilizando-se Hematoxilina-Eosina (HE), Gomori Grocott ou ácido periódico de Schiff (PAS) pode-se observar a presença de estruturas fúngicas como hifas hialinas septadas em ângulo de 45° ou até mesmo o conidióforo, além de inflamação decorrente da invasão do microrganismo (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; XAVIER; FARIA, 2009).

Apesar destes exames poderem ser realizados *in vivo*, na maioria das vezes, o diagnóstico da aspergilose acaba sendo confirmado somente em exames *post*

mortem (XAVIER et al., 2011), isto porque há necessidade de procedimentos invasivos para coleta da amostra clínica tecidual necessária para comprovação da infecção.

Como alternativa à realização de biópsia tecidual, encontram-se os exames de imagem, como a endoscopia do TRI, a qual é um bom método para visualização de lesões ou colônias fúngicas. No entanto, também é considerado um método invasivo e, em caso de aves muito debilitadas é contra-indicado devido a necessidade de anestésias o animal para realização do exame. Além da endoscopia, a radiologia e a tomografia computadorizada podem ser ferramentas para o diagnóstico da aspergilose, porém quando há achados na radiografia, normalmente o prognóstico da doença é desfavorável, e o alto custo da tomografia a torna inviável para aplicação em pinguins em reabilitação (JONES; OROSZ, 2000; CRAY, 2012; REDIG, 1993).

Mais recentemente, alguns testes sorológicos têm sido considerados potenciais para o diagnóstico precoce da aspergilose em aves. Dentre estes destacam-se o monitoramento por imunodifusão radial dupla em gel de Ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para pesquisa de anticorpos, além do ELISA direto para busca de epítomos antigênicos (galactomanana, por exemplo) de fungos do gênero *Aspergillus* (JONES; OROSZ, 2000; CRAY 2012).

A IDGA é um teste qualitativo, exigindo alta concentração de anticorpos para formar uma linha de precipitação visível que determina um resultado positivo. Estudos recentes demonstram alta taxa de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da aspergilose em pinguins-de-Magalhães em reabilitação. O teste de ELISA indireto possui sensibilidade e especificidade mais elevada que a IDGA, entretanto sua utilização é restrita devido ao fato de ser uma técnica ainda não padronizada para a espécie (REDIG, 1993; BURCO et al., 2012; CRAY, 2012, XAVIER; MADRID, 2014). Da mesma forma, o teste para detecção sérica da galactomanana, principal componente da parede celular fúngica liberado durante o crescimento das hifas no tecido do hospedeiro, ainda não está validada para o uso em animais, embora seja considerado promissor para o diagnóstico da aspergilose em pinguins em reabilitação por alguns autores (CRAY, 2009, 2012, XAVIER; MADRID, 2014).

2.7 Prevenção e tratamento da aspergilose em pinguins

A prevenção é considerada o melhor caminho para a aspergilose em pinguins de cativeiro já que, para a realização de um tratamento eficaz, o diagnóstico precoce é fator determinante e, apesar de evoluções neste campo, ainda não se possui um método diagnóstico efetivo e viável financeiramente para este caso (XAVIER, et al., 2008; XAVIER, MADRID, 2014).

Primeiramente, a redução do estresse causado ao animal é uma medida básica a ser tomada. Dessa forma, o ambiente onde se encontram os animais deve ser o mais silencioso possível, o manejo com os pinguins deve ser limitado ao necessário e deve-se sempre que possível evitar o estresse visual. É importante também manter o conforto térmico das aves, assim como prover uma nutrição ideal (RUSSEL et al., 2003; SILVA FILHO; RUOPPOLO, 2014).

Estudos comprovam que a desinfecção do ambiente onde se encontram as aves é efetiva para a prevenção da doença quando realizada corretamente. Para isto, o produto mais indicado é o digluconato de clorexidina (20%), por ser um produto de baixa toxicidade para os animais e eficiente contra o *Aspergillus*. Aliada a esta desinfecção ambiental, é importante a manutenção diária da limpeza dos recintos, retirando mais de uma vez ao dia o excesso de matéria orgânica eliminada pelos pinguins. Em adição, a manutenção de um ambiente bem ventilado e o controle da temperatura e umidade local contribuem para minimizar a concentração de propágulos fúngicos à que os animais estão expostos, auxiliando na prevenção da aspergilose (RUSSEL et al., 2003; XAVIER et al., 2008).

Ainda de forma preventiva, protocolos de reabilitação recomendam o uso do fármaco antifúngico itraconazol, o qual deve ser administrado junto ao alimento, uma vez ao dia, durante 15 dias, na dose de 15 a 25mg/kg. O tratamento preventivo da aspergilose deve ser iniciado no mesmo dia da chegada do animal ao Centro, pois é um dos momentos de maior estresse para os pinguins, que comumente chegam emaciados, desidratados, anêmicos, hipotérmicos e ficam acomodados em ambientes antes não conhecidos, além de passarem por manejos que constantemente causam mais estresse aos indivíduos (BUNTING et al., 2009; RUOPPOLO et al., 2004).

Apesar da existência de estudos mostrando o sucesso de determinadas terapias para a aspergilose em outras aves (DI SOMMA et al., 2007), um tratamento

eficaz em pinguins não é descrito. A falha terapêutica provavelmente ocorre devido ao início tardio do tratamento, o qual é instaurado geralmente quando as aves apresentam sinais clínicos, o que implica em um estágio avançado da doença (XAVIER; MADRID, 2014).

Dentre os antifúngicos descritos para o tratamento em pinguins, destacam-se a anfotericina B, terbinafina e principalmente, os azóis como itraconazol e voriconazol. Todos agem no ergosterol, seja diretamente ou no processo de formação deste componente da membrana celular do fungo. O tratamento pode ser tópico, através de nebulização, via intratraqueal ou por instilação nasal e/ou diretamente nos sacos aéreos; ou sistêmico, realizada por via oral ou endovenosa (ABUNDIS- SANTAMARIA, 2003; BECHERT et al., 2010; BAUCK, 1994; BUNTING et al., 2009; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003).

Quanto ao voriconazol, apesar de haver poucos estudos com este medicamento em aves, devido principalmente ao seu alto custo, sua eficácia para o tratamento da aspergilose já foi comprovada em falconiformes e psittaciformes, sendo um fármaco promissor neste sentido. Entretanto, mais estudos devem ser realizados principalmente com relação a toxicidade e eficácia deste medicamento para demais espécies de aves (DI SOMMA et al., 2007, ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003).

Algumas particularidades compartilhadas pelos antifúngicos devem ser consideradas no momento da escolha do fármaco a ser utilizado para o tratamento da aspergilose. A primeira questão é quanto a farmacocinética e a farmacodinâmica dos antifúngicos de eleição para o tratamento da aspergilose em pinguins. Os estudos nessa linha são escassos. Bechert et al. (2010), demonstraram que para *Spheniscus demersus* (pinguins-africanos), a terbinafina deve ser administrada na dose diária de 15mg/kg para manter os níveis plasmáticos ideais, e Bunting et al. (2009) encontraram a dose diária de 20mg/kg do itraconazol comercial como a indicada para tratamento de *Spheniscus humboldti* (pinguins-de-Humboldt),

Embora sejam indicados inúmeros antifúngicos e vias de administração para tratamento da aspergilose em aves (BEERNAERT et al., 2009; Di SOMMA et al., 2007; OKABAYASHI et al., 2009; SILVANOSE; BAILEY; DI SOMMA, 2006), devido a escassez de estudos, ainda não está comprovadamente estabelecida a terapia mais indicada para esta doença em pinguins, permanecendo indisponível dados que determinem a toxicidade, o antifúngico de eleição, o tempo de tratamento e a

eficácia dos mesmos para estes animais. Bem como, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica de antifúngicos em pinguins-de-Magalhães não são descritos na literatura, dificultando a melhor escolha para se alcançar a cura clínica da aspergilose nestes animais.

3 Artigo

Curva de parâmetros sanguíneos e de peso em *Spheniscus magellanicus* (Foster, 1781) (Aves: Sphenisciformes) em reabilitação com aspergilose
Aryse Moreira Martins, Melissa Orzechowski Xavier, Rodolfo Pinho da Silva Filho, Angela Leitzke Cabana, Mário Carlos Araújo Meireles
Submetido à revista Archives of Veterinary Science

**CURVA DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E DE PESO EM *SPHENISCUS
MAGELLANICUS* (FOSTER, 1781) (AVES: SPHENISCIFORMES) EM
REABILITAÇÃO COM ASPERGILOSE**

*(Curve of blood and weight parameters in *Spheniscus magellanicus* (Foster, 1781)(Birds: *Sphenisciformes*) in Rehabilitation with Aspergillosis)*

RESUMO Parâmetros sanguíneos básicos e peso corpóreo são rotineiramente utilizados para monitoramento do estado geral de Pinguins-de-Magalhães em reabilitação, no entanto, estudos mostrando o perfil de variação destes parâmetros durante o desenvolvimento da aspergilose nestes animais não são conhecidos. Neste sentido, este trabalho objetivou determinar curva de peso, de hematócrito (Ht) e de proteínas plasmáticas totais (PPT) em pinguins com aspergilose. O estudo do tipo caso-controle retrospectivo foi realizado com pinguins em reabilitação no sul do Brasil, sendo o grupo caso composto por pinguins com aspergilose, e o grupo controle por pinguins saudáveis. Para a determinação das curvas, foram coletados dados de amostras sequenciais, realizadas em média a cada sete dias, durante um período máximo de 81 dias, sendo estes submetidos a análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Bonferroni. Ao todo, 140 animais foram estudados (50% casos e 50% controles). Pinguins com aspergilose diferiram significativamente do grupo controle em todos os parâmetros analisados, apresentando ganho de peso somente nas três primeiras coletas, com estabilização ou perda de peso nas coletas posteriores até seu desfecho, bem como declínio progressivo dos valores de Ht, os quais mantiveram-se abaixo do valor de referência para a espécie desde a terceira até a nona e última coleta, e aumento progressivo dos valores de PPT ao longo das coletas, com diferença significativa a partir da sexta coleta em relação ao grupo controle. O estabelecimento desse perfil em pinguins com aspergilose pode servir como indicativo de mau prognóstico destes animais em cativeiro, e como parâmetro

para início de terapia preemptiva para aspergilose ou de investigação diagnóstica mais específica.

Palavras-chave: *Aspergillus*; hematócrito; proteínas plasmáticas totais; *Sphenisciformes*

ABSTRACT Basic blood parameters and body weight are routinely used to monitor the general condition of Magellanic penguins in rehabilitation, however, studies showing the variation profile of these parameters during the development of aspergillosis in these animals are not known. Thus, this study aimed to determine the curve of weight, hematocrit (Ht) and total plasma proteins (PPT) in penguins with aspergillosis. The study of retrospective case-control was carried out with penguins in rehabilitation in southern Brazil, and the case group was composed by penguins with aspergillosis, and the control group by healthy penguins. For the determination of the curves, data were collected from sequential samples, performed on average every seven days for a maximum period of 81 days, which underwent analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Bonferroni. A total of 140 animals were studied (cases 50% and 50% control). Penguins with aspergillosis differed significantly from the control group in all parameters, with weight gain only in the first three collections, with stabilization or weight loss in later collections until its upshot, and progressive decline of Ht values, which were maintained below the reference value for the specie from the third to the ninth and final collection, and progressive increase of PPT values during the experimental period, with a significant difference since the sixth collection in the control group. The establishment of this profile in penguins with aspergillosis can serve as an indicator of poor prognosis of these animals in captivity, and as a parameter for early preemptive therapy for aspergillosis or more specific diagnosis.

Key words *Aspergillus*; hematocrit; total plasma protein; *Sphenisciformes*

INTRODUÇÃO

A aspergilose é uma doença fúngica, não contagiosa, considerada uma das principais causas de óbito em pinguins em reabilitação. A infecção ocorre

principalmente por via aérea, a partir da inalação de propágulos de *Aspergillus* spp. os quais estão dispersos em todos os ambientes. O trato respiratório inferior é o principal sistema acometido, embora muitas vezes ocorra disseminação via hematogena ou por contiguidade para outros órgãos, geralmente culminando na morte do indivíduo infectado (Carrasco et al., 2001; Xavier et al, 2007; 2011).

O diagnóstico dessa doença em pinguins em cativeiro ainda é estabelecido principalmente por exames *post mortem*, a partir da visualização na necropsia de granulomas e/ou colônias fúngicas em sacos aéreos, associada a exames micológicos e histopatológico (Carrasco et al., 2001; Xavier et al., 2011). Isto ocorre principalmente devido ao fato destas aves infectadas comumente apresentarem sinais clínicos inespecíficos e tardios, ou até mesmo morte súbita (Abundis-Santamaria, 2003; Beytut et al., 2004; Xavier et al., 2007).

Embora a doença seja descrita em pinguins em cativeiro desde a década de 40 (Ainsworth; Rewell, 1949; Flach et al., 1990; Khan et al., 1977), ainda hoje não existem métodos eficazes e acessíveis para diagnóstico *in vivo* da aspergilose nestes animais. Estudos recentes tem demonstrado o valor da avaliação de valores de hematócrito e de proteínas plasmáticas totais, albumina e globulinas, no diagnóstico da aspergilose em diversas espécies de aves (Black et al., 2013; Cray et al., 2009, Davidow et al., 1997; Graczyk et al., 1998).

Esses exames hematológicos básicos, como a determinação do hematócrito e das proteínas plasmáticas totais, em associação com ganho de peso são rotineiramente utilizados para monitoramento do estado geral de *Spheniscus magellanicus* (pinguins-de-Magalhães) durante o processo de reabilitação, especialmente devido ao baixo custo e alta acessibilidade. Valores de referência destes parâmetros, estabelecidos por protocolos, são utilizados como critérios para

liberação, caracterizando os pinguins aptos à reintrodução na natureza (Ruoppolo et al., 2004; Martins et al., 2015). No entanto, o comportamento destes parâmetros sanguíneos básicos e das medidas de ganho de peso em pinguins-de-Magalhães com aspergilose em cativeiro ainda não foi descrito.

Considerando que o conhecimento desses dados, os quais são rotineiramente coletados em Centros de reabilitação, pode contribuir com a identificação de animais potencialmente infectados por *Aspergillus* spp., este trabalho objetivou avaliar a curva de peso, de ganho de peso e de parâmetros sanguíneos como hematócrito e PPT em *S. magellanicus* que morreram por aspergilose durante a reabilitação.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo do tipo caso-controle retrospectivo foi realizado no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG), anexo ao Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de Carvalho Rios, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), no Rio Grande do Sul, Brasil. As informações foram coletadas do banco de dados do CRAM-FURG referentes a um período de cinco anos (janeiro de 2008 a dezembro 2012).

Foram caracterizados como casos e incluídos no estudo todos os pinguins-de-Magalhães que desenvolveram aspergilose durante a reabilitação. O diagnóstico destes casos foi confirmado por exames *post-mortem* a partir de achados macroscópicos em necropsia com confirmação laboratorial por isolamento de *Aspergillus* sp. em cultivo microbiológico associado a confirmação de invasão fúngica tecidual no exame histopatológico. O grupo controle foi selecionado aleatoriamente incluindo o mesmo número de animais do grupo caso, e composto por pinguins que passaram pelo mesmo processo de recuperação e não

apresentaram nenhuma intercorrência nem doença oportunista, tendo sido liberados hígidos ao habitat natural.

Os dados foram coletados inicialmente uma vez por semana por aproximadamente quatro semanas, período no qual os animais ainda estavam passando pela estabilização do seu quadro sanitário, necessitando dessa forma, acompanhamento maior dos parâmetros básicos de saúde. Após aproximadamente quatro semanas, as coletas ocorreram quinzenalmente ou mensalmente, dependendo da rotina do centro e do estado sanitário apresentado pelos animais. Esse aumento no intervalo entre as coletas ocorreu principalmente com a finalidade de diminuir o estresse dos animais já que, em sua maioria, depois de quatro semanas de reabilitação os animais já apresentavam um quadro estável dos parâmetros coletados. A periodicidade dos dados coletados seguiu a rotina de avaliação dos animais realizada no CRAM-FURG, sendo utilizada a mediana de todos os animais de cada grupo para determinação do tempo entre cada coleta.

Valores de hematócrito, PPT e peso corpóreo foram analisados em todos os pinguins, além disso, foi calculado o ganho de peso individual entre cada coleta. Estes dados foram acompanhados com coletas desde a chegada do animal no CRAM-FURG até o desfecho dos animais do grupo caso, óbito por aspergilose. Para a determinação das curvas de cada parâmetro, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com teste post-hoc de Bonferroni para comparação entre os grupos. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Stata, versão 11.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 140 pinguins foi incluído no estudo, 70 (50%) no grupo controle e 70 (50%) no grupo caso aspergilose. O período de avaliação dos parâmetros correspondeu a 81 dias, contemplando nove coletas de dados. A mediana de tempo

decorrido entre cada uma das primeiras quatro coletas de dados foi de sete dias, aumentando para oito dias entre a quarta e quinta coleta, nove dias entre a sexta e sétima coleta, e 17 e 19 dias entre a sétima e oitava e, oitava e nona coletas, respectivamente.

Os resultados da mediana de tempo de coleta refletem a rotina de manejo desenvolvida no Centro de Recuperação de Animais Marinhos CRAM-FURG, de forma que, preferencialmente, os exames de acompanhamento dos animais ocorrem semanalmente nas primeiras quatro semanas, passando para quinzenalmente, podendo chegar a mensalmente de acordo com o tempo de cativeiro dos animais.

Perdas foram ocorrendo com o decorrer do período de acompanhamento dos animais, tanto por óbito devido a aspergilose (grupo caso) quanto por liberação (grupo controle), resultando em um número total de onze pinguins na última avaliação (nona coleta) (Tabela 1). Em adição, a variação no número de animais analisados entre as coletas pode ser atribuída à perda de dados de algumas coletas, as quais não tiveram os resultados repassados para o banco de dados.

Tabela - 1 Número de pinguins incluídos nas análises em cada coleta de acordo com o grupo pertencente: caso (animais que foram a óbito por aspergilose) ou controle (animais liberados).

| Coleta | Grupo controle | Grupo caso | Total |
|--------|----------------|------------|-------|
| 1 | 69 | 69 | 138 |
| 2 | 69 | 57 | 126 |
| 3 | 70 | 54 | 124 |
| 4 | 69 | 49 | 118 |
| 5 | 62 | 38 | 100 |
| 6 | 45 | 25 | 70 |
| 7 | 30 | 20 | 50 |
| 8 | 15 | 7 | 22 |
| 9 | 9 | 2 | 11 |

As perdas de animais no grupo caso ao longo das coletas eram esperadas na medida em que a doença em pinguins é fatal, uma vez que o tratamento ainda é inviável devido a ausência de exames efetivos para o diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins (Jones; Orosz, 2000; Xavier et al., 2007). Da mesma forma, a redução do número de animais no grupo controle é atribuída ao fato de que os animais já recuperados devem ser reintroduzidos ao habitat natural no menor período de tempo possível, a fim de evitar o aparecimento das doenças secundárias ao cativeiro, as quais podem levar o animal à óbito, como a malária aviária e a pododermatite, além da própria aspergilose (Russel et al., 2003; Silva-Filho; Ruoppolo; 2014).

Em relação ao peso corpóreo dos pinguins, o valor médio na chegada dos animais, ou seja, na primeira coleta foi de 2.747g no grupo caso e 2.875g no grupo controle, sem diferença significativa ($P=0,182$). Os animais com aspergilose tiveram pouco aumento de peso ao longo da reabilitação e, quando comparados com os animais saudáveis, a partir da segunda coleta até a oitava, excetuando-se a sexta coleta, a média de peso desse grupo foi significativamente menor do que a do grupo controle (Figura 1).

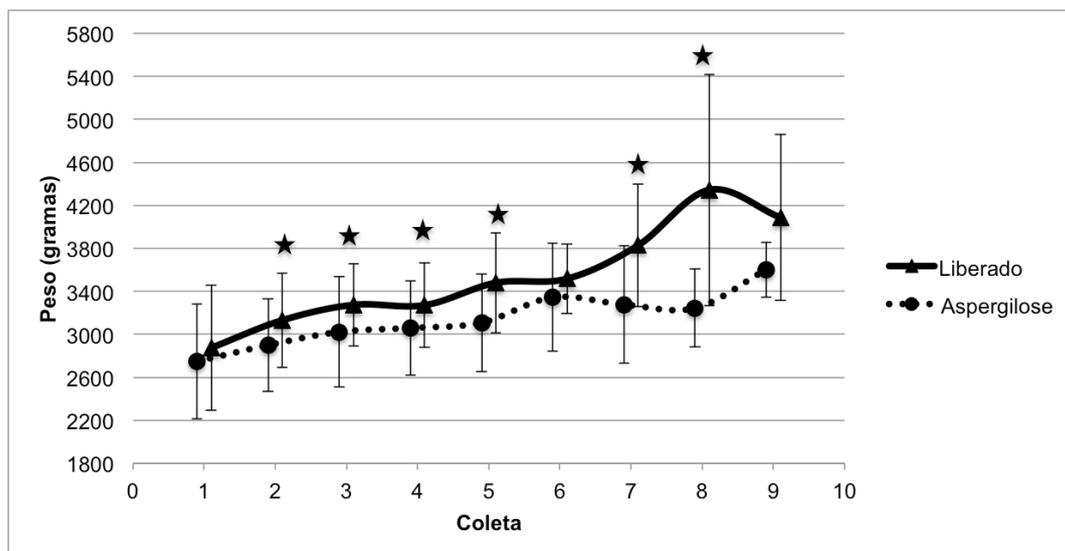


Figura 1 – Curva de peso corpóreo médio dos pinguins ao longo da reabilitação, demonstrando diferença significativa entre o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) em algumas coletas * $P < 0,05$.

Embora animais do grupo caso também tenham apresentado um aumento da média de peso durante a reabilitação, este foi menos expressivo quando comparado com o grupo controle, sendo o ganho de peso máximo entre coletas em animais com aspergilose de 548 g, enquanto que em animais do grupo controle foi de 1.259 g.

Em adição, no grupo de animais com aspergilose, em cinco dos oito intervalos de coleta a média de peso dos animais manteve-se estável ou reduziu, enquanto que no grupo controle, ganho de peso foi observado em praticamente todos os intervalos de coleta, havendo perda de peso somente entre a penúltima e a última coleta (Figura 2). A manutenção da tendência a estabilidade ou redução do peso nos animais com aspergilose ocorreu a partir do terceiro intervalo de coleta, que correspondeu a 21 dias de cativeiro.

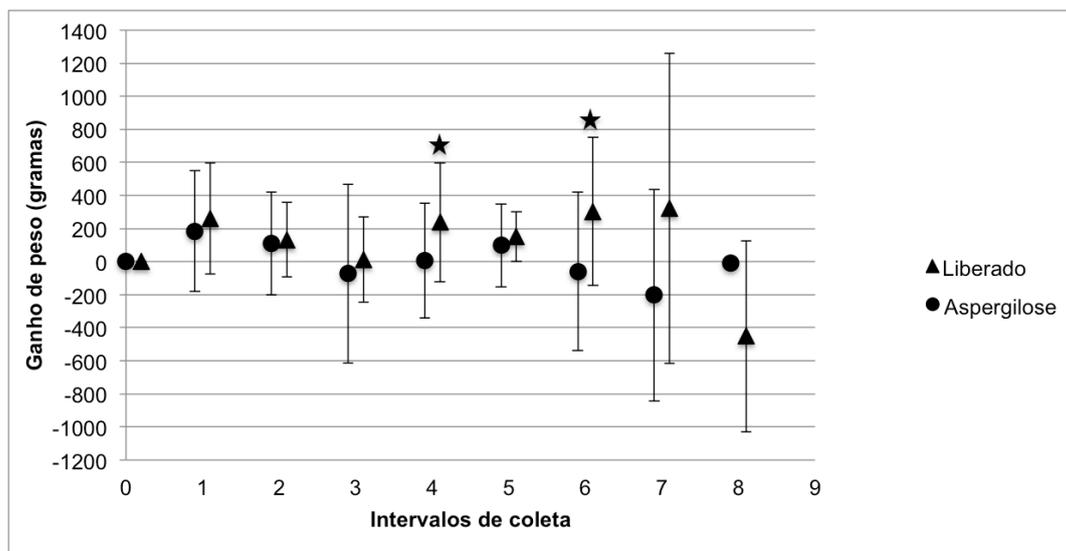


Figura 2 - Média de ganho de peso entre as coletas realizadas ao longo da reabilitação de pinguins, comparando o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) * $P < 0,05$.

Segundo Crissey et al. (2002), pinguins se alimentam de mais de uma variedade de peixe quando estão em vida livre, o que proporciona uma dieta rica em energia e vitaminas. Dessa forma, devem receber uma alimentação balanceada em cativeiro com reposição de vitaminas, sobretudo tiamina e vitamina E. Durante o período de reabilitação no CRAM-FURG, todos os pinguins recebem alimentação seguindo o protocolo de Ruoppolo et al. (2004), portanto, a oferta de alimento não pode ser considerada um fator responsável pela diferença de aumento de peso entre os dois grupos, já que ambos receberam o mesmo tratamento.

A literatura cita regurgitação, inapetência e anorexia como sinais clínicos da aspergilose em aves marinhas, (Risi et al., 2003; Tell, 2005) incluindo pinguins (Nakeeb et al., 1981; Xavier et al., 2007). De fato, alguns desses sinais já foram descritos em animais que chegaram ao CRAM-FURG e morreram por aspergilose durante a reabilitação. A apresentação de inapetência e regurgitação pode ser considerada um fator contribuinte para o menor ganho de peso e até mesmo a perda de peso do grupo caso em relação ao grupo controle.

Em relação ao hematócrito (Ht) o valor médio na chegada dos animais ao CRAM-FURG, correspondente a primeira coleta, foi de 38% e 44% nos grupos caso e controle, respectivamente. No grupo de pinguins com aspergilose foi detectado um declínio progressivo na curva dos valores de Ht ao longo do período de reabilitação, os quais permaneceram abaixo do limite inferior de referência para a espécie ($42\% \pm 4\%$) (Hawkey et al., 1989) desde o 21º dia de cativeiro, correspondendo a terceira coleta. Este perfil diferiu significativamente do grupo controle, no qual a média de Ht tendeu a baixar entre a primeira e segunda coleta, estabilizando-se a partir da segunda coleta (14 dias) e mantendo-se dentro do padrão de referência em todas as coletas (Figura 3).

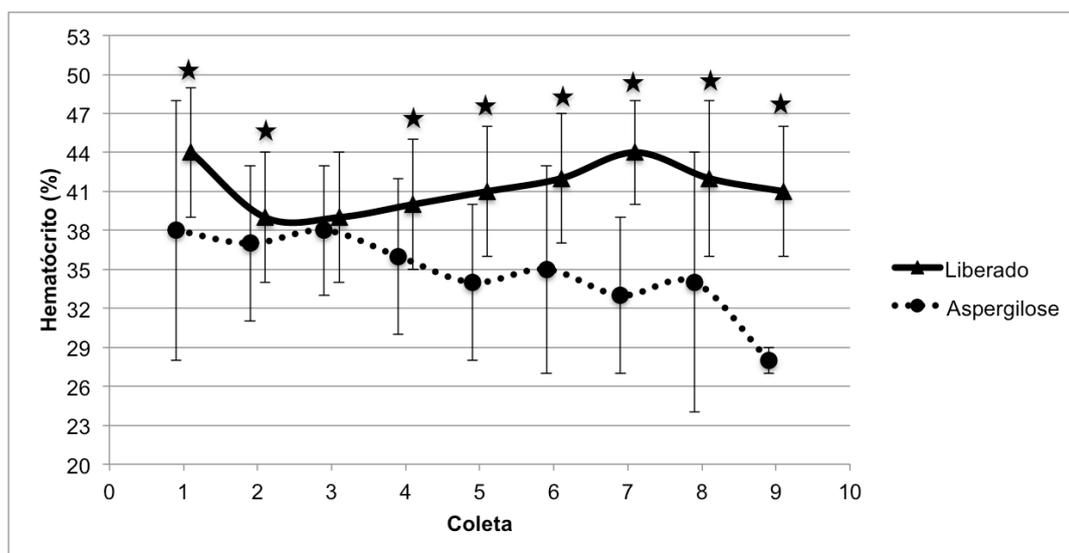


Figura 3 - Média de hematócrito dos pinguins ao longo da reabilitação, comparando o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) * $P < 0,05$.

A queda progressiva da média dos valores de Ht da terceira coleta até o desfecho no grupo caso ocorre provavelmente devido à produção e liberação de hemolisinas pelo *Aspergillus* sp. durante a infecção, as quais são responsáveis por lise das hemácias e consequente anemia, o que já foi relatado para aves com

aspergilose, principalmente na forma crônica da doença (Beernaert et al., 2010; Jones; Orosz, 2000).

Estudo recente realizado por Black et al. (2013) também demonstrou queda do hematócrito em *Eudromia elegans* (martinetas) com aspergilose quando comparadas com indivíduos saudáveis. Em contrapartida, diferença significativa nos valores de Ht não foi encontrada em *Anas platyrhynchos* (pato-real) e *Tadorna cana* (tardona-do-cabo) infectadas por *Aspergillus* quando comparados com indivíduos saudáveis (Graczyk et al. 1998), indicando que este parâmetro pode variar de acordo com a espécie de ave, provavelmente devido a diferença de suscetibilidade a infecção por *Aspergillus* spp. (Asakura et al., 1962).

A primeira coleta de dados de PPT demonstrou um valor médio similar, de 6,4 g/dL e 6 g/dL, entre os grupos caso e controle, respectivamente. No entanto, na análise da curva, o grupo com aspergilose apresentou aumento progressivo desses valores durante toda a reabilitação, alcançando um valor médio de 10,3 g/dL na nona coleta, diferindo significativamente do grupo controle no qual a partir da sexta coleta os valores permaneceram praticamente estabilizados em 7,9 a 8 g/dL (Figura 4).

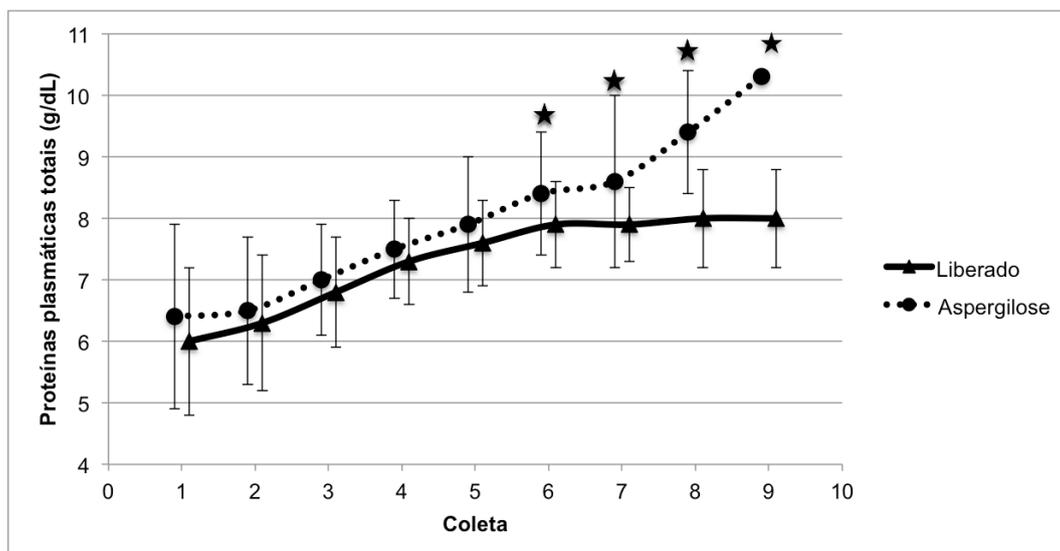


Figura 4 - Média de proteínas plasmáticas totais dos pinguins ao longo da reabilitação, comparando o grupo caso (aspergilose) e o grupo controle (animais liberados) * $P < 0,05$.

No grupo caso, as PPT continuaram em elevação durante a reabilitação, o que pode estar relacionado a produção de imunoglobulinas pelo hospedeiro, que se caracterizam como um grande aliado no combate à aspergilose em organismos imunocompetentes (Beernaert et al., 2010). O aumento de imunoglobulinas durante um quadro de aspergilose já foi comprovado em martinetas (Black et al., 2013) e em diversas outras espécies de aves (Cray et al., 2009). De fato, testes sorológicos buscando detectar anticorpos específicos para a doença são indicados como métodos diagnósticos da aspergilose em aves, comprovando o estímulo da resposta humoral durante um quadro infeccioso por *Aspergillus* spp (Graczyk et al., 1998; Tell, 2005).

O incremento significativo nos valores de PPT dos pinguins com aspergilose foi observado cerca de 15 dias após o início da alteração significativa na curva de Ht e de ganho de peso desses animais, que ocorreu a partir da terceira coleta de dados. Esse dado contribui com a suposição de que o aumento nos valores de PPT encontrado no grupo caso do presente estudo está relacionado a um aumento das

globulinas, assim como descrito por Black et al. (2013). E, pode ser atribuído à produção de anticorpos específicos para a infecção, os quais geralmente são detectados em alta concentração na circulação sanguínea somente a partir de uma a duas semanas do decorrer do processo infeccioso (Shoham; Levitz, 2005).

Protocolos de reabilitação indicam a utilização da avaliação de valores de hematócrito, proteínas plasmáticas totais e medidas de peso como critérios para liberação de pinguins-de-Magalhães (Ruoppolo et al., 2004). Neste trabalho observa-se que estes parâmetros também podem ser utilizados como indicadores de animais potencialmente infectados, uma vez que o resultado das curvas geradas a partir das análises mostraram diferenças pontuais no grupo de pinguins com aspergilose quando comparado com animais sadios.

CONCLUSÃO

Spheniscus magellanicus com aspergilose durante a reabilitação apresentam um perfil de menor ganho de peso corpóreo, declínio progressivo da curva do hematócrito, e aumento significativo das proteínas plasmáticas totais após 15 dias do início da queda do Ht e do ganho de peso neste grupo, quando comparados com animais hígidos. O estabelecimento desse perfil em pinguins com aspergilose pode servir como indicativo de mau prognóstico destes animais em cativeiro, e como parâmetro para início de terapia preemptiva ou de investigação diagnóstica mais específica.

REFERÊNCIAS

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*, 2003. Disponível em <http://www.aspergillus.org.uk>. Acesso em: 23/mar/2005.
- ASAKURA, S.; NAKAGAWA, S.; MASUI M. Immunological Studies Of Aspergillosis In Birds. **Research Institute for Microbial Diseases**, v. 18, n. 7, p. 249 – 256, 1962.
- AINSWORTH, G.C.; REWELL, R.E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.59, p.213-224, 1949.
- BEERNAERT, L. A.; PASMANS, F.; VAN WAEYENBERGHE, L. et al. Aspergillus infections in birds: a review. **Avian Pathology**, v.39, n. 5, p. 325-331, 2010.
- BEYTUT, E.; ÖZCAN, K; ERGINSOY, S. Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.52, n.1, p.71-84, 2004.
- BLACK, P. A.; MACEK, M.; TIEBER, A. et al. Reference values for hematology, plasma biochemical analysis, plasma protein electrophoresis and *Aspergillus* serology in elegant-crested tinamou (*Eudromia elegans*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 27, n. 1, p.1-6, 2013.
- CARRASCO, L.; LIMA Jr., J. S.; HALFEN, D. C. et al. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.551-554, 2001.
- CRAY, C.; WATSON, T.; RODRIGUEZ, M. et al. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n.1, p. 64–70, 2009.
- CRISSEY, S.; MCGILL, P.; SLIFKA, K. [2002]. Penguins: Nutrition and Dietary Husbandry. Disponível em: <http://www.nagonline.net/husbandry/Diets%20pdf/Penguin%20Nutrition.pdf> > Acesso em 15/10/2011.
- DAVIDOW, E. B.; JOSLIN, J.; COLLINS, D. M. et al. Serial *Aspergillus* antibody levels and serum protein electrophoresis as a diagnostic and treatment monitoring technique in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). **Proceedings American Association Of Zoo Veterinarians**, p. 31-35, 1997.
- FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. **Veterinary Record**, v.126, n.4, p.81-85, 1990.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; KLEIN, P.N. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive Aspergillosis. **Mycopathologia**, v.140, p.121-127, 1998.
- HAWKEY, C. M.; HORSLEY, D. T.; KEYMER, I. F. Haematology of wild penguins (sphenisciformes) in the falkland islands. **Avian Pathology**, v.18, p.495-502, 1989.
- JONES, M. P.; OROSZ, S. E. The diagnosis of aspergillosis in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 2, p. 52-58, 2000.

KHAN Z.U, PAL M, PALIWAL D.K. et al. Aspergillosis in imported penguins. **Sabouraudia**. 1977; 15: 43-45.

MARTINS, A. M.; SILVA-FILHO; R. P.; XAVIER, M. O. et al. Blood parameters and measurements of weight in the rehabilitation of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*, Foster 1781). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2015, *in press*.

NAKEEB, S. M.; BABUS, S. B.; CLIFTON, A. Y. Aspergillosis in the Peruvian penguin (*Spheniscus humboldti*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, v.12, p.51–54, 1981.

RISI, E.; THARY, V.; ARNÉ, P. et al. Aspergillosis of Seabirds in Captivity. In: INTERNATIONAL EFFECTS OF OIL ON WILDLIFE CONFERENCE, 7., 2003, Hamburg. **Proceedings of the 7th International Effects of Oil on Wildlife Conference Hamburg, Germany**, 2003 p. 14. -16.

RUOPPOLO, V.; ADORNES, A. C.; NASCIMENTO, A. C. et al. Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, ano IX, n.51, p.78-83, 2004.

RUSSEL, M.; HOLCOMB, J.; BERKNER, A. 30-Years of Oiled Wildlife Response Statistics. **Proceedings of the 7th International Effects of Oil and Wildlife Conference Hamburg, Germany**, p.1-18, 2003.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M..The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 569-582, 2005.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (Pinguim). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.: **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo, SP: Roca, 2014. v.1 p.384-416.

TELL, L. A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**, v.43, p.71-73, 2005.

XAVIER M.O, SOARES M.P, CABANA A.L. et al. Clinical and pathological findings of aspergillosis in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n. 3, p. 520-524, 2011.

XAVIER, M.O.; SOARES, M. P. ; MEINERZ, A. R. et al. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.480-484, 2007.

4 Considerações Finais

Pinguins com aspergilose diferiram significativamente do grupo controle em todos os parâmetros analisados.

- Pinguins com aspergilose ganham menos peso ao longo da reabilitação quando comparados com animais sadios, com tendência a estabilização ou declínio no ganho de peso médio a partir de 21 dias em reabilitação no CRAM-FURG.

- O hematócrito médio de pinguins com aspergilose apresenta declínio a partir do 21º dia de reabilitação no CRAM-FURG, permanecendo abaixo do valor de referência para esta espécie até seu desfecho. Diferentemente de animais saudáveis, os quais apresentam hematócrito médio estável a partir dos 14 dias de reabilitação, estando dentro do valor de referência para a espécie em todas as coletas.

- A média de proteínas plasmáticas totais dos pinguins com aspergilose apresentou aumento progressivo ao longo de todas as coletas, passando a diferir significativamente do grupo de pinguins sadios, desde a sexta até a nona coleta, atingindo valor médio máximo de 10,3g/dL.

- A diferença na média de peso e hematócrito dos pinguins com aspergilose começaram a aparecer após 21 dias de cativeiro, e a diferença na média das proteínas plasmáticas totais, para este grupo começou a surgir 15 dias após as mudanças significativas de peso e hematócrito.

Referências

AGUILAR R.F & REDIG P.T. Diagnosis and treatment of avian aspergillosis. In: Bonagura JD, Kirk R, editors. **Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice XII**. Philadelphia: Saunders, 1995.

ASAKURA, S.; NAKAGAWA, S.; MASUI M. Immunological Studies Of Aspergillosis In Birds. **Research Institute for Microbial Diseases**, v. 18, n. 7, p. 249 – 256, 1962.

AINSWORTH G.C.; AUSTWICK P.K.C. Mycotic abortion. In: **Fungal Diseases of Animals**. 2^a ed. Commonwealth Agriculture Bureaux, Farnham Royal, Slough, England, 1973. p 74-80.

AINSWORTH, G.C.; REWELL, R.E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.59, p.213-224, 1949.

ANDREATTI FILHO, R.L. Enfermidades micóticas, In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.369-375.

ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*, 2003. Disponível em <http://www.aspergillus.org.uk>. Acesso em: 23 mar. 2005.

BAUCK L. Mycoses. In: RITCHIE BW, HARRISON GJ, HARRISON LR. **Avian Medicine: Principles and Application**, Florida: Wingers Publishing, 1994, p. 997-1006.

BECHERT, U.; CHRISTENSEN, J. M.; POPPENG, R. LE, H.; WYATT, J.; SCHMITT, T. Pharmacokinetics of orally administered terbinafine in African penguins (*Spheniscus demersus*) for potential treatment of aspergillosis. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**. v. 41, n. 2, p. 263-74, 2010.

BEERNAERT, L. A.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; MARTEL, A. Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Avian Pathology**, n. 5, p.545–549, 2008.

BEERNAERT, L. A.; PASMANS, F.; VAN WAEYENBERGHE, L.; DORRESTEIN, G. M.; VERSTAPPEN, F.; VERCAMMEN, F.; HAESEBROUCK, F.; MARTEL, A. Avian *Aspergillus fumigatus* Strains Resistant to both Itraconazole and Voriconazole. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.53, n. 5, p. 2199-2201, 2009.

BEYTUT, E.; ÖZCAN, K; ERGINSOY, S. Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.52, n.1, p.71-84, 2004.

BLACK, P. A.; MACEK, M.; TIEBER, A.; WEBER, M. Reference values for hematology, plasma biochemical analysis, plasma protein electrophoresis and *Aspergillus* serology in elegant-crested tinamou (*Eudromia elegans*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 27, n. 1, p.1-6, 2013.

BOERSMA, P. Dee. Penguins as marine sentinels. **BioScience** , v.58, n.7, p.597-607, 2008.

BUNTING, E. M.; MADI, N. A.; COX, S.; MARTIN-JIMENEZ, T.; FOX, H.; KOLLIAS, G. Evaluation of Oral Itraconazole Administration in Captive Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 3, p. 508-518, 2009.

BURCO, J. D.; ETIENNE K. A.; MASSEY J.G.; ZICCARDI M. H.; BALAJEE S. A. Molecular sub-typing suggests that the environment of rehabilitation centers may be a potential source of *Aspergillus fumigatus* infecting rehabilitating seabirds. **Medical Mycology**, v.50, p. 91-98, 2012.

BURCO, J. D.; ZICCARDI, M. H.; CLEMONS, K. V.; TELL, L. A. Evaluation of Plasma (1→3) β-D-glucan Concentrations in Birds Naturally and Experimentally Infected with *Aspergillus fumigatus*. **Avian Disease**, v. 56, n.1, p. 183-191, 2012.

CABANA, A.L; XAVIER, M.O; OSÓRIO, L.G; SOARES, M.P; SILVA-FILHO, R.P; MADRID, I.M; FARIA, R.O; MEIRELES, M.C.A. Alterações anatomo-patológicas da aspergilose em pinguins. In: XVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/UFPel, 2007. Pelotas.

CAMPBELL, Terry. W. Hematology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, L.R.: **Avian Medicine: Principles e Application**. Florida: Wingers Publishing, 1994. p.176-198.

CARRASCO, L.; LIMA Jr., J.S.; HALFEN, D.C.; SALGUERO, F.J.; SANCHEZ-CORDÓN, P.; BECKER, G. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.551-554, 2001.

CRAY, Carolyn. Diagnosis of Aspergillosis in Avian Species. In: MILLER, E. R.; FOWLER, M. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. St Louis: Elsevier Saunders, 2012. p. 336-342.

CRAY, C.; WATSON, T.; RODRIGUEZ, M.; ARHEART, K. L. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n.1, p. 64–70, 2009.

CRISSEY, S.; MCGILL, P.; SLIFKA, K. Penguins: Nutrition and Dietary Husbandry. 2002, 19pp. Disponível em:
<<http://www.nagonline.net/husbandry/Diets%20pdf/Penguin%20Nutrition.pdf> >
Acesso em: 15 out. 2011.

DAVIDOW, E. B.; JOSLIN, J.; COLLINS, D. M.; HARRIS, E. Serial *Aspergillus* antibody levels and serum protein electrophoresis as a diagnostic and treatment monitoring technique in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). **Proceedings American Association Of Zoo Veterinarians**, p. 31-35, 1997.

DI SOMMA, A., BAILEY, T., SILVANOSE, C.; GARCIA-MARTINEZ, C. The Use of Voriconazole for the Treatment of Aspergillosis in Falcons (*Falco* Species). **Journal of Avian Medicine Surgery**, v. 21, n. 4, p. 307-316, 2007.

FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. **Veterinary Record**, v.126, n.4, p.81-85, 1990.

FRIEND, Milton. Aspergillosis In: Field Manual of Wildlife Diseases: **Birds**. 1999, p. 129-134.

GARCÍA-BORBOROGLU, P., BOERSMA, P. D., REYES, L., SKEWGAR, E. Petroleum Pollution and Penguins: Marine Conservation Tools to Reduce the Problem. In: HOFER, T.N. **Marine Pollution: New Research**. New York: Nova Science, 2008, p. 339-356.

GERMAN, Alisson. **Avian Aspergillosis**. Langford School of Veterinary Science, Bristol University. 2000. 13p.

GHEBREMESKEL, K.; WILLIAMS, G.; KEYMER, I. F. et al. Plasma chemistry of Rockhopper (*Eudyptes crestatus*), Magellanic (*Spheniscus magellanicus*), and Gentoo (*Pygoscelis papua*) wild penguins in relation to molt. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.92A, n.1, p. 43-47, 1989.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; KLEIN, P.N. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive Aspergillosis. **Mycopathologia**, v.140, p.121-127, 1998.

HARR, Kendal. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n.3, 140-151, 2002.

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

HEREDIA, S. A. R.; ALVAREZ, C. K.; LOUREIRO, J. D. **Aves Marinas Empetroladas: guia para su manejo y atención**. 1ª. ed. San Clemente: Fundacion Mundo Marino, 2008. 139p.

IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 27 Nov. 2014.

JONES, M. P.; OROSZ, S. E. The diagnosis of aspergillosis in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 2, p. 52-58, 2000.

KHAN, Z.U; PAL, M.; PALIWAL, D.K.; DAMODARAM, V.N. Aspergillosis in imported penguins. **Sabouraudia**. 1977; 15: 43-45.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9 ed. São Paulo – SP: Sarvier, 2002, 1104p.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LEWIS, R.E.; WIEDERHOLD, N.P.; CHI, J.; HAN, X.Y.; KOMANDURI, K.V.; KONTOTIANNIS, D.P.; PRINCE, R.A.. Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p. 635-637, 2005.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3.ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.107 p.

LORENZI, T. F. Introdução à fisiologia hematológica. In: AIRES, M. M.: **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 101- 124.

MARTINS, A. M.; SIIVA-FILHO; R. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; ROBALDO, R. B. Blood parameters and measurements of weight in the rehabilitation of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*, Foster 1781). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2015, *in press*.

NAKEEB, S. M.; BABUS, S. B.; CLIFTON, A. Y. Aspergillosis in the Peruvian penguin (*Spheniscus humboldti*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, v.12, p.51–54, 1981.

NARDONI S. Aspergillosis in *Larus cachinnans micaellis*: Survey of eight cases. **Mycopathologia**, v.161, p. 317–321, 2006.

OILED WILDLIFE CARE NETWORK. Protocols for the care of oil-affected birds. Davis: Wildlife Health Center, School of Veterinary Medicine, University of Califórnia, 2000. 75p.

OKABAYASHI, K.; IMAJI, M.; OSUMI, T.; MURAKAMI, Y.; MARUYAMA, H.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. Antifungal Activity of Itraconazole and Voriconazole against Clinical Isolates Obtained from Animals with Mycoses. **Japanese Journal Medical Mycology**, v. 50, p. 51-54, 2009.

PERLROTH, J; CHOI, B & SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections : epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycololy**, v. 45, p. 321-46, 2007.

QUINN P.J, CARTER M.E, MARKEY B.K, CARTER G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965, 686p.

REDIG P.T. Fungal diseases. In: SAMOUR J., editor. **Avian medicine**, London: Mosby, 2000.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; BOSSCHE, H. V. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 31-53, 2003.

RODRIGUES, S. C.; ADORNES, A. C.; SANTOS FILHO, E. A.; SILVA FILHO, R. P.; COLARES, E. P. Surviving Probability Indicators of Landing Juvenile Magellanic Penguins Arriving Along the Southern Brazilian Coast. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 53, n. 2, p. 419-424, 2010.

RUOPPOLO, V.; ADORNES, A. C.; NASCIMENTO, A. C.; SILVA-FILHO, R. P. A Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, ano IX, n.51, p.78-83, 2004.

RUSSEL, M.; HOLCOMB, J.; BERKNER, A. 30-Years of Oiled Wildlife Response Statistics. **Proceedings of the 7th International Effects of Oil and Wildlife Conference** Hamburg, Germany, p.1-18, 2003.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA-FILHO, Rodolfo Pinho da; RUOPPOLO, Valeria. Sphenisciformes (Pinguim). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.: **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo, SP: Roca, 2014. v.1 p.384-416.

SILVANOSE, C. D.; BAILEY, T. A.; DI SOMMA, A. Susceptibility of fungi isolated from the respiratory tract of falcons to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. **Veterinary Record**, v.159, p. 282-284, 2006.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M..The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 569-582, 2005.

TELL, L. A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**, v.43, p.71-73, 2005.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M; KANASHIRO, A.M.I.; ZANATTA, G.F. Prevalência de aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.1, p.75-77, 2004.

VANSTREELS, Ralph Eric Thijl; PARSONS, Nola Jane. Malária Aviária e outros Hemosporídeos Aviários. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.: **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo, SP: Roca, 2014. v.2 p. 1427-1443.

WILLIAMS, T. **Bird families of the world – The Penguins**. New York: Oxford University Press, 1995, 352p.

XAVIER, Melissa Orzechowski; MADRID, Isabel Madrid. Doenças Fúngicas em Aves. In : CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.: **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo, SP: Roca, 2014. v.2 p. 1399-1410.

XAVIER, M. O.; MEINERZ, A. R.; CLEFF, M. B.; OSÓRIO, L. G.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.; SILVA-FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. Eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p.873-877, 2008.

XAVIER M.O, SOARES M.P, CABANA A.L, SILVA-FILHO R.P, RUOPPOLO V, MEIRELES M.C.A, SEVERO L.C. 2011. Clinical and pathological findings of aspergillosis in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n. 3, p. 520-524, 2011.

XAVIER, M.O.; SOARES, M. P. ; MEINERZ, A. R. ; NOBRE, N. O. ; OSÓRIO, L. G. ; SILVA-FILHO, R. P. ; MEIRELES, M. C. A. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.480-484, 2007.

XAVIER, Melissa Orzechowski; FARIA, Renata Osório. Aspergilose. In: MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Ed. UFPEL, 2009. p. 205 – 223.

YORIO, P.; GARCIA BORBOROGLU, P.; POTT, J.; MORENO, J. Breeding Biology of Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Golfo San Jorge, Patagonia, Argentina. **Marine Ornithology**, n. 29, p. 75–79, 2001.

Anexos

Anexo 1 Normas da Revista Archives of Veterinary Science

Diretrizes para Autores

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

O periódico **ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE** (AVS) é publicado trimestralmente, sob orientação do seu Corpo Editorial, com a finalidade de divulgar artigos completos e de revisão relacionados à ciência animal sobre os temas: clínica, cirurgia e patologia veterinária; sanidade animal e medicina veterinária preventiva; nutrição e alimentação animal; sistemas de produção animal e meio ambiente; reprodução e melhoramento genético animal; tecnologia de alimentos; economia e sociologia rural e métodos de investigação científica. A publicação dos artigos científicos dependerá da observância das normas editoriais e dos pareceres dos consultores “ad hoc”. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e os conceitos e/ou patentes emitidos nos artigos, são de inteira responsabilidade dos autores, eximindo-se o periódico de quaisquer danos autorais. A submissão de artigos deve ser feita diretamente na página da revista (www.ser.ufpr.br/veterinary). Mais informações são fornecidas na seção “Informações sobre a revista”.

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Para agilizar a tramitação e publicação de seu artigo, recomendamos fortemente que as normas sejam obedecidas, inclusive para as referências

1. Digitação: O artigo com no máximo vinte e cinco páginas deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297 mm, com margens laterais direita, esquerda, superior e inferior de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas de forma progressiva no canto superior direito. Deverá ser utilizado fonte arial 12 em espaço duplo; em uma coluna. Tabelas e Figuras com legendas serão inseridas diretamente no texto e não em folhas separadas.

3. Tabelas: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte superior da tabela em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título. (Ex.: Tabela 1 – Título.). As abreviações devem ser descritas em notas no rodapé da tabela. Estas serão referenciadas por números sobrescritos (1,2,3). Quando couber, os cabeçalhos das colunas deverão possuir as unidades de medida. Tanto o título quanto as notas de rodapé devem fazer parte da tabela, inseridos em "linhas de

tabela".

4. Figuras: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte inferior da figura em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título (Ex.: Figura 1 – Título). As designações das variáveis X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. São admitidas apenas figuras em preto-e-branco. **Figuras coloridas terão as despesas de clicheria e impressão a cores pagas pelo autor.** Nesse caso deverá ser solicitada ao Editor (via ofício) a impressão a cores.

NORMAS EDITORIAIS

Artigo completo - Deverá ser inédito, escrito em idioma português (nomenclatura oficial) ou em inglês. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Nota informando aprovação por Comitê de Ética (quando houver); Referências.

ESTRUTURA DO ARTIGO

TÍTULO - em português, centralizado na página, e com letras maiúsculas. Logo abaixo, título em inglês, entre parêntesis e centralizado na página, com letras minúsculas e itálicas. Não deve ser precedido do termo título.

RESUMO - no máximo 1800 caracteres incluindo os espaços, em língua portuguesa. As informações devem ser precisas e sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço duplo. Deve ser precedido do termo "Resumo" em caixa alta e negrito.

PALAVRAS-CHAVE – inseridas abaixo do resumo. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título, e alinhado a esquerda. Não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo "Palavras-chave" em caixa baixa e negrito.

ABSTRACT - deve ser redigido em inglês, refletindo fielmente o resumo e com no máximo 1800 caracteres. O texto deve ser justificado e digitado em espaço **duplo**, em parágrafo único. Deve ser precedido do termo "Abstract" em caixa alta e negrito.

KEY WORDS - inseridas abaixo do abstract. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título em inglês, e alinhado a esquerda. Não precisam ser traduções exatas das palavras-chave e não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Key words” em caixa baixa e negrito.

INTRODUÇÃO – abrange também uma breve revisão de literatura e, ao final, os objetivos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Introdução” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

MATERIAL E MÉTODOS - o autor deverá ser preciso na descrição de novas metodologias e adaptações realizadas nas metodologias já consagradas na experimentação animal. Fornecer referência específica original para todos os procedimentos utilizados. Não usar nomes comerciais de produtos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra do termo “Material e Métodos” (escrito em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

RESULTADOS (O item Resultados e o item Discussão podem ser apresentados juntos, na forma RESULTADOS e DISCUSSÃO, ou em itens separados)

o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Resultados” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Símbolos e unidades devem ser listados conforme os exemplos: Usar **36%**, e não 36 % (não usar espaço entre o no e %); Usar **88 kg**, e não 88Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo); Usar **42 mL**, e não 42 ml (litro deve vir em L **maiúsculo**, conforme padronização internacional); Usar **25oC**, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC); Usar (**P<0,05**) e não ($p < 0,05$); Usar **$r^2 = 0,89$** e não $r^2=0,89$; Nas tabelas inserir o valor da probabilidade como “valor de P”; Nas tabelas e texto utilizar média \pm desvio padrão (15,0 \pm 0,5). Devem ser evitadas abreviações não-consagradas, como por exemplo: “o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6”. Este tipo de redação é muito cômodo para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor. Escreva os resultados e apresente suporte com dados. Não seja redundante incluindo os mesmos dados ou resultados em tabelas ou figuras.

DISCUSSÃO - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Discussão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Apresente a sua interpretação dos seus dados. Mostre a

relação entre fatos ou generalizações reveladas pelos seus resultados. Aponte exceções ou aspectos ainda não resolvidos. Mostre como os seus resultados ou interpretações concordam com trabalhos previamente publicados ou discordam deles, mas apresente apenas trabalhos originais, evitando citações de terceiros. Discuta os aspectos teóricos e/ou práticos do seu trabalho. Pequenas especulações podem ser interessantes, porém devem manter relação factual com os seus resultados. Afirmarções tais como: "Atualmente nós estamos tentando resolver este problema..." não são aceitas. Referências a "dados não publicados" não são aceitas. Conclua sua discussão com uma curta afirmação sobre a significância dos seus resultados.

CONCLUSÕES - preferencialmente redigir a conclusão em parágrafo único, baseada nos objetivos. Devem se apresentar de forma clara e sem abreviações. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Conclusão" (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

AGRADECIMENTOS - os agradecimentos pelo apoio à pesquisa serão incluídos nesta seção. Seja breve nos seus agradecimentos. Não deve haver agradecimento a autores do trabalho. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Agradecimento" (escrita em caixa baixa).

NOTAS INFORMATIVAS - quando for o caso, antes das referências, deverá ser incluído parágrafo com informações e número de protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética e ou Biossegurança. (quando a Comissão de Ética pertencer à própria instituição onde a pesquisa foi realizada, deverá constar apenas o número do protocolo).

REFERÊNCIAS - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Referências" (escrita em caixa alta e negrito). Omitir a palavra bibliográficas. Alinhada somente à esquerda. Usar como base as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 10520 (NB 896) - 08/2002). Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Os destaques deverão ser em NEGRITO e os nomes científicos, em ITÁLICO. NÃO ABREVIAR O TÍTULO DOS PERIÓDICOS. Indica-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. Mencionam-se os autores separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples e formatá-las segundo

as seguintes instruções: no menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... ESPAÇAMENTO...ANTES...6 pts.**Exemplo de como referenciar:**

ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

(citar os 3 primeiros autores seguido de "et al.")

JOCHLE, W.; LAMOND, D.R.; ANDERSEN, A.C. et al. Mestranol as an abortifacient in the bitch. **Theriogenology**, v.4, n.1, p.1-9, 1975.

Livros e capítulos de livro. Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.l.: s.n.].

REFERÊNCIA DE LIVROS (*in totum*):

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Small animal practice**. Philadelphia : W.B. Saunders, 1997. 1467 p.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo com autoria)

SMITH, M. Anestrus, pseudopregnancy and cystic follicles. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986, Cap.x, p.585-586.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo sem autoria)

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4., p.72-90.

OBRAS DE RESPONSABILIDADE DE UMA ENTIDADE COLETIVA: A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

REFERÊNCIA DE TESE/DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA:

BACILA, M. **Contribuição ao estudo do metabolismo glicídico em eritrócitos de animais domésticos**. 1989. Curitiba, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIA DE PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS:

KOZICKI, L.E.; SHIBATA, F.K. Perfil de progesterona em vacas leiteiras no período do puerpério, determinado pelo radioimunoensaio (RIA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIV., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 106-107.

RESTLE, J.; SOUZA, E.V.T.; NUCCI, E.P.D. et al. Performance of cattle and buffalo fed with different sources of roughage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.301-303.

REFERÊNCIA DE ARTIGOS DE PERIÓDICOS ELETRÔNICOS: Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão “Disponível em: xx/xx/xxxx” e a data de acesso do documento, precedida da expressão “Acesso em: xx/xx/xxxx.”

PRADA, F.; MENDONÇA Jr., C. X.; CARCIOFI, A. C. [1998]. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/> Acesso em: 05/09/2000.

MÜELLER, Suzana Pinheiro Machado. A comunicação científica e o movimento de acesso livre ao conhecimento. *Ciência da Informação*, Brasília, v. 35, n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 13/05/2007.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral em ruminantes**. Disponível em: http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf. Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URPE, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônico...** Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21/01/1997.