

## Eletroforese das proteínas plasmáticas em emas (*Rhea americana*) de diferentes faixas etárias

### Electrophoretic plasma protein profile in rhea (*Rhea americana*) of different age groups

Alexandre de Carvalho Conrado<sup>I</sup> Sonia Terezinha dos Anjos Lopes<sup>II</sup> Danieli Brolo Martins<sup>I</sup>  
Marta Frescura Duarte<sup>III</sup> Antonio Carlos Mortari<sup>IV</sup> Maristela Lovato Flores<sup>V</sup>  
Luciane Barasuól<sup>VI</sup>

#### RESUMO

A rheacultura vem crescendo em todo o Brasil. Porém, ainda há uma escassez de informações sobre esta espécie e de médicos veterinários especializados na área. Este trabalho teve como objetivo verificar as diferenças existentes na eletroforese plasmática (gel de agarose) em idades distintas de emas (*Rhea americana*). Utilizaram-se 45 emas, separadas em quatro grupos: grupo 1 (n=10), animais com 15 dias de idade; grupo 2 (n=10), animais com 30 dias; grupo 3 (n=10), animais com 45 dias e grupo 4 (n=15), animais com 1 ano. Verificou-se homogeneidade nos valores eletroforéticos analisados nas aves dentro de cada faixa etária. Houve diferença entre grupos etários em valores de proteína plasmática total, albumina, globulinas e relação albumina/globulinas. Também houve diferença entre grupos para as frações  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  e  $\bar{a}$ . Os resultados encontrados demonstram que o perfil eletroforético de emas sofre variações conforme a idade analisada. Dessa forma, exige-se maior atenção por parte do médico veterinário quanto à interpretação desse tipo de exame conforme a idade da ave. Os parâmetros obtidos neste estudo indicam divergência de valores quando comparados com os de outras espécies aviárias, evidenciando a importância de se conhecer tais valores nesta espécie.

**Palavras-chave:** eletroforese, plasma, *Rhea americana*, idade.

#### ABSTRACT

Breeding of rheas has been growing throughout Brazil. However, there is still lack of information about this species and of professionals specialized in the area. This study was aimed at verifying the differences in plasmatic electrophoresis

(agarosis gel) at different ages of rheas (*Rhea americana*). Forty-five rheas were separated into 4 groups: group 1: (n=10), 15 day old animals; group 2: (n=10), 30 day old animals; group 3: (n=10), 45 day old animals; group 4: (n=15), 1 year old animals. The electrophoretic values analyzed presented homogeneity within each age group. There were differences between different age groups in the values of total plasmatic protein, albumin, globulins and the albumin/globulin relation. There was also a difference between age groups for fractions  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  and  $\bar{a}$ . These results demonstrated that the electrophoretic profile of rheas undergoes variations according to the age analyzed. Therefore, more attention, is needed by the professionals in the interpretation of this type of examination. The parameters obtained from this study show a divergence of values, when compared to from those obtained from other avian species, showing up the importance of understanding these values in this species.

**Key words:** electrophoresis, plasma, *Rhea americana*, age.

#### INTRODUÇÃO

A criação de emas (rheacultura) está aumentando no Brasil. Estes animais representam mais uma alternativa para o mercado de carne vermelha (CARRER, 2000). Na área de patologia aviária, ocorrem muitas vezes dificuldades em se estabelecer um diagnóstico rápido junto aos produtores. O perfil eletroforético das proteínas plasmáticas não fornece

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>II</sup>Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: sonia@smail.ufsm.br. Autor para correspondência.

<sup>III</sup>Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, RS, Brasil.

<sup>IV</sup>Colégio Agrícola, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>V</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>VI</sup>Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

informações específicas, mas é útil no diagnóstico quando seus valores são analisados e associados ao quadro clínico e à anamnese. É importante para o diagnóstico, o prognóstico e a avaliação do curso de algumas enfermidades (ROSSKOPF & WOERPEL, 1984; HOCHLEITHNER, 1994; KANEKO, 1997). Algumas condições comuns em que a eletroforese se torna útil como auxílio diagnóstico incluem infecções, neoplasias, intoxicações, distúrbios comportamentais e doenças nutricionais (TATUM et al., 2000).

A idade pode influenciar na interpretação diagnóstica de dados laboratoriais em aves (MCINNES et al., 1996; VILLOUTA et al., 1997; LUMEIJ, 1997). MONTESINOS et al. (1997) citaram que as variações nos valores bioquímicos, de acordo com a idade, já ocorrem desde os primeiros meses de vida. As proteínas totais são influenciadas por este fator (VERSTAPPEN, 2002).

Na fase adulta, antes da ovipostura, as proteínas totais aumentam, sendo possível sua indução por estrógeno, o que eleva as frações globulínicas. A concentração de albumina também pode estar moderadamente aumentada (LUMEIJ, 1987; HARR, 2002). Assim, as fêmeas ovíparas podem ter um decréscimo fisiológico na relação albumina/globulinas devido a uma hiperproteinemia composta por proteínas envolvidas na formação do ovo (LUMEIJ, 1997), sem que isso seja indicativo de doença (HARR, 2002).

Comparações de parâmetros eletroforéticos de amostras de soro e plasma mostraram variações sem significância, exceto pela fração de fibrinogênio (LUMEIJ & DeBRUIJE, 1985; LUMEIJ et al., 1990). Entretanto, neste estudo, deu-se preferência ao plasma, por este possuir o fibrinogênio, uma  $\beta$ -globulina, utilizada na avaliação de processos infecciosos e/ou inflamatórios em algumas espécies aviárias. O soro não inclui o fibrinogênio, sendo que, em amostras séricas, pode ser difícil a evidência de tais processos (ROSENTHAL, 2000). LUMEIJ et al. 1990), e LUMEIJ & MacLEAN (1996), demonstraram que a concentração de proteínas totais no plasma aviário é cerca de 1,5 a 1,7 g dL<sup>-1</sup> maior, se comparada com o soro, devido ao fibrinogênio.

A eletroforese plasmática mede as concentrações protéicas de albumina e globulinas ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  e  $\gamma$ ), sendo possível separar-se a fração  $\beta$  em componentes menores, mas a utilidade clínica disso não foi elucidada (ALTAN et al., 1997). A mensuração das proteínas plasmáticas totais (PPT) é um indicador útil do estado de saúde aviária (HOCHLEITHNER, 1994). A concentração das PPT nas aves é menor quando comparada à dos mamíferos, variando entre 2,5 e 6,0 g dL<sup>-1</sup> (CAMPBELL & DEIN, 1984; THRALL et al., 2004).

A pré-albumina é uma proteína produzida no fígado que tem função de transportar hormônios tireoidianos (T3 e T4) e vitamina A. Sua concentração pode variar notadamente entre as espécies aviárias, podendo representar de 10 a 75% da concentração de albumina total em aves jovens ou não ser encontrada em algumas espécies (CRAY & TATUM, 1998; CHANG et al., 1999).

A albumina representa 40 a 50% das PPT em aves. É sintetizada no tecido hepático e catabolizada por vários órgãos, sendo sua síntese influenciada pela nutrição, pelo balanço hormonal, pelo estresse e pela concentração extravascular (THRALL et al., 2004). O valor mínimo e máximo de referência de albumina é 1,2g dL<sup>-1</sup> e 3,2g dL<sup>-1</sup>, respectivamente, na maioria dos psitacídeos (ALTAN et al., 1997).

As  $\alpha$ -globulinas incluem as glicoproteínas, a haptoglobulina, a ceruloplasmina e a  $\alpha$ 2-macroglobulina. A transcortina ( $\alpha$  globulina) é a proteína de transporte primário da corticosterona no plasma das galinhas (CAMPBELL & COLES, 1986). Em doenças agudas e em fêmeas na fase reprodutiva, as frações protéicas  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 podem estar elevadas (ROSENTHAL, 2000). Em estudos com papagaios, LANE (1991) observou valores de  $\alpha$ 1: 0,05-0,32g dL<sup>-1</sup> e  $\alpha$ 2: 0,07-0,32g dL<sup>-1</sup>.

A fração  $\beta$  do ensaio eletroforético consiste em numerosas proteínas (hemopexina, ferritina, fibrinogênio, complemento e lipoproteínas) classificadas como proteínas de fase aguda (HOCHLEITHNER, 1994). Os valores mínimos e máximos de referência da fração  $\beta$  são de 0,1g dL<sup>-1</sup> e 0,57g dL<sup>-1</sup>, respectivamente, na maioria dos psitacídeos (ALTAN et al., 1997).

As proteínas da fração  $\gamma$  consistem, principalmente, em imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG e IgE). Estas são sintetizadas pelo sistema imunológico em resposta a estímulo antigênico (RATCLIFFE, 1996). Uma poligamopatia é indicativa de doenças inflamatórias crônicas em aves, especialmente quando associada com agentes infecciosos causadores de clamidiose, aspergilose e tuberculose (CRAY et al., 1995). Também foi evidenciado em doença linfoproliferativa crônica em galinhas (semelhante à leucose) e mielose em periquitos (HOCHLEITHNER, 1994). Aves que apresentam diminuição das  $\gamma$ -globulinas podem estar sofrendo processos de imunodeficiência (KANEKO, 1997). Na maioria dos psitacídeos, os valores mínimo e máximo de referência da fração  $\gamma$  são 0,1g dL<sup>-1</sup> e 0,57g dL<sup>-1</sup>, respectivamente (ALTAN et al., 1997).

Somente os psitacídeos e as aves de rapina possuem padrões eletroforéticos definidos, havendo

escassa informação sobre o assunto em emas. Em 2002, VERSTAPPEN et al. já sugeriram que maiores estudos bioquímicos deveriam ser feitos em função das possíveis diferenças de valores estabelecidos em grupos de aves de faixas etárias distintas. Sabendo-se que os valores eletroforéticos podem ser influenciados pela idade das aves, objetiva-se, com esta pesquisa, verificar as diferenças existentes na eletroforese em idades distintas de emas (*Rhea americana*).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 45 emas híbridas de criatório, localizado este no Colégio Agrícola da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Rio Grande do Sul. As aves foram separadas em quatro grupos, de acordo com as idades. Os grupos formados foram os seguintes: grupo 1 (G1)– emas de até 15 dias (n=10); grupo 2 (G2)– emas de 30 dias (n=10); grupo 3 (G3)– emas de 45 dias (n=10) e grupo 4 (G4)– emas de 1 ano (n=15).

As aves pertencentes ao G1, G2 e G3 receberam ração comercial com 18% de proteína bruta (mín) e as do G4 receberam ração comercial com 21% proteína bruta (mín), conforme a exigência nutricional por faixa etária. Todas as aves receberam água *ad libitum* durante todo o experimento.

Coletou-se de cada ave 2,0ml de sangue, sempre no período da manhã, por punção da veia jugular direita (G1 e G2) e punção da veia alar (G3 e G4) em tubo com anticoagulante heparina (amostra plasmática). As amostras sanguíneas foram encaminhadas ao Laboratório Veterinário de Patologia

Clínica da UFSM para separação do plasma. O sangue total foi colocado em banho-maria por 5 minutos, a 37°C, e submetido à centrifugação por 3 minutos a 2.500 rpm. As amostras plasmáticas foram armazenadas em *eppendorfs* e encaminhadas a um laboratório de análises clínicas particular no município de Santa Maria. Para mensurar a concentração das proteínas plasmáticas totais, utilizou-se o método de biureto, e, para albumina e frações das globulinas, a técnica da eletroforese.

A eletroforese foi feita em um meio suporte (gel de agarose) embebido em uma solução tampão de tris veronal (pH 8,6). Aplicou-se uma corrente elétrica de 220W ao meio depois de se submergir as extremidades do suporte no tampão. Após a migração, o gel foi secado, corado e escaneado por um densitômetro para produzir o traçado em bandas típico da eletroforese.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica 6.0. Foram empregados análise de variância e teste de Kruskal-Wallis para determinar as diferenças significativas entre as faixas etárias em emas, considerando-se significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através da técnica da eletroforese em diferentes idades de emas estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Não houve diferença estatística nos parâmetros analisados intragrupos. Houve diferença significativa entre os diferentes grupos etários em valores de PPT, albumina, globulinas e relação albumina/globulinas (Tabela 1). Também

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão da eletroforese plasmática, em gel de agarose, das proteínas totais (PPT), albumina, globulinas, e relação albumina/globulinas (A/G) de emas híbridas de diferentes faixas etárias.

Grupo (por idade)	PPT (g dL <sup>-1</sup> )	Albumina (g dL <sup>-1</sup> )	Globulinas (g dL <sup>-1</sup> )	A/G (g dL <sup>-1</sup> )
G1 (15 dias)	2,37±0,10 <sup>h, c*</sup>	1,32±0,06 <sup>h, c</sup>	1,05±0,07 <sup>b</sup>	1,26±0,08 <sup>a</sup>
G2 (30 dias)	2,2±0,08 <sup>c</sup>	1,21±0,09 <sup>c</sup>	0,99±0,07 <sup>b</sup>	1,23±0,16 <sup>a</sup>
G3 (45 dias)	3,42±0,13 <sup>a, b</sup>	1,61±0,15 <sup>a, b</sup>	1,81±0,08 <sup>a</sup>	0,89±0,10 <sup>b</sup>
G4 (1 ano)	4,45±0,27 <sup>a</sup>	2,55±0,22 <sup>a</sup>	1,9±0,22 <sup>a</sup>	1,36±0,22 <sup>a</sup>
Total	3,11	1,67	1,44	1,19

\* Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05; teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão da eletroforese plasmática, em gel de agarose, das frações  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -globulinas de emas híbridas de diferentes faixas etárias.

Grupo (por idade)	$\alpha_1$ (g dL <sup>-1</sup> )	$\alpha_2$ (g dL <sup>-1</sup> )	$\beta$ (g dL <sup>-1</sup> )	$\gamma$ (g dL <sup>-1</sup> )
G1 (15 dias)	0,14±0,05 <sup>b*</sup>	0,25±0,05 <sup>b</sup>	0,44±0,05 <sup>b</sup>	0,22±0,06 <sup>b</sup>
G2 (30 dias)	0,16±0,05 <sup>a, b</sup>	0,27±0,04 <sup>b</sup>	0,38±0,06 <sup>b</sup>	0,18±0,04 <sup>b</sup>
G3 (45 dias)	0,17±0,04 <sup>a, b</sup>	0,57±0,06 <sup>a</sup>	0,72±0,06 <sup>a</sup>	0,35±0,05 <sup>a</sup>
G4 (1 ano)	0,23±0,04 <sup>a</sup>	0,58±0,08 <sup>a</sup>	0,73±0,09 <sup>a</sup>	0,35±0,07 <sup>a</sup>
Total	0,17	0,42	0,57	0,28

\* Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis).

houve diferença entre alguns grupos etários em valores das frações  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Tabela 2).

Já que as frações protéicas possuem carga elétrica, tamanho e peso diferentes, estas migravam com diferentes velocidades no campo elétrico, possibilitando as separações. A albumina, sendo a menor molécula, migrou mais rapidamente, seguida da globulina  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

Existiram valores significativamente diferentes nas PPT e na albumina entre animais de G1 e G4. G2 também teve diferença significativa em relação a G3 e G4. Quanto às globulinas, G1 e G2 diferiram estatisticamente de G3 e G4. Alternativas possíveis para explicar esses valores poderiam ser uma exposição mais intensa a antígenos, com desenvolvimento da imunidade e uma melhor condição corporal dos animais no decorrer do tempo. MONTESINOS et al. (1997) estudaram 129 cegonhas brancas jovens e constataram um aumento gradativo nas PPT na albumina e nas globulinas de acordo com a idade, concordando com os resultados desta pesquisa.

Os valores de PPT encontrados nas emas de G1 e G2 foram semelhantes aos mensurados por KARESH et al. (1997) em estudos com araras peruanas; porém, os valores nas emas de G3 a G4 foram compatíveis aos mensurados por LANE (1991) e CLUBB et al. (1991) em papagaios, araras, cacatuas e tucano. Em estudos com falcões-peregrinos de vida livre, LANZAROT et al. (2001) observaram valor máximo (5,96 g/dL) superior aos encontrados nas emas do referido estudo. Aves de hábitos alimentares carnívoros normalmente apresentam valores de PPT mais elevados quando comparadas a espécies aviárias não-carnívoras.

LANE (1991) obteve valores de albumina em papagaios superiores aos encontrados nas emas,

sendo que as emas pertencentes ao G4 apresentaram média dentro da variação de referência para albumina nos papagaios; porém, o valor máximo encontrado em papagaios é superior ao valor máximo encontrado em G4. Para outros psitacídeos, CLUBB et al. (1991) e KARESH et al. (1997) determinaram valores semelhantes aos encontrados nas emas de G1, G2 e G3.

A pré-albumina foi observada em todas as emas pertencentes ao G1, concordando com LUMEIJ & OVERDUIN (1990) e LANE (1991), que a observaram em algumas espécies como, por exemplo, em psitacídeos. Ela também é conhecida em medicina humana como transtiretina (HARR, 2002). CHANG et al. (1999) isolaram e seqüenciaram esta fração em avestruzes, estando ligada à função da tireóide de aves em crescimento.

A fração  $\alpha_1$  mostrou valores significativamente menores de G1 em relação a G4. Para as globulinas  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , os grupos G1 e G2 diferiram estatisticamente de G3 e G4, apresentando resultados abaixo dos obtidos nos dois últimos grupos. Os valores médios encontrados em  $\alpha_2$  foram superiores aos encontrados em  $\alpha_1$  em todas as idades estudadas, sugerindo que uma maior quantidade de  $\alpha_2$  é normal em emas jovens. Este fato é relevante, pois muitos trabalhos não as identificaram separadamente (MONTESINOS et al., 1997; HASEGAWA et al., 2002; LANZAROT et al., 2005). TATUM et al. (2000) verificaram que as partes que compõem as frações  $\alpha$  diferem em proporção de acordo com a espécie, sendo que certos tipos de aves apresentaram fisiologicamente mais  $\alpha_1$  que  $\alpha_2$ . Valores mais acentuados de  $\alpha_1$  foram observados por GARCÍA-MONTIJANO et al. (2002), estudando a eletroforese em águias imperiais espanholas (*Aquila adalbert*) de cativeiro.

LANE (1991) obteve valores de  $\alpha 1$  em papagaios semelhantes aos encontrados nas emas em todas as faixas etárias, mas os valores de  $\alpha 2$  foram semelhantes somente em G1 e G2; em G3 e G4, as médias das emas foram superiores às máximas encontradas para os valores de  $\alpha 2$  em papagaios. LANZAROT et al. (2001) relataram valores médios e máximos de  $\alpha 1$  em falcões-peregrinos superiores aos encontrados nas emas de todos os grupos; porém, as médias de  $\alpha 2$  em falcões foram menores que todas as médias das emas. Os valores máximos de  $\alpha 2$  não foram superiores às médias encontradas nas emas G3 e G4.

A fração  $\beta$  apresentou aumento significativo conforme a idade. Os dois últimos grupos (G3 e G4) tiveram médias estatisticamente mais altas que os primeiros (G1 e G2). É interessante ressaltar que, em todos os grupos estudados, a porção  $\beta$  se mostrou, de maneira fisiológica, levemente acima dos valores encontrados nas outras partes globulínicas, demonstrando que, em emas, há predomínio desta fração. Comparando-se estes achados com os de outras espécies de famílias distintas, percebe-se resultados semelhantes observados por GARCÍA-MONTIJANO et al. (2002) em águias, ao contrário de MONTESINOS et al. (1997), que verificaram maior quantidade de  $\gamma$ -globulina em cegonhas brancas.

As médias encontradas nas emas de G3 e G4 foram superiores aos valores máximos encontrados por LANE (1991) em papagaios e CLUBB et al. (1991) em cacatuas e araras. As médias encontradas para  $\beta$  em todos os grupos de emas foram menores quando comparadas às dos falcões. As concentrações  $\alpha$  e  $\beta$  tendem a ser significativamente mais elevadas em aves de rapina do que em outras espécies aviárias devido a hábitos alimentares (LANZAROT et al., 2001). Em desacordo com o autor, a fração  $\alpha 2$  nas emas apresentou médias superiores às relatadas em falcões para esta fração.

A  $\gamma$ -globulina também foi influenciada pela idade. As emas de G1 e G2 tiveram valores abaixo dos obtidos nas de G3 e G4. As aves estão fisiologicamente capacitadas a produzir anticorpos a partir de 7 a 10 dias de idade, e o término dos anticorpos passivos geralmente ocorre entre 28 dias (MACARI & GONZALES, 2003). Dessa forma, pode-se supor que os valores da fração  $\gamma$  em G1 e G2 foram influenciados pela imunidade materna transmitida via ovo, sendo que em G3 há o início da imunidade ativa expressa principalmente pela IgM, e, em G4, há uma estabilização com produção maior de IgG.

Os valores máximos encontrados para a fração  $\gamma$  nas emas foram inferiores aos valores máximos

relatados por LANE (1991) em papagaios. Em falcões e demais aves de rapina, LANZAROT et al. (2001) descrevem valores médios elevados para  $\gamma$  quando comparados a outros grupos de aves.

Não houve diferença significativa nos parâmetros observados de eletroforese dentro de um mesmo grupo, havendo homogeneidade dos animais dentro de cada faixa etária estabelecida. Perfis eletroforéticos limitam-se a psitacídeos e aves de rapina, demonstrando a real necessidade de trabalhos para se estabelecer intervalos de referência para as diversas espécies de aves.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que foi realizado este experimento, pode-se concluir que o perfil eletroforético de emas sofre alterações conforme a idade analisada. O médico veterinário deve ter atenção quanto à interpretação desse tipo de exame conforme a idade da ave. Houve uma grande diferença dos valores encontrados em emas e os disponíveis em outras espécies aviárias de famílias distintas.

## REFERÊNCIAS

- ALTAN, R.B. et al. **Avian medicine and surgery**. Appendix 1, Plasma protein electrophoresis reference ranges of common psittacine species. Philadelphia: Saunders, 1997. p.1008.
- CAMPBELL, T.W.; COLES, E.H. Avian clinical pathology. In: COLES, E.H. **Veterinary clinical pathology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. p.279-301.
- CAMPBELL, T.W.; DEIN, F.J. Avian hematology. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v.14, n.2, p.223-248, 1984.
- CARRER, C.C. O mercado de avestruz. Anuário 2000 da avicultura industrial. **Gessulli Agribusiness**, v.90, n.1074, p.68-74, 2000.
- CHANG, L. et al. Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.534-542, 1999.
- CLUBB, S.L. et al. Hematologic and serum biochemical reference intervals in juvenile macaws (*Ara sp.*). **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v.5, n.3, p.154-162, 1991.
- CRAY, C.; TATUM, L. Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.12, p.4-10, 1998.
- CRAY, C. et al. Plasma protein electrophoresis: principles and diagnosis of infectious disease. **Proceedings of the Annual Conference Association of Avian Veterinarians**, v.1, p.55-59, 1995.

- GARCÍA-MONTIJANO, M. et al. Blood chemistry, protein electrophoresis, and hematologic values of captive spanish imperial eagles (*Aquila adalbert*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.33, n.2, p.112-117, 2002.
- HARR, K. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n.3, 140-151, 2002.
- HASEGAWA, M.Y. et al. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus Gallus Domesticus*) da linhagem Avian Farm. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, p.203-207, 2002.
- HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B.W. et al. **Avian medicine: principles and application**. Florida: Wingers, 1994. Cap.11, p.223-245.
- KANEKO, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: \_\_\_\_\_. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. p.117-138.
- KARESH, W.B. et al. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara spp.*) in Peru. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.28, p.368-377, 1997.
- LANE, R. Basic techniques in pet avian clinical pathology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, p.1157-179, 1991.
- LANZAROT, M.P. et al. Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, n.1, p.172-177, 2001.
- LANZAROT, M.P. et al. Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.2, p.379-386, 2005.
- LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. p.857-883.
- LUMEIJ, J.T. The diagnostic values of plasma proteins and non-protein nitrogen substances in birds. **Veterinary Quarterly**, v.9, p.262-268, 1987.
- LUMEIJ, J.T.; DeBRUIJE, J.J. Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. **Avian Pathology**, v.14, p.441-444, 1985.
- LUMEIJ, J.T. et al. Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. **Avian Pathology**, v.19, p.255-261, 1990.
- LUMEIJ, J.T.; MacLEAN, B. Total protein determination in pigeon plasma and serum: comparison of refractometric methods with the biuret method. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.10, n.3, p.150-152, 1996.
- LUMEIJ, J.T.; OVERDUIN, L.M. Plasma chemistry reference values in psittaciformes. **Avian Pathology**, v.19, p.235-244, 1990.
- MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**. Jaboticabal: Facta, 2003. 537p.
- MCINNES, P.F. et al. Monitoring exposure of nestling songbirds to agricultural application of an organophosphorus insecticide using cholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.15, p.544-552, 1996.
- MONTESINOS, A. et al. Hematological and plasma biochemical reference intervals in young white storks. **Journal of Wildlife Diseases**, v.33, p.405-412, 1997.
- RATCLIFFE, M.J.H. Chicken immunoglobulin isotypes and allotypes. In: HERZENBERG, L.A. et al. **Handbook of experimental immunology**. 5.ed. Cambridge: Blackwell science, 1996. Cap.4. p.241-247.
- ROSENTHAL, K.L. Avian protein disorders. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia: Saunders, 2000. Cap.18, p.171-173.
- ROSSKOPF, W.J.; WOERPEL, R.W. Clinical experience with avian laboratory diagnostics. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.14, n.2, p.249-286, 1984.
- TATUM, L.M. et al. Protein electrophoresis as a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.31, n.4, p.497-502, 2000.
- THRALL, M.A. et al. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams, 2004. p.401-412.
- VERSTAPPEN, F.A.L.M. et al. Plasma chemistry reference values in ostriches. **Journal of Zoo and Wildlife Diseases**, v.38, n.1, p.154-159, 2002.
- VILLOUTA, G.R. et al. Hematological and clinical biochemistry findings in captive humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). **Avian Pathology**, v.26, p.851-858, 1997.