

Interpretação do HEMOGRAMA DE AVES

Os parâmetros eritrocitários, leucocitários e de trombócitos são utilizados para avaliar a saúde das aves, suas condições fisiológicas, para estabelecer diagnóstico e prognóstico. Os dados hematológicos são utilizados também para monitorar a ave doente durante o período de reabilitação e nas aves de vida livre, detectar alterações nas condições fisiológicas e patológicas, e como parâmetro de bem-estar, da condição em que vivem no meio ambiente (Artacho et al., 2007; Vaz et al., 2016; Goulart et al., 2019).

A interpretação do hemograma de aves é um desafio, sendo necessário conhecer a morfologia normal e as funções das células para interpretar as alterações.

Nas aves de vida livre, os exames hematológicos e bioquímicos são métodos simples e pouco invasivos que avaliam a sanidade e fornecem subsídios aos planos de conservação de espécies ameaçadas, à abordagem clínica, para o manejo da vida selvagem e para avaliar os efeitos da interação humana-animal em ambientes críticos e ameaçados, onde vivem as aves. Os resultados podem ajudar no manejo, conservação e monitoramento da saúde (Vaz et al., 2016; Goulart et al., 2019).

Esse texto aborda a interpretação do hemograma de aves e descreve as alterações eritrocitárias, as causas de anemia, de policitemia, as causas de alterações leucocitárias e dos trombócitos.

Interpretação do ERITROGRAMA

1) Eritrograma

No eritrograma é realizado o diagnóstico da anemia e da policitemia. A anemia é comum em várias espécies de aves, como em Pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), por exemplo, que chegam debilitados às praias do Brasil durante o inverno. A anemia foi observada em 83% dos pinguins que foram a óbito e em 50% dos que sobreviveram (Coraiola et al., 2014). Nos Estados Unidos a ocorrência estimada de anemia em aves é de 12,7% e no Brasil os dados de prevalência são pouco relatados.

O valor da hemoglobina pode ser utilizado para avaliar o estado nutricional da ave. A Hemoglobina é uma proteína que contém ferro, e sua produção é afetada por desnutrição, inflamação, neoplasia e doenças metabólicas. Um filhote de papagaio de cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), de vida livre, da Ilha Rasa (Paraná), com bico quebrado, a hemoglobina estava diminuída (Vaz et al., 2016).

Anemia é a diminuição do número de eritrócitos e no eritrograma observa-se diminuição dos valores de hematócrito, do número de eritrócitos e da hemoglobina. Os índices hematimétricos Volume Globular Médio (VGM) e Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) são utilizados para classificar a anemia.

O importante é saber a causa ou causas da anemia, sendo necessário avaliar a resposta da medula óssea e classificar a anemia em Regenerativa ou Não Regenerativa, conforme o número de reticulócitos,

para auxiliar no diagnóstico e prognóstico. Em mamíferos, a contagem de reticulócitos está padronizada e é realizada nos contadores automatizados ou na extensão sanguínea corada com azul de cresil brilhante (corante supra-vital). Nas aves a avaliação da resposta da medula óssea também é realizada com a avaliação dos reticulócitos e policromatófilos.

Eritrócitos imaturos – policromatófilos e reticulócitos nas aves

Os eritrócitos maduros das aves têm forma elíptica ou oval, com núcleo oval e centralizado. Nas colorações de Giemsa e tipo Romanowsky, o núcleo é azul e o citoplasma levemente róseo alaranjado.

Além dos eritrócitos maduros típicos, outras células eritróides (imaturas) podem ser observadas no sangue periférico de aves saudáveis. Os eritrócitos imaturos (policromatófilos na coloração de Wright) são o penúltimo estágio de desenvolvimento dos eritrócitos e tem a forma mais redonda e núcleo redondo, com cromatina levemente condensada e o citoplasma é azul, mais basofílico. A presença de poucos policromatófilos no sangue periférico (entre 1 a 5% do total de eritrócitos circulantes) é normal e comum em aves saudáveis, mas contagens elevadas são denominadas de policromasia ou policromatofilia e indicam aumento da eritropoese, como observado nas anemias regenerativas. Com menor frequência, outras células eritróides imaturas podem ser observadas no sangue periférico, como os metarubrócitos (Fudge, 2000).

A eritropoese ocorre na medula óssea com a diferenciação e maturação das células eritróides: rubroblastos, pró-rubrócito, rubrócito, metarubrócito, reticulócito e eritrócito maduro.

Para avaliar a resposta eritróide nas aves deve ser utilizada a **contagem dos reticulócitos**, que são observados somente na coloração supra-vital, de azul de cresil de brilhante, que preserva o material basofílico granular (RNA e ribossomos). Entretanto, nas AVES deve-se ter cuidado porque na coloração supra-vital aparecem quatro tipos de reticulócitos, com diferença na distribuição do material basofílico granular (“retículo”) no citoplasma. O **reticulócito em anel** tem o retículo ao redor do núcleo (perinuclear) e com a maturação da célula, o retículo dispersa e aparecem agregados citoplasmáticos espalhados, até aparecerem em pontos (pontilhado) (Johns et al., 2008; Mitchell et al., 2008).

A contagem (porcentagem) de reticulócitos em anel (com agregados de retículo em anel, contínuo ou não, ao redor de no mínimo metade do núcleo), obtida na coloração de azul de cresil brilhante é recomendada como o **melhor método de quantificação de reticulócitos em aves e avaliação da resposta da medula óssea na anemia**, devido à forte correlação entre reticulócito em anel e os policromatófilos (Johns et al., 2008).

Existe correlação entre a % de reticulócitos em anel e a % de policromatófilos, porém, na contagem dos eritrócitos policromatófilos observa-se a COR do citoplasma da célula, sendo a avaliação subjetiva e imprecisa. A avaliação dos eritrócitos policromatófilos geralmente é

realizada de maneira semiquantitativa na extensão sanguínea corada com Wright.

As células eritróides mais imaturas do que os reticulócitos, os metarubrócitos, são redondas e menores do que os reticulócitos ou eritrócitos maduros, e tem citoplasma muito basofílico. O aumento do número desses eritrócitos imaturos é observado na resposta regenerativa intensa em aves. A intoxicação por chumbo nas aves pode causar aumento no número de eritrócitos imaturos sem anemia.

Intervalos de referência para policromatófilos (psitacídeo saudável): 0,6% a 8% (média de 3,6%) e número absoluto de 5.668 a 227.643 / μ L (média de 131.204 / μ L). (Johns et al., 2008).

Técnica de coloração para RETICULÓCITOS das aves

Utilizar sangue total, mantido sob refrigeração por até 24 horas.

- (a) diluir o sangue total em corante supravital na diluição 1:3 (corante azul de cresil ou azul de metileno) e
- (b) incubar por 10 minutos em temperatura ambiente (22° C);
homogeneizar e fazer uma extensão sanguínea;

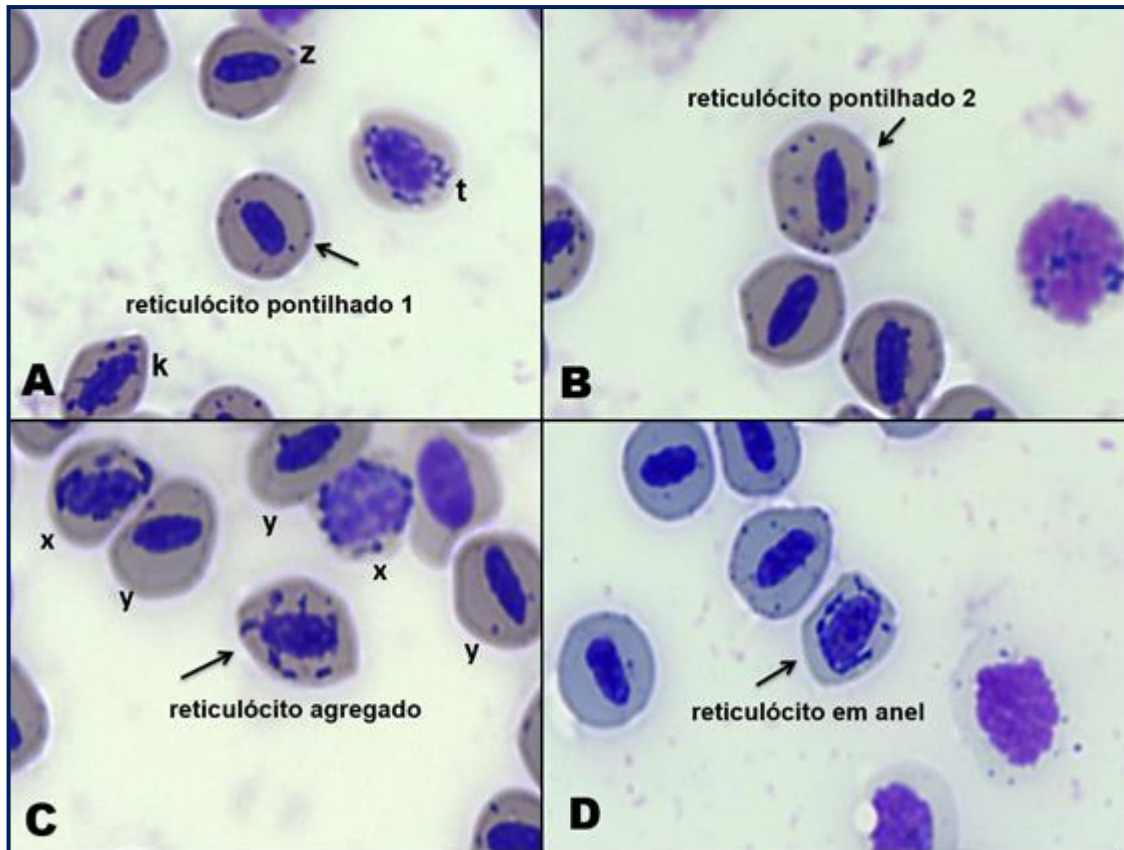
OU colocar o corante azul de cresil brilhante e o sangue total (previamente homogeneizado) em proporções iguais (1:1). Sugere-se utilizar 50 μ L de corante para 50 μ L de sangue. Homogeneizar e colocar o tubo em banho-maria a 37°C durante 20 minutos. Após esse tempo, homogeneizar novamente e fazer uma extensão sanguínea. Após a secagem da lâmina, pode-se

contra corá-la com o corante Panótico rápido ou na coloração de Wright.

- (c) contar o número de reticulócitos em 1000 eritrócitos em objetiva de imersão (100X). Para obter o valor em porcentagem (%), dividir o número de reticulócitos encontrado por 10. Para obter o valor absoluto (em μL), multiplicar o valor relativo (em %) pelo número total de eritrócitos.

A seguir estão descritos os quatro tipos de reticulócitos das aves. Nas figuras estão os reticulócitos de arara canindé (*Ara ararauna*)

(A) **reticulócito pontilhado 1** (centro, seta): com < 10 pontos de retículo corado; à direita um reticulócito em anel (t); lado inferior esquerdo um reticulócito agregado (k); acima um reticulócito pontilhado 1 (z); (B) **reticulócito pontilhado 2** (no centro, seta): com ≥ 10 pontos de retículo corado; abaixo dois reticulócitos pontilhados 1; (C) **reticulócito agregado** (no centro, seta): com agregados de retículo corado difuso no citoplasma; dois reticulócitos em anel (x); três reticulócitos pontilhado 1 (y); (D) **reticulócito em anel** (no centro, seta): reticulócito com agregado de retículo corado em forma de anel, contínuo ou não, em pelo menos metade do núcleo; acima observar quatro reticulócitos do tipo pontilhado 1. Coloração: Azul de Cresil Brilhante, contra corado com Wright (100x).



ANEMIA

O diagnóstico da anemia é realizado pelo histórico, sinais clínicos e confirmação laboratorial. É importante determinar a causa e a severidade da anemia. Os sinais clínicos da anemia são fraqueza, letargia e sinais respiratórios. No exame físico observa-se membranas mucosas oral e cloacal pálidas, diminuição do tamanho da veia ulnar cutânea, pulso arterial periférico fraco, taquicardia e murmúrio cardíaco fisiológico.

A ave pode ter sinais evidentes de perda de sangue, como traumas, penas quebradas com sangue, hematomas, melena e hematoquesia. A causa da anemia pode não ser evidente, e deve ser realizado diagnóstico adicional.

Na suspeita de anemia, coletar uma amostra de sangue para **hemograma**.

A anemia em aves é definida quando o hematócrito é menor que 35%. O intervalo de referência normal do hematócrito de aves é de 35 a 55%. Os valores inferiores a 35% indicam **anemia** e maiores que 55% indicam **policitemia relativa** (desidratação). Nos psitacídeos, entretanto, o hematócrito normal é maior do que 45%, logo, devem ser avaliados os valores de referência conforme a espécie.

Hematócrito segundo a severidade da anemia:

hematócrito de 25% a 35%: anemia moderada

hematócrito menor do 20%: anemia severa

Anemia regenerativa X Anemia não regenerativa

A contagem de reticulócitos em anel é o melhor método para determinar a resposta da medula óssea e a regeneração eritróide. Usar o grau de policromasia (policromatofilia) para estimar a regeneração quando não for possível contar os reticulócitos em anel.

Nas aves saudáveis e **sem anemia** são observados poucos policromatófilos no sangue periférico (1 a 5% dos eritrócitos circulantes). O número elevado é denominado de POLICROMASIA ou POLICROMATOFILIA e indica aumento da eritropoese, como observado nas anemias regenerativas.

A reticulocitose aumentada ou policromasia (> 5% a 10% dos eritrócitos) indica resposta eritróide regenerativa à anemia. Se essa porcentagem é de magnitude adequada, não é necessário o exame da medula óssea. Nas aves anêmicas com 5% ou menos de policromatófilos no sangue NÃO está ocorrendo resposta à anemia ou o período é insuficiente para resposta da medula óssea.

Causas de Anemia em Aves

Na anemia REGENERATIVA observa-se aumento da policromatofilia (eritrócitos imaturos) no sangue, ou seja, aumento do número dos reticulócitos em anel (coloração supra-vital). O número de reticulócitos varia de 1 a 5% em ave saudável e na **anemia regenerativa a ave deve ter 10% ou mais no sangue periférico**, e podem ser observados outros eritrócitos imaturos, como os metarubrócitos. Esse aumento de eritrócitos imaturos é indicativo de regeneração eritróide. Importante: nas aves anêmicas deve ser realizada a contagem dos reticulócitos em anel, considerada a melhor técnica para avaliar a resposta eritróide.

Na anemia regenerativa a medula óssea aumenta a eritropoese devido a hipóxia e níveis elevados de eritropoetina. As causas podem ser hemorrágicas e hemolíticas.

Anemia hemorrágica

As anemias por perda de sangue são regenerativas, exceto se a perda de sangue é aguda. Causas:

- ✓ traumatismos: lacerações, fraturas, cirurgias
- ✓ parasitismo: carrapatos, coccídios, ácaros
- ✓ problemas na coagulação: coagulopatias primárias (rara); congênita (rara); infecção viral (polyomavírus, doença de Pacheco, reovírus); doença hepática grave; septicemia bacteriana; toxinas (warfarina, aflatoxina de alimento mofado)

- ✓ intoxicações por rodenticidas, aflatoxicose, intoxicação por cumarínico, que causam coagulopatias
- ✓ hemorragias gastrointestinais: parasitismo, úlceras e neoplasias
- ✓ hemorragias na cloaca: papilomas ulcerados, lacerações, prolapso, infecções
- ✓ neoplasias ulceradas

Anemia Hemolítica

As aves com anemia hemolítica podem ter hemoglobinúria ou biliverdinúria. As causas são hemoparasitas, septicemia, toxinas (chumbo, zinco, produtos de petróleo) e imuno-mediadas. Exames adicionais podem ser usados para confirmar a hemólise e avaliar as causas: teste de aglutinação, radiografias, aspirado ou biópsia hepática, biópsia do baço, aspirado de medula óssea.

Causas de anemia hemolítica:

- ✓ hemoparasitas: são observados na extensão sanguínea corada. Os principais hemoparasitas que causam anemia hemolítica são o *Plasmodium* e *Rickettsia (Aegyptianella spp.)*. O *Plasmodium* causa anemia hemolítica e mortalidade em passeriformes; ocorrência em várias espécies de aves. Os parasitas *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* geralmente não causam hemólise ou outros efeitos adversos, exceto nos casos de infecção severa e nas aves imunocomprometidas. O *Atoxoplasma* spp. (esporozoítas são

encontrados somente dentro dos leucócitos mononucleares); *Trypanosoma* spp (parasitas extracelulares); *Aegyptianella* spp (intraeritrocitário); microfilárias (extracelulares).

- Aves com hemoparasitas podem não ter anemia. Em passeriformes (sabiá-branco, *Turdus leucomelas*), por exemplo, a infecção por hemoparasitas não causou alterações nos parâmetros hematológicos (Lobato et al., 2011).
- ✓ toxinas: metais pesados são causas comuns de anemia hemolítica em aves. As intoxicações causadas por zinco, chumbo (com diminuição da meia vida do eritrócito) e produtos de petróleo. Na intoxicação aguda por metais pesados ocorre hemólise intravascular; observar o plasma hemolisado.
- ✓ Hemólise secundária a ingestão de cebolas (mais rara)
- ✓ aflatoxicose
- ✓ anemia hemolítica imuno-mediada: é rara em aves; pode ocorrer secundária à infecção por *Salmonella* ou *Borrelia*
- ✓ anemia hemolítica imuno-mediada primária é rara e foi relatada em psitacídeos
- ✓ Septicemia: salmonelose

Anemia Não Regenerativa

Na anemia não regenerativa não há resposta da medula óssea e não aparecem os eritrócitos imaturos, os policromatófilos (reticulócitos em anel) no sangue periférico. Uma causa importante de anemia não regenerativa é anemia de Doença Inflamatória que ocorre devido a diminuição da produção dos eritrócitos (eritropoese) e diminuição da meia vida dos eritrócitos. A anemia por falta de eritropoese instala-se rapidamente nas aves, possivelmente devido a meia vida curta do eritrócito.

Causas:

- ✓ doenças inflamatórias: aguda ou crônica, infecciosa ou não infecciosa
- ✓ doenças inflamatórias crônicas = anemia de doença crônica: aspergilose, tuberculose, clamidofilose (clamidiose), infecção bacteriana crônica, peritonite; neoplasias
- ✓ neoplasia hematopoiética: leucemia
- ✓ neoplasia mesenquimal
- ✓ doenças virais (circovírus)
- ✓ deficiência nutricional: deficiência de ferro, ácido fólico, inanição, hipoproteinemia
- ✓ drogas: ciclofosfamidase e corticosteróides
- ✓ hepatopatias
- ✓ nefropatias, insuficiência renal
- ✓ hipotireoidismo, hiperestrogenismo
- ✓ toxinas: intoxicação por chumbo, zinco, aflatoxinas

- ✓ Poliomavírus em psitacídeo: durante a viremia; causa doença renal e diminuição da eritropoetina, fator estimulador da eritropoese

Para confirmar a causa da anemia não regenerativa devem ser realizados testes adicionais, como exames para doenças infecciosas (sorológicos, PCR), exames toxicológicos, radiologia, ultrassom e aspirado de medula óssea.

O **aspirado de medula óssea** pode ser feito no esterno, osso tibiotarso proximal (comum), ou nos ossos longos não pneumatizados. A ave deve ser anestesiada antes da coleta da medula óssea devido a dor e estresse do procedimento.

Na hipocromia, o citoplasma do eritrócito aparece menos corado, devido a quantidade diminuída de hemoglobina e está associada a perda de sangue aguda, inflamação, deficiência de ferro e anemias pouco regenerativas nas aves. A inflamação causa redistribuição das reservas de ferro e diminuição do ferro disponível para eritropoese e resulta em deficiência funcional do ferro. A perda de sangue aguda e a deficiência nutricional de ferro podem causar anemia hipocromica, pouco regenerativa ou anemia não regenerativa devido a falta absoluta de ferro

POLICITEMIA

A policitemia é o aumento relativo ou absoluto do número de eritrócitos, acima dos parâmetros fisiológicos. A policitemia absoluta pode ser de origem primária (neoplásica) ou secundária, devido a deficiência crônica de oxigênio nos tecidos. A primária, denominada eritroblastose ou policitemia Vera, é uma doença mieloproliferativa conhecida em frangos e pertence ao grupo da leucose/sarcoma aviário. As policitemias secundárias sempre ocorrem quando há condição de hipóxia crônica, independente da causa. Em psitacídeos foi relatada uma síndrome respiratória, em araras e papagaios.

O hematócrito é $> 55\%$ e as causas da policitemia são:

- Primária (Vera): rara
- Secundária: adaptação a altitudes elevadas; ligação deficiente do oxigênio aos eritrócitos, doenças respiratórias ou cardiocirculatórias crônicas (pneumonia, cardiomiopatias, ascite, massa abdominal).

