

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DE CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix
coturnix japonica*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS**

**Maria das Graças da Silva Bernardino
Médica Veterinária**

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DE CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix
coturnix japonica*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS**

Maria das Graças da Silva Bernardino

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Satake

Coorientador: Dr. Ricardo Barbosa de Lucena

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2016

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

B523a Bernardino, Maria das Graças da Silva.
Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas
(*Coturnix coturnix japonica*) em diferentes faixas etárias / Maria das Graças da Silva
Bernardino. - Areia: UFPB/CCA, 2016.
viii, 54 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.
Orientador: Fabiana Satake.

1. Codornas 2. Hematologia veterinária 3. Bioquímica animal I. Satake, Fabiana II.
Título.

UFPB/CCA

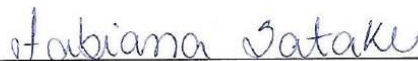
CDU: 636.5.09(043.3)

MARIA DAS GRAÇAS DA SILVA BERNARDINO

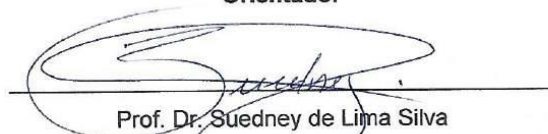
**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DE CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix
coturnix japonica*) EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do brejo paraibano.

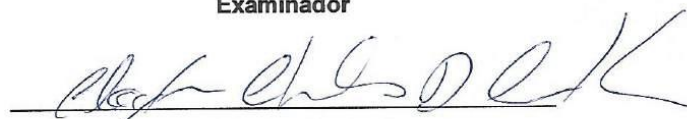
APROVADA EM 15/02/2016
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Fabiana Satake
DCV/CCA/UFPB
Orientador



Prof. Dr. Suedney de Lima Silva
DCV/CCA/UFPB
Examinador



Dr. Cleyton Charles Dantas Carvalho
DMV/UFRPE
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA DAS GRAÇAS DA SILVA BERNARDINO – Nascida em Guarabira, estado da Paraíba, em 13 de setembro de 1989. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba (2014). No mesmo ano ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, sob orientação da professora Dra. Fabiana Satake e desenvolveu sua pesquisa na área de Patologia Clínica Veterinária.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por sempre me dar forças e me guiar pelos caminhos do bem. Ao meu esposo, Edijanio Galdino da Silva, por ser um grande companheiro e exemplo de pessoa. A todos os meus familiares por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me fortalecer nos momentos mais difíceis, me dando forças para vencer os obstáculos que surgiram na minha caminhada.

Aos meus pais, Manoel e Severina, agradeço por todos os ensinamentos, proteção e força. Aos meus irmãos Bruna e Eduardo, por sermos sempre unidos e estarem sempre me dando força, apoio e confiança.

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de fazer parte deste curso que muito contribuiu para minha formação.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal que contribuíram para a ampliação dos meus conhecimentos. Em especial, a minha orientadora Dra. Fabiana Satake, meus sinceros agradecimentos pela confiança, orientação, paciência, dedicação, carinho e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, por dar condições para que este trabalho pudesse ser realizado com sucesso.

Aos meus amigos do curso, os quais estiveram ao meu lado sempre, me dando apoio quando precisei.

Ao técnico do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, George Luís Dias dos Santos pela amizade, apoio e colaboração.

A toda equipe de pesquisa que contribuiu para a realização desse trabalho: Ricardo Pereira, Rafanele Trajano, Débora Angelo e Vinícius Gonçalves.

Em especial, meus sinceros agradecimentos ao meu esposo e amigo Edijanio Galdino da Silva, por todo o apoio, amizade, carinho e amor.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	v
ABSTRACT	vii
CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	02
2.1. Codornas japonesas	02
2.2. Hematologia em aves	03
2.2.1. Hematopoiese	03
2.2.2. Locais de colheita sanguínea	04
2.2.3. Esfregaço sanguíneo	05
2.2.4. Volume globular	05
2.2.5. Eritrócitos	05
2.2.6. Hemoglobina	06
2.2.7. Leucócitos	06
a) Monócito	07
b) Heterófilo	08
c) Linfócito	08
d) Eosinófilo	09
e) Basófilo	10
2.2.8. Trombócitos	10
2.3. Técnicas hematológicas	11
2.4. Análise bioquímica em aves	11
2.4.1. Amostras e testes	11
2.4.2. Enzimas	12
a) Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)	12

b) Gama-glutamilttransferase (GGT) e Fosfatase alcalina (ALP)	13
c) Lactato desidrogenase (LDH), glutamato desidrogenase (GLDH) e sorbitol desidrogenase (SDH)	13
2.4.3. Metabólitos e nutrientes	13
a) Creatinina, ácido úrico e ureia	13
b) Proteínas totais	14
c) Albumina	15
d) Glicose	16
e) Colesterol e triglicerídeos	16
f) Cálcio	16
g) Bilirrubinas	17
2.5. Imunologia em aves	17
2.6. Influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos em aves	19
CAPÍTULO I - Avaliação da influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (<i>Coturnix coturnix japonica</i>)	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Avaliação da influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)

	Página
Table 1	
Mean values/median followed by standard deviation/interquartile range of the total weight of the birds and weight of organs of Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) in different age groups.	36
Table 2	
It shows the mean values/median followed by standard deviation/interquartile range of the hematological parameters of Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) in different age groups.	38
Table 3	
The percentage values of the increase and decrease of lymphocytes and heterophils in Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) in different age groups.	41
Table 4	
The comparison of hematological parameters of two classes of age of Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>).	42
Table 5	
The mean values followed by standard deviation of the total area of erythrocytes (μm) of Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) in different age groups.	44
Table 6	
Median values followed by interquartile range of serum constituents of Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) in different age groups.	45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I - Avaliação da influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)

	Página
Fig.1.	
Evaluation of the weights of lymphoid organs in grams (x10) and the ratio of heterophil/lymphocyte for Japanese quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) in different age groups.	47

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE OS PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix
coturnix japonica*)**

RESUMO GERAL - A coturnicultura encontra-se em processo de expansão no Brasil e vem se tornando uma atividade de grande importância no cenário econômico brasileiro, gerando empregos e renda para a população, porém nota-se uma falta de conhecimentos sobre os constituintes sanguíneos e bioquímicos da espécie. Diante disso, o estudo objetivou avaliar a influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). Foram realizadas sete coletas, com codornas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 80 dias idade. No total, foram avaliadas 224 codornas, sendo 32 codornas por coleta. Cada ave foi pesada individualmente e uma amostra sanguínea foi adquirida por punção cardíaca, colhendo cerca de 3 mL de sangue. O hemograma foi realizado com 1 mL de amostra sanguínea, utilizando 20 µL de EDTA a 5% por mL de sangue. O volume restante foi acondicionado em um tubo sem anticoagulante para obtenção de soro após centrifugação. Em seguida, as aves foram eutanasiadas e a Bursa de Fabrícus, timo, baço e fígado pesados em balança de precisão. Foi calculada a proporção normal de heterófilos:linfócitos (H/L) e foram mensurados a área total de 290 eritrócitos por faixa etária. As imagens dos eritrócitos foram obtidas e analisadas através de câmera digital (Moticam 2500) acoplada ao microscópio óptico Zeiss, equipado com um sistema de análise de imagem (Motic Images Plus, version 2.0). No soro, foram analisadas as concentrações das proteínas totais, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), triglicerídeos, colesterol total, ureia, ácido úrico e cálcio em analisador bioquímico automático da Mindray (BS-120) utilizando kits reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.[®]). Foi aplicado nos grupos o teste de normalidade Shapiro-Wilk através do programa estatístico BioEstat 5.0, e em seguida a comparação entre dois grupos foi feita pelo Teste t ou U-Mann Whitney e comparação entre mais de dois grupos foi feito pelo teste Tukey ou Kruskal-Wallis à

5% de significância. Aves com 80 dias de idade apresentaram involução do baço, timo e Bursa. Aves jovens apresentaram os menores valores médios de volume globular, eritrócitos e concentração de hemoglobina e maiores valores médios de volume globular médio, possuíram heterófilos como leucócito predominante e conseqüentemente maior relação H/L. Além disso, os resultados mostraram que parece haver uma correlação entre número de linfócitos circulantes e peso dos órgãos linfoides. Codornas com 80 dias de idade apresentaram os maiores valores médios de proteínas séricas totais, cálcio e lipídeos. Constatou-se uma diminuição linear dos valores médios da atividade da ALP em codornas entre 7 e 80 dias de idade. Concluímos que ocorrem variações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas de acordo com a idade. Por isso, os resultados desse estudo servem como alerta durante a avaliação dos parâmetros hematológicos da espécie, pois estas variações são fisiológicas e não devem ser associadas a doenças.

Palavras-chave: hematologia, bioquímica, aves, hemograma, parâmetros sanguíneos.

**THE EVALUATION OF THE AGE INFLUENCE IN THE HEMATOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL PARAMETERS OF JAPANESE QUAIL (*Coturnix coturnix
japonica*)**

ABSTRACT - The Japanese quail industry is increasing in expansion in Brazil and has become a very important activity in the Brazilian economic scenario, so it has been generated jobs and income for the population. However, it notes a lack of knowledge about blood and biochemical constituents of the specie. Thus, the study aimed to evaluate the influence of age on hematological and biochemical parameters of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Seven samples were collected with quail at 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 80 days old. In total, 224 quail were evaluated wherever 32 quail per collection. Each bird was individually weighed. The blood sample was collected by cardiac puncture, collecting about 3 mL blood. The complete blood count was performed with 1 mL blood, using 20 μ L of EDTA 5% for each mL of blood. The remaining volume was placed in a tube without anticoagulant to obtain serum after centrifugation. Then the birds were euthanized. The bursa of Fabricius, thymus, spleen and liver were weighed on a precision scale. It was calculated normal ratio of heterophil:lymphocyte (H/L) and it was measured the total area of 290 erythrocytes per age group. The images of the erythrocytes were obtained and analyzed by digital camera (Moticam 2500) coupled to the optical Zeiss microscope equipped with an image analysis system (Motic Images Plus Version 2.0). The serum was measured for concentrations of total protein, Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT), Gamma glutamyl transferase (GGT), Alkaline Phosphatase (ALP), triglycerides, total cholesterol, urea, uric acid and calcium by the automatic biochemical analyzer Mindray (BS-120) using commercial reagent kits (Labtest Diagnóstica S.A.[®]). First, it was applied to the groups the Shapiro-Wilk normality test through the statistical program BioEstat 5.0. Then, the comparison between two groups was made by t-test or the Mann-Whitney U. Finally, the comparison of more than two groups was taken by Tukey test or

Kruskal-Wallis test at 5% significance level. Birds with 80 days of age showed an involution of the spleen, thymus and bursa of Fabricius. Young birds showed lower average values of packed cell volume, red blood cells and hemoglobin concentration. Furthermore, they showed red blood cells in larger size and concomitantly higher average values of mean corpuscular volume. Also, showed heterophils as the predominant leukocyte and consequently higher H/L. It is noteworthy that there appears to be a correlation in the number of circulating lymphocytes and weight of the lymphoid organs. Quails with 80 days of age showed higher average values of total serum protein, calcium and lipids. It was found a linear decrease of average values of ALP activity in quails between 7 and 80 days of age. We conclude that there are variations in hematological and biochemical parameters of Japanese quails in accordance with age. Therefore, the results of this study serve as a warning for the evaluation of hematological parameters of the specie, as these variations are physiological and should not be associated with diseases.

Keywords: hematology, biochemistry, birds, blood count, blood parameters.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A avicultura brasileira está em crescente expansão no mercado mundial e a cada momento torna-se necessário se adequar às exigências do mercado (GERTNER; SANTIN; SAAD, 2008). Como em qualquer outra exploração animal para garantir a qualidade dos subprodutos e sucesso do empreendimento é necessário fornecer uma alimentação correta, fazer um controle sanitário e realizar um manejo eficiente (MORAES; ARIKI, 2000).

Atualmente, o Brasil possui um rebanho de mais de 18 milhões de cabeças de codornas, no qual os estados de São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais possuem juntos cerca de 73,9% da produção efetiva (IBGE, 2013). Entre os anos de 2009-2013, verificou-se um aumento na produção de 58,2% (IBGE, 2009; IBGE, 2013). Dessa forma, esses dados mostram que a Coturnicultura encontra-se em processo de expansão no Brasil, se tornando uma atividade de grande importância no cenário econômico brasileiro, gerando empregos e renda para a população.

Sabendo que a hematologia e bioquímica são ferramentas fundamentais para a detecção precoce de doenças, nota-se uma falta de conhecimentos sobre os constituintes sanguíneos e bioquímicos da espécie. Dessa forma, torna-se necessário a realização de estudos que caracterizem os seus aspectos fisiológicos, além do estabelecimento de valores referenciais dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Uma vez que é necessário que o clínico veterinário tenha o conhecimento prévio das variações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos decorrentes de fatores fisiológicos, como por exemplo, a influência da idade, sexo, nutrição, período de postura, troca de penas e períodos de migração, para que assim seja capaz de interpretar os parâmetros corretamente, identificar as alterações patológicas e realizar um diagnóstico preciso.

Diante disso, o estudo teve como objetivo avaliar a influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*).

2. Revisão de literatura

2.1. Codornas japonesas

A codorna japonesa é uma ave pertencente à ordem *Galliformes*, família *Phasianidae*, gênero *Coturnix* e espécie *C. japonica* (VALI, 2008). O primeiro registro de codornas japonesas selvagens surgiu no século VIII no Japão (VALI, 2008), em seguida iniciou-se a sua exploração comercial. Atualmente ela vem sendo criada para produção de ovos para o consumo humano e cada vez mais vem ganhando espaço no setor agropecuário.

A sub-espécie mais difundida no Brasil é a *Coturnix coturnix japonica*, e a sua expansão no país é decorrente de diversas características motivantes da espécie, como o grande potencial para a produção de ovos (média de 300 ovos por ano), rápido crescimento e maturidade sexual precoce, pequena exigência de espaço, baixo consumo de ração, curto ciclo de produção, grande longevidade produtiva (14 a 18 meses) e baixo investimento inicial à produção associado ao rápido retorno financeiro (PASTORE; OLIVEIRA; MUNIZ, 2012).

Durante muitos anos a Coturnicultura era considerada uma atividade alternativa para pequenos produtores, mas dados do IBGE (2013) mostram que essa atividade encontra-se em expansão no país. No ano de 2013, verificou-se um aumento na produção de 10,6% em relação a 2012.

No Brasil, o maior plantel de codornas encontra-se na região Sudeste com 76,1%, seguida pela região Sul com 11,1%, região Nordeste com 8,2%, região Centro-Oeste com 4,0% e região Norte com 0,6% (IBGE, 2013). O estado de São Paulo é o maior produtor de codornas, possuindo um rebanho de mais de 9 milhões de aves.

A rápida expansão do setor, pode estar relacionado à introdução de novas tecnologias de produção, onde antes a atividade, que era de subsistência, passou ser uma atividade altamente tecnificada com resultados promissores aos

investidores (PASTORE; OLIVEIRA; MUNIZ, 2012), e também devido ao melhoramento genético e nutricional (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Concomitantemente aos avanços tecnológicos no setor, nota-se um aumento na aceitabilidade e consumo de ovos de codornas pela população, que pode estar relacionado ao seu alto valor nutritivo, uma vez que o ovo de codorna possui menos gordura, além de mais proteínas e minerais quando comparado ao ovo de galinha (MORAES; ARIKI, 2000), além disso é fonte de vitaminas, em especial a Vitamina E (TUNSARINGKARN; TUNGJAROENCHAI; SIRIWONG, 2013).

2.2. Hematologia em aves

A hematologia é um componente essencial da prática veterinária, todavia a interpretação dos parâmetros sanguíneos de aves ainda fornece muitos desafios ao clínico (MITCHELL; JOHNS, 2008), uma vez que os laboratórios veterinários utilizam diferentes metodologias que dificultam a comparação dos resultados obtidos (THRALL *et al.*, 2006). Além disso, muitos dos valores de referência utilizados na clínica veterinária provêm de estudos com número amostral muito reduzido.

2.2.1. Hematopoiese

A hematopoiese em aves após a eclosão ocorre principalmente na medula óssea (NAZIFI; TADJALLI; MOHAGHGHEGHZADEH, 1999; TADJALLI; NAZIFI; HAGHJOO, 2012). Os componentes celulares da medula óssea de codornas japonesas correspondem em média 67,31% da linhagem eritróide, 24,92% da linhagem mielóide e 3,28% da linhagem trombocítica (NAZIFI; TADJALLI; MOHAGHGHEGHZADEH, 1999).

Em aves, a eritropoese é estimulada pela ação da eritropoietina, que é sintetizada nos rins e medula óssea (MITCHELL; JOHNS, 2008) e os estágios de divisão/maturação para a produção dos eritrócitos são o rubriblasto, pró-rubricito, rubricito basofílico, policromatófilo e tardio (NAZIFI; TADJALLI; MOHAGHGHEGHZADEH, 1999).

Nazifi, Tadjalli e Mohaghgheghzadeh (1999) observaram que os estágios de maturação da linhagem mielóide incluem o pró-mielócito que pode se diferenciar em mielócito heterofílico, eosinofílico ou basofílico, subsequentemente estes originam o metamielócito heterofílico, eosinofílico e basofílico, que sofrem maturação para heterófilos, eosinófilos e basófilos bastonetes e em seguida para leucócitos granulócitos maduros. Ainda nesse estudo, os pesquisadores observaram que a linhagem trombocítica na medula óssea se desenvolve subsequentemente em tromboplastos, pró-trombócitos e trombócitos.

Vale ressaltar que a origem das células sanguíneas na medula óssea das aves ainda não está totalmente esclarecida, havendo um teoria que precursores eritróides, leucocitários e trombocitários originam-se de células precursoras distintas. Esta teoria se baseia nos achados de Campbell (1967), no qual observou que os eritrócitos imaturos são encontrados no lúmen dos sinusóides medulares, enquanto que os granulócitos e linfócitos são encontrados nos espaços extravasculares da medula óssea.

2.2.2. Locais de colheita sanguínea

Em aves, o local de colheita sanguínea vai depender de diversos fatores, incluindo a espécie, o volume de sangue necessário, o método de contenção e experiência do operador (CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009).

Os principais locais de colheita sanguínea nas espécies de *Galliformes* são a veia jugular direita, ulnar e basílica (CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009), devendo-se aplicar leve sucção, pois as veias aviárias tendem a se colapsar facilmente (RUPLEY, 1999). Em estudos experimentais, a punção cardíaca é uma outra via de escolha quando se pretende obter um volume adequado para as análises, mas recomenda-se que não seja utilizada na clínica, por ser uma técnica muito perigosa que pode promover a morte da ave.

Em aves que não se encontrem em estado anêmico ou hipovolêmico, pode-se coletar seguramente o volume de sangue até 1% do peso corporal (RUPLEY, 1999; THRALL *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2007a; SCHOSSLER, 2013).

2.2.3. Esfregaço sanguíneo

A avaliação do esfregaço sanguíneo permite uma quantidade substancial de informações importantes na avaliação da saúde da ave (RUPLEY, 1999), incluindo a contagem diferencial de leucócitos, contagem de trombócitos, avaliação da morfologia celular e presença de hemoparasitas (SCHMIDT *et al.*, 2007a). Como por exemplo, variações do tamanho dos eritrócitos (anisocitose), anormalidades na sua forma (poiquilocitose) e anormalidades na sua hemoglobinação (MITCHELL; JOHNS, 2008). A presença de hipocromia, poiquilocitose e fragmentação eritrocítica sugerem deficiência por ferro (RUPLEY, 1999).

Rupley (1999) recomenda que o esfregaço seja feito imediatamente e de preferência com o sangue obtido sem anticoagulante.

2.2.4. Volume globular

Assim como nos mamíferos, a técnica de microhematócrito pode ser utilizada para a determinação do volume globular. O hematócrito normal das aves geralmente está em torno de 35 a 55% (SCHMIDT *et al.*, 2007a), portanto, volume globular inferior a 35% sugere processos anêmicos e superior a 55% indica desidratação ou eritrocitose (THRALL *et al.*, 2006).

O volume globular fornece informações rápidas sobre a série eritrocitária da ave, bem como a presença de processos anêmicos e eritrocitoses, além disso, a coloração do plasma permite a verificação da presença e grau de hemólise da amostra.

2.2.5. Eritrócitos

Os eritrócitos maduros possuem uma forma elíptica e um núcleo central com cromatina agrupada que acompanha a forma da célula (SCHMIDT *et al.*, 2007a; MITCHELL; JOHNS, 2008). O citoplasma cora-se com um rosa-alaranjado (RUPLEY, 1999). Eles apresentam uma meia vida de 28 a 45 dias (RUPLEY, 1999; SCHOSSLER, 2013).

Os eritrócitos imaturos são células arredondadas com citoplasma basofílico, núcleos arredondados e cromatina nuclear mais frouxa, e à medida que vão amadurecendo o núcleo e a membrana citoplasmática vão se tornando elípticos, concomitantemente a cromatina nuclear vai se tornando mais densa e a coloração citoplasmática alaranjada (MITCHELL; JOHNS, 2008). Em aves, a observação de policromasia em 1 a 5% das hemácias é considerada fisiológica, policromasia de 5 a 10%, geralmente ocorrem em respostas aos quadros anêmicos discretos, 10 a 20% de policromasia ocorrem em resposta à anemia moderada e 40 a 50% de policromasia ocorrem em resposta à anemia severa (RUPLEY, 1999).

2.2.6. Hemoglobina

Assim como nos mamíferos, o método de cianometahemoglobina é a técnica aplicada para determinação da hemoglobina em aves, porém necessita de adaptações, uma vez que a presença dos núcleos dos eritrócitos na solução promove um aumento na quantidade de solutos, promovendo um falso aumento na concentração de hemoglobina. Dessa forma, foi desenvolvido a técnica de cianometohemoglobina modificado para as espécies que possuem eritrócitos nucleados que consiste na centrifugação da solução antes da leitura no espectrofotômetro, promovendo assim a sedimentação dos núcleos dos eritrócitos (THRALL *et al.*, 2006).

2.2.7. Leucócitos

Os leucócitos são classificados em granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos) (SCHMIDT *et al.*, 2007a). Os leucócitos das aves possuem funções semelhantes a dos mamíferos, onde os heterófilos são o tipo mais abundante para a maioria das espécies, seguido dos linfócitos (JONES, 2015).

Nas aves, o leucograma pode sofrer alterações drásticas em resposta à processos infecciosos, por isso sua interpretação permite avaliar a resposta imunológica dos animais (SCHMIDT *et al.*, 2007a).

a) Monócito

Os monócitos de aves possuem morfologia semelhante à dos mamíferos, uma vez que são células redondas com núcleo pleiomórfico, cromatina frouxa, citoplasma azul-acinzentado e podem apresentar vacúolos citoplasmáticos (MITCHELL; JOHNS, 2008).

Eles são produzidos na medula óssea e em seguida migram para corrente circulatória (ALMEIDA *et al.*, 2013) e assim como nos mamíferos, o monócito que migra para o tecido torna-se macrófago (MITCHELL; JOHNS, 2008).

O aumento do número de monócitos circulantes ocorre em resposta a uma doença infecciosa ou inflamatória (MITCHELL; JOHNS, 2008) ou em processos inflamatórios crônicos (D'ALOIA *et al.*, 1994). A sua principal função é fagocitar e digerir patógenos durante uma infecção, além de outras funções clássicas que incluem quimiotaxia, capacidade tumoricida e produção de citocinas (QURESHI, 2003).

Os monócitos agem na primeira linha de defesa do organismo e possuem um papel extremamente importante tanto na resposta inata como adaptativa (ALMEIDA *et al.*, 2013). Para realizar a fagocitose, os macrófagos possuem moléculas de reconhecimento antigênico e receptores na sua superfície que promovem a ligação correta com os patógenos (QURESHI, 2003), uma vez fagocitado, o fagossomo contendo o microrganismo se funde com o lisossomo que contém enzimas digestivas promovendo assim sua destruição (ERF, 2004). Após a digestão do agente, o macrófago apresenta fragmentos do antígeno para os linfócitos T (ROCHA *et al.*, 2014).

E quando os macrófagos se tornando infectados, estes podem ser estimulados funcionalmente por linfócitos Th1 se tornando fagócitos mais poderosos para que consigam debelar o patógeno (ERF, 2004). Além disso, esses macrófagos ativados estimulam a inflamação, promovem o recrutamento de outros leucócitos, aumentam a expressão de moléculas de MHC II para ativar mais Linfócitos Th, e caso necessário formam granulomas para conter a infecção (ERF, 2004).

b) Heterófilo

O heterófilo é uma célula redonda com núcleo basofílico segmentado e grânulos eosinofílicos proeminentes, e embora haja diferenças importantes, o heterófilo aviário geralmente corresponde ao neutrófilo dos mamíferos (MITCHELL; JOHNS, 2008). Na maioria das espécies de aves, ele é o leucócito circulante mais comum (CLAVER; QUAGLIA, 2009).

Eles estão comumente envolvidos em processos inflamatórios agudos, onde as suas principais funções são a fagocitose (MITCHELL; JOHNS, 2008) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (FERNANDES *et al.*, 2013).

Durante uma infecção, o aumento da demanda dos heterófilos promove o recrutamento de células jovens, bem como o aparecimento de heterófilos bastonetes (LATIMER *et al.*, 1988).

Os heterófilos bastonetes são células que não apresentam segmentação nuclear, já os mielócitos e metamielócitos são células maiores, com núcleos arredondados e citoplasma basofílico (MITCHELL; JOHNS, 2008).

Assim como nos mamíferos, um quadro de desvio nuclear degenerativo ocorre quando o número de heterófilos imaturos excede o número de heterófilos maduros (MITCHELL; JOHNS, 2008). Além disso, diante de um processo tóxico pode-se observar alterações nesses granulócitos bem como, inchaço celular, desgranulação, basofilia e vacuolização citoplasmática (LATIMER *et al.*, 1988).

A heterofilia em aves pode ser observada em processos inflamatórios crônicos (D'ALOIA *et al.*, 1994), e, embora a heteropenia não seja comumente observada em aves, esta pode ser constatada em algumas doenças virais ou septicemia (SCHMIDT *et al.*, 2007a).

c) Linfócito

Os linfócitos de aves apresentam morfologia semelhante aos linfócitos de mamíferos, células redondas com núcleos localizados centralmente ou ligeiramente excêntricos, com citoplasma basofílico e sem a presença de vacúolos (MITCHELL; JOHNS, 2008). Em muitas espécies de aves, ele é o principal leucócito circulante (CLAVER; QUAGLIA, 2009).

Frequentemente nota-se uma variação no tamanho de linfócitos de aves. Nos esfregaços sanguíneos, é comum observar pequenos linfócitos que se assemelham a trombócitos, mas estes podem ser distinguidos pela coloração do citoplasma, uma vez que os trombócitos apresentam citoplasma incolor (MITCHELL; JOHNS, 2008).

Plasmócitos também podem ser observados no sangue periférico das aves, sendo diferenciado pelo núcleo excêntrico, citoplasma intensamente basofílico e complexo de Golgi distinto (TRHALL *et al.*, 2006).

Nas aves os linfócitos são produzidos na medula óssea, em seguida migram para o timo ou para a Bursa de Fabrícus onde sofrem processos de diferenciação e se tornam funcionais (ALMEIDA *et al.*, 2013). Os linfócitos que sofrem diferenciação na Bursa de Fabrícus são chamados de linfócitos B e são responsáveis pela produção de anticorpos, já os linfócitos que sofrem diferenciação no timo são chamados de linfócitos T.

As imunoglobulinas sintetizadas pelos linfócitos B de aves são classificadas em Imunoglobulina M (IgM), Imunoglobulina Y (IgY) e Imunoglobulina A (IgA), sendo que a IgM é o primeiro anticorpo a aparecer após uma infecção e a IgA é encontrada nas secreções e mucosas (ALMEIDA *et al.*, 2013). A IgY é o principal isotipo de anticorpo, e desempenha um papel biológico semelhante a IgG dos mamíferos (MUNHOZ *et al.*, 2014). O aumento do número de linfócitos geralmente ocorre como um resultado da estimulação antigênica (SCHMIDT *et al.*, 2007a; MITCHELL; JOHNS, 2008).

d) Eosinófilo

Os eosinófilos são granulócitos redondos com núcleo segmentado basofílico e grânulos eosinofílicos arredondados (MITCHELL; JOHNS, 2008). Eosinófilos de codornas japonesas apresentam vacúolos característicos que diferenciam este tipo de célula leucocitária (WITKOWSKI.; THAXTON, 1981).

Embora as suas funções ainda não estejam totalmente esclarecidas, a eosinofilia é geralmente desenvolvida em processos inflamatórios enquanto que antígenos parasitários geralmente não induzem eosinofilia em aves (MITCHELL; JOHNS, 2008).

A ação dos eosinófilos ocorre através da desgranulação de enzimas digestivas sobre a membrana plasmática da célula infectada, além disso, eles moderam as reações anafiláticas, pois os seus grânulos contêm histaminase, responsável pela inibição da histamina encontrada em basófilos e mastócitos (FERNANDES *et al.*, 2013).

e) Basófilo

Os basófilos de aves são leucócitos que contêm grânulos intensamente basofílicos e núcleos redondos ou ovais (MITCHELL; JOHNS, 2008). Normalmente, o seu núcleo não é lobado (TRHALL *et al.*, 2006).

Eles são mais comuns nos esfregaços sanguíneos de aves se comparado a mamíferos, embora sua função ainda seja desconhecida, sugere-se que sua função seja semelhante à dos basófilos de mamíferos. Entre estas funções podemos destacar a participação em reações de hipersensibilidade do tipo IV e processos inflamatórios agudos (MITCHELL; JOHNS, 2008). Além disso, a basofilia pode ser observada em doenças respiratórias e em lesões teciduais severas (SCHMIDT *et al.*, 2007a).

2.2.8. Trombócitos

Os trombócitos são células nucleadas que possuem funções semelhantes as plaquetas de mamíferos, como manter a hemostasia sanguínea, produção de tromboplastina (MITCHELL; JOHNS, 2008) e atividade fagocítica (GERTNER; SANTIN; SAAD, 2008).

Os trombócitos são células difíceis de serem enumeradas por estarem frequentemente agregadas no esfregaço sanguíneo e, geralmente, é classificado como “presente” ou “normal”, “aumentadas” ou “diminuídas” (MITCHELL; JOHNS, 2008; SCHOSSLER, 2013).

A trombocitose em aves pode ser observada em processos inflamatórios crônicos (D'ALOIA *et al.*, 1994).

2.3. Técnicas hematológicas

A principal diferença entre mamíferos é que as aves apresentam os eritrócitos e os trombócitos nucleados, impossibilitando assim contagens automatizadas. Dessa forma, o hemograma é realizado por métodos manuais e contagens indiretas em esfregaços sanguíneos, todavia os valores de referência tendem a variar de acordo com a metodologia utilizada.

Em aves, o sistema Unopette (WISEMAN, 1931), o método de Natt & Herrick (NATT; HERRICK, 1952), solução de azul de toluidina a 0,01% e solução de Ressler-Ecker com azul de cresil brilhante em diluição de 1:200 são as técnicas mais comumente utilizadas para contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer, porém neste método há uma grande dificuldade de diferenciar os pequenos linfócitos dos trombócitos. Em virtude das dificuldades encontradas, nota-se que não há padronização nas metodologias empregadas e mais estudos precisam ser realizados para o aprimoramento das técnicas.

A citometria de fluxo fornece resultados precisos para contagem de trombócitos, leucócitos totais e diferencial, além de diferenciar os linfócitos B e T (BURGESS; DAVISON, 1999; BOHLS et al., 2005; SELIGER *et al.*, 2012), todavia esse método ainda é financeiramente inviável na rotina da clínica veterinária.

Atualmente, alguns estudos em peixes e répteis já mostraram que a metodologia indireta em esfregaços sanguíneos, apesar de ser mais trabalhosa, apresenta maior confiabilidade dos dados quando comparados com a metodologia direta realizada em câmara de Neubauer (ISHIKAWA; RANZANI-PAIVA; LOMBARDI, 2008; TAVARES-DIAS; OLIVEIRA-JÚNIOR; MARCON, 2008).

2.4. Análise bioquímica em aves

2.4.1. Amostras e testes

A maioria das análises bioquímicas pode ser realizada em amostras de plasma ou soro sanguíneo, todavia em aves, geralmente prefere-se o plasma tendo em vista o pequeno volume de sangue disponível (SCHMIDT *et al.*, 2007a). Estas

amostras devem, entretanto, estar isentas de hemólise ou lipemia, pois assim como nos mamíferos, estas alterações interferem nas análises bioquímicas.

Os principais exames bioquímicos realizados em aves são a determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP), glutamato desidrogenase (GLDH), sorbitol desidrogenase (SDH), lactato desidrogenase (LDH), ácidos biliares, creatina-quinase (CK), glicose, colesterol, ureia, ácido úrico, proteínas totais e albumina (SCHMIDT *et al.*, 2007a).

2.4.2. Enzimas

a) Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

As aves apresentam alta atividade da AST no fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e rins, porém a sua concentração e distribuição nos diferentes tecidos varia de acordo com a espécie (RUPLEY, 1999; THRALL *et al.*, 2006).

Segundo Schossler (2013), a necrose hepática geralmente promove um aumento de quatro vezes na atividade da AST em relação ao limite superior normal, enquanto que lesões na musculatura esquelética promovem um aumento de duas a quatro vezes. Todavia, é aconselhado associar a dosagem de creatina-quinase (CK) como uma forma de diferenciar a lesão hepática da muscular, pois em casos de dano muscular a atividade da CK estará aumentada. Vale ressaltar também que alguns estudos já comprovaram que ocorrem variações na atividade dessas enzimas mediante variações fisiológicas (BARBOSA *et al.*, 2010).

A atividade da ALT possui valor limitado como teste para avaliar distúrbios hepatocelulares em aves, pois assim como em equinos e ruminantes, a ALT é encontrada tanto no citosol do hepatócito como no músculo e em outros tecidos nas aves (SCHMIDT *et al.*, 2007a).

Dessa forma, ainda que a AST seja inespecífica, esta é a mais indicada para o diagnóstico de lesão hepática.

b) Gama-glutamilttransferase (GGT) e Fosfatase alcalina (ALP)

Na maioria das espécies de aves, a GGT possui maior atividade nos rins, porém não ocorre elevação na doença renal porque ela é excretada na urina (TRHALL *et al.*, 2006).

A ALP possui pouca atividade no fígado das aves, estando presente em diversos tecidos, nos pulmões, músculo esquelético, testículos, ossos, rins e músculo cardíaco (SCHMIDT *et al.*, 2007a). O aumento da sua atividade sugere crescimento ósseo, reparação de fraturas, osteomielites, neoplasias e condição pré-ovulatória de galinhas (TRHALL *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2007a).

c) Lactato desidrogenase (LDH), glutamato desidrogenase (GLDH) e sorbitol desidrogenase (SDH)

A LDH é menos específica que a AST e ALT para o diagnóstico de lesão hepatocelular, pois após uma lesão hepática ou muscular a sua atividade também aumenta, porém diminui mais rápido que as atividades de AST e ALT, apresentando normalmente valores dentro da referência (THRALL *et al.*, 2006).

A GLDH é sensível para o diagnóstico de lesões graves nos hepatócitos, uma vez que essa enzima está ligada à mitocôndria do hepatócito, porém vale ressaltar que ela possui meia-vida mais curta que a AST e ALT (THRALL *et al.*, 2006).

A SDH é uma enzima citosólica hepatoespecífica, porém também possui meia-vida mais curta que a AST e ALT (THRALL *et al.*, 2006).

2.4.3. Metabólitos e nutrientes

a) Creatinina, ácido úrico e ureia

Na maioria das espécies animais, a dosagem de creatinina é considerada o melhor indicador da integridade renal, todavia, em aves, a creatinina tem pouco valor diagnóstico, porque a creatina é excretada pelos rins antes de ser convertida em creatinina e os laboratórios veterinários não fazem a sua dosagem nos exames de rotina (THRALL *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2007a).

O ácido úrico é o maior produto catabólico das proteínas, nitrogênio proteico e das purinas em aves, constituindo cerca de 60 a 80% do total de nitrogênio

excretado na urina das aves (SCHOSSLER, 2013). A sua secreção praticamente independe da reabsorção de água, por isso a sua determinação é amplamente utilizada para o diagnóstico de doença renal em aves, todavia vale salientar que é necessário perda de 75% da função renal para que haja aumento na sua concentração plasmática (THRALL *et al.*, 2006). Onde, os aumentos nos níveis de ácido úrico podem decorrer de casos de inanição, gota, necrose tecidual maciça e nefropatias (SCHOSSLER, 2013).

Além das causas patológicas, as diferenças fisiológicas entre as diversas espécies de aves, idade e dieta podem influenciar nas concentrações de ácido úrico (SCHMIDT *et al.*, 2007a). Segundo THRALL *et al.* (2006), aves jovens tendem a apresentar menores concentrações de ácido úrico quando comparadas as adultas e aves carnívoras tendem a apresentar maiores concentrações de ácido úrico que as granívoras.

As aves são uricotélicas, ou seja, excretam ácido úrico, substância de baixa toxicidade, desta forma, a concentração plasmática da ureia é muito baixa (THRALL *et al.*, 2006). A concentração da ureia sanguínea é influenciada pela dieta, principalmente pela ingestão de proteínas, hidratação da ave, taxa de excreção renal e função hepática, uma vez que o fígado é o responsável pela sua síntese (SCHMIDT *et al.*, 2007a). Diferentemente do ácido úrico, a concentração da ureia é influenciada pelo estado de hidratação da ave, sendo um teste sensível para detecção de azotemia pré-renal.

Em geral, concentrações de ácido úrico superior a 15 mg/dL indicam alteração da função renal e sua determinação seriada é bastante útil para o monitoramento do tratamento ou da evolução da doença (THRALL *et al.*, 2006).

Dessa forma, a mensuração do teor de ureia e creatinina são indicadores limitados para avaliar a função renal em aves, sendo mais confiável a dosagem do ácido úrico.

b) Proteínas totais

A concentração de proteínas totais em aves é menor que a dos mamíferos, variando entre 2,5 a 4,5 g/dL, porém a produção de ovos pode afetar as concentrações de proteínas totais devido a sua mobilização para os órgãos

reprodutivos das fêmeas, uma vez que as proteínas sintetizadas no fígado são as precursoras da gema (THRALL *et al.*, 2006).

Em relação a determinação da concentração de proteínas plasmáticas, há discordância na literatura sobre a eficácia dos métodos disponíveis (SCHMIDT *et al.*, 2007a). Alguns estudos relatam que não há diferença significativa nos valores de proteínas utilizando refratômetros quando comparados com método de biureto (ANDREASEN *et al.*, 1989; CRAY; RODRIGUEZ; ARHEART, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2008). Todavia, um estudo realizado por Caprita *et al.* (2013), relata que a refratometria fornece valores mais elevados que o método do biureto, podendo estar relacionado ao alto teor de glicose plasmática.

A hiperproteinemia é considerada quando as aves apresentam concentração superior a 4,5 g/dL e uma forma de facilitar a investigação da causa de hiperproteinemia é realizar concomitantemente a verificação da proporção albumina/globulina (THRALL *et al.*, 2006).

c) Albumina

A albumina representa cerca de 40 a 50% das proteínas plasmáticas totais das aves, variando de 0,8 a 2 g/dL (THRALL *et al.*, 2006), sendo dosada comumente para a avaliação da função hepática, estado nutricional, lesões no sistema digestório e hemorragias (SCHMIDT *et al.*, 2007a).

O método para a determinação da albumina que utiliza o verde de bromocresol (BCG) tem sido comumente utilizado em aves (SCHMIDT *et al.*, 2007b; SCHMIDT *et al.*, 2007c; KRUPAKARAN, 2013), mas alguns estudos recomendam que esse método não seja utilizado nesta espécie, pois fornece valores diferentes quando comparados aos resultados de eletroforese de proteínas (CRAY; WACK; ARHEART, 2011). Schmidt *et al.* (2012) relataram que o método de verde de bromocresol promove valores inferiores quando comparada com a eletroforese em gel de agarose (AGE), portanto é aconselhável estabelecer concentrações de albumina no sangue das aves através do método de AGE.

d) Glicose

A concentração da glicose plasmática em aves varia de 200 a 500 mg/dL (THRALL *et al.*, 2006). Quanto ao consumo de glicose *in vitro*, vale ressaltar que a demora na separação do soro ou plasma das células não diminui de forma significativa a concentração de glicose como nos mamíferos, pois os eritrócitos das aves utilizam mais ácidos graxos que glicose como fonte de energia (THRALL *et al.*, 2006).

e) Colesterol e triglicerídeos

As aves no geral, possuem o metabolismo mais acelerado que os mamíferos, dessa forma necessitam de uma maior demanda energética, sendo o colesterol total e triglicerídeos os constituintes comumente avaliados.

O colesterol é sintetizado por vários tecidos, porém o fígado é o principal órgão de síntese do organismo. Ele é excretado na forma de ácidos biliares, seu aumento pode estar relacionado à obstrução biliar, fibrose hepática e hiperplasia do ducto biliar, entre outras causas como a lipemia, alto teor de gordura na dieta e hipotireoidismo, enquanto que a sua diminuição plasmática geralmente ocorre em doenças hepáticas graves, má absorção/digestão intestinal e inanição (THRALL *et al.*, 2006).

Os lipídeos circulantes são derivados da absorção intestinal, síntese que ocorre principalmente no fígado, ou mobilização de reservas corporais em resposta a jejum prolongado (STURKIE, 1976). O estrógeno promove aumentos dos níveis de lipídeos circulantes em aves durante o período de produção de ovos (STURKIE, 1976).

f) Cálcio

Assim como nos mamíferos, o controle do metabolismo do cálcio é mediado pelo paratormônio, calcitonina e pela vitamina D, mas também pode sofrer a ação de outros hormônios como estrógenos, corticosteroides, tiroxina e glucagon (THRALL *et al.*, 2006).

A prolactina e hormônios sexuais aumentam a sua atividade imediatamente antes da postura e está associado ao aumento da concentração de cálcio total no

sangue, por isso, durante a vida reprodutiva, a hipercalcemia é um achado comum em resposta a ação dos estrógenos (STURKIE, 1976; THRALL *et al.*, 2006).

A concentração de cálcio em aves não poedeiras varia de 8 a 11mg/dL e 20 a 30 mg/dL em poedeiras, onde cerca de 30 a 50% do cálcio plasmático estão ligados à albumina (THRALL *et al.*, 2006).

A hipocalcemia é considerado quando o teor de cálcio plasmático é inferior a 8 mg/dL e as principais causas relacionadas a esse distúrbio é o excesso de fósforo, deficiência de cálcio e vitamina D, alcalose e hipoalbuminemia (THRALL *et al.*, 2006).

g) Bilirrubinas

Na literatura há raros relatos de icterícia em aves, uma vez que aves possuem pequena quantidade da biliverdina redutase, sendo a biliverdina o seu principal pigmento biliar, dessa forma as bilirrubinas não são indicadores de distúrbios hepatobiliares (THRALL *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2007a). Em várias espécies de aves, a cor amarelada do plasma advém de carotenóides e não deve ser confundida com hiperbilirrubinemia (THRALL *et al.*, 2006).

Apesar de ser encontrada em pequenas quantidades, alguns pesquisadores estão tentando estabelecer valores de referências das suas concentrações basais (SCHOLTZ *et al.*, 2009).

2.5. Imunologia em aves

Nas aves, assim como nos mamíferos, a resposta imune contra patógenos de uma forma geral é dividida em imunidade inata (natural) e imunidade adquirida (específica ou adaptativa) (ROCHA *et al.*, 2014), porém a ausência de linfonodos e a presença de um órgão linfoide específico, a Bursa de Fabrício, os diferencia daqueles outros (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Diversos órgãos fazem parte do sistema imunológico das aves e são divididos em órgãos linfoides primários e secundários. Os órgãos linfoides primários são a medula óssea, a Bursa de Fabrício e o timo, e os secundários são o baço, placa de

Peyer, glândula Harderiana e tecidos linfoides associados à conjuntiva (CALT), aos brônquios (BALT) e ao intestino (GALT) (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Os componentes da resposta imune inata incluem as barreiras físicas e químicas (ERF, 2004), células fagocíticas (heterófilos, monócitos e células dendríticas), moléculas do sistema complemento e anticorpos naturais (GERTNER; SANTIN; SAAD, 2008; FERNANDES *et al.*, 2013). A imunidade celular é considerada a primeira linha de defesa contra patógenos até que a imunidade adquirida se desenvolva (ROCHA *et al.*, 2014).

A imunidade passiva ocorre pela transferência de anticorpos da matriz para a gema do ovo em desenvolvimento (FERNANDES *et al.*, 2013), enquanto que a imunidade adquirida é induzida pela exposição ao antígeno (ROCHA *et al.*, 2014).

A imunidade adquirida é subdividida em resposta imune humoral e celular, na qual há o desenvolvimento de uma memória imunológica, caracterizada pela diferenciação e expansão clonal de linfócito B ou T específico em resposta a um antígeno (FERNANDES *et al.*, 2013).

Os linfócitos T são classificados em auxiliares (“helpers”), citotóxicos e células Natural Killer (NK). Esta última é capaz de induzir à apoptose células tumorais e mediar a imunidade contra células infectadas por vírus (GERTNER; SANTIN; SAAD, 2008).

Uma forma de avaliar a atividade do sistema imunológico das aves é através da verificação do peso dos órgãos linfoides, pois o seu aumento indica uma maior atividade do sistema imune. Os órgãos comumente avaliados são a Bursa de Fabrícus e o timo (LAGANÁ *et al.*, 2005), responsáveis, respectivamente, pelo processo de diferenciação dos linfócitos B e T (FERNANDES *et al.*, 2013). Os órgãos linfoides secundários também podem ser avaliados, uma vez que a resposta imune humoral é desenvolvida nesses locais (FERNANDES *et al.*, 2013).

No entanto, Naukkarinen e Sorvari (1984) relatam que após a maturação sexual, alguns órgãos evoluem. Dessa forma, tornam-se necessárias investigações sobre a dinâmica da imunidade das aves, para que possamos caracterizar a influência destas mudanças sobre a dinâmica de leucócitos circulantes.

2.6. Influência da idade sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos em aves

Em virtude da importância econômica da espécie, nota-se um crescente aumento nos estudos relacionados às exigências nutricionais, levantamento epidemiológico de doenças e bem-estar em codornas (MUNHOZ *et al.*, 2004; ROLL *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2011), por isso diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar a influência de fatores fisiológicos sobre o hemograma das aves, porém, a maioria das pesquisas conduzidas utilizaram um número amostral reduzido, ou foram pontuais (ATWAL; MCFARLAND; WILSON, 1964; SCHMIDT *et al.*, 2007b; SCHMIDT *et al.*, 2007c; BORSA, 2009; BERNARDINO *et al.*, 2014; SUJATA; MOHANTY; MALLIK, 2014), o que resulta num desvio de médias muito grande, e, conseqüentemente, em uma menor confiabilidade nos resultados.

Schmidt *et al.* (2007c) realizaram um estudo com Ring-necked Pheasant, no qual verificaram diferenças significativas nos parâmetros hematológicos em relação ao sexo e idade dos animais. Schmidt *et al.* (2007b) ainda com a mesma espécie, verificaram que a faixa etária influenciou nos parâmetros bioquímicos apresentados pelas aves.

Borsa *et al.* (2009) realizaram um estudo com frangos de corte, todavia os seus resultados mostraram que essa espécie não apresentou diferenças nos valores médios das variáveis tanto do eritrograma quanto do leucograma.

Nos Estados Unidos, Atwal, Mcfarland e Wilson (1964) realizaram um estudo que visou descrever as variações dos parâmetros hematológicos de codornas japonesas desde o seu nascimento até a maturidade sexual, sendo encontrados variações significativas nos parâmetros estudados.

Na Índia, Sujata, Mohanty e Mallik (2014) estudaram as variações semanais no eritrograma de codornas japonesas desde a primeira até a nona semana de vida e em todos os parâmetros foram observadas variações significativas estatisticamente.

Tadjalli, Nazifi e Eemanparvar (2003) descreveram a morfologia celular normal de codornas japonesas, evidenciando que aves com menos de uma semana de idade apresentam eritrócitos de tamanho maior (12,42 μm) quando comparadas

com aves de 3 e com mais de 5 semanas de idade (10,86 μm). Esse fato explica os valores de volume globular médio serem maiores em aves jovens.

Já em um estudo realizado na Nigéria por Aina e Ajibade (2014), também observaram diferenças significativas nos parâmetros hematológicos à medida que a ave ficava mais velha.

Quanto a atividade da medula óssea, Nazifi, Tadjalli e Mohaghheghzadeh (1999) em estudo realizado no Irã, verificaram que a idade promoveu diferenças significativas nas populações de diversas linhagens celulares da medula óssea de codornas japonesas. No entanto, resta saber o quanto a variação dessa dinâmica na atividade da medula óssea afeta os parâmetros hematológicos de acordo com a idade.

Barbosa *et al.* (2010) avaliaram o peso do fígado e as atividades totais da AST e da ALT. Neste experimento foi observado um crescimento linear no peso do fígado e nas atividades dessas enzimas à medida que a ave ficava mais velha. Além disso, os resultados desse estudo mostraram que a atividade hepática da AST foi maior que a atividade da ALT, estabelecendo uma diferença de aproximadamente cinco vezes.

Esses estudos mostram que a idade promove diferenças significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas, todavia há uma necessidade de pesquisas nesta área nas condições brasileiras, pois ainda não existem estudos no Brasil que avaliaram o grau dessa influência sobre esses parâmetros em codornas japonesas criadas no país. Além disso, nota-se uma escassez de parâmetros referenciais e estudos fisiológicos da espécie.

Capítulo I

**Avaliação da influência da idade sobre os parâmetros
hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (*Coturnix
coturnix japonica*)¹**

Original Article**The evaluation of the age influence in the hematological and biochemical parameters of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)**

M.G.S. Bernardino*, E.G. Silva, R.T. Sousa, R.P. Lima, D.F.S. Angelo, F. Satake

Department of Veterinary Science, College of Agricultural Sciences, Federal University of Paraiba, Areia, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 083 999912170.
E-mail address: maryangel_ufpb@hotmail.com

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the influence of age on hematological and biochemical parameters of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Seven samples were collected with quail at 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 80 days old. Blood samples were collected with anticoagulant and without anticoagulant for the complete blood count and biochemical analysis, respectively. After blood sample collection, the birds were euthanized and the bursa of Fabricius, thymus, spleen and liver were weighed on a precision scale. It was calculated normal proportion of heterophil:lymphocyte (H/L), as well as, the measurement of the total area of 290 erythrocytes per age group. Young birds showed lower average values of hematocrit, red blood cells and hemoglobin concentration. In addition, they exhibit higher mean values of total area of erythrocyte and mean corpuscular volume. Furthermore, young birds also have the highest average values of the ratio of H/L as it showed the highest average values of heterophile and lower average values of lymphocytes. On the same way, young birds showed the highest average values of alkaline phosphatase and birds with 80 days showed the highest average values of total protein, calcium and triglycerides. Therefore, the results of this study serve as insights for the evaluation of hematological and biochemical parameters of the specie, due to these variations are physiological and should not be associated with diseases.

Keywords: Biochemistry; Birds; Blood count; Blood parameters; Hematology

Introduction

The Japanese quail is a bird belonging to the order *Galliformes*, *Phasianidae* family, genus *Coturnix* and species *C. japonica* (Vali, 2008). The first record of wild Japanese quail came up in the eighth century in Japan (Vali, 2008), then began its commercial exploitation.

The most widespread sub-species in Brazil is *Coturnix coturnix japonica*, and its expansion in the country is due to its great potential for egg production, rapid growth and early sexual maturity. Thereby, they require small space, low feed intake, short cycle production, great productive longevity, and low initial investment associated with rapid payback (Pastore et al., 2002).

The Japanese quail industry is increasing in expansion in Brazil (IBGE, 2013) and has become a very important activity in the Brazilian economic scenario, generating jobs and income for the population. The knowledge of hematology is an essential tool for the early detection of diseases, so that, first of all it is necessary that the veterinary practitioner understands changes in hematological parameters due to physiological factors. Then, will be able to interpret the blood count correctly, identify pathological changes, and perform an accurate diagnosis. Thus, it is required to carry out studies that characterize their physiological aspects, as well as to establishing reference values of hematological and biochemical parameters.

Consequently, the study aimed to evaluate the influence of age on hematological and biochemical parameters of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).

Material and methods

The project was approved by the Ethics Committee for Animal Use in the Federal University of Paraíba and registered under the protocol n° 027/2015.

Animals and sample collection

The birds were acquired from commercial farms with only one day old, then housed in a barn with 8x4x3m (width x length x height) with screened vents and artificial heating. The floor was covered with bagasse sugarcane and the birds received food and water *ad libitum*. Initially, the birds were monitored four times daily and after reach to 21 days old the monitoring was reduced to three times a day. Until 42 days of age, the feed was provided as growth's diet and being replaced by the laying diet (Rostagno et al., 2011).

Seven collections were taken at ages 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 80 days. In total, 224 quail were evaluated whither 32 quail per collection. Each bird was individually weighed. The blood sample was collected by cardiac puncture, wherein 1 mL was kept with EDTA 5% for the complete blood count, and about 2 mL intended to obtain serum. Then the birds were euthanized by cervical dislocation and some organs (bursa of Fabricius, thymus, spleen and liver) were collected and weighed on a precision scale (Shimadzu Ay 220). The relative weight of the lymphoid organs was determined by the ratio of organ weight (g) and weight of the bird (g). As well as, it was determined the relationship between the bursa of Fabricius and spleen: [Weight of Bursa (g)/Weight spleen (g)].

Hematological analysis

The blood smears was made immediately after the collection and performed a blood dilution (1:200) in citrate formaldehyde solution for red blood cell count in Neubauer chamber. The hematocrit (Hct) was determined by microhematocrit method (Goldenfarb et

al., 1971) and the concentration of hemoglobin was determined by cyanmethemoglobin method modified (Thrall et al., 2006). The blood smears were stained by May-Grünwald-Giemsa method and intended to the determination of the overall white blood cell (WBC), differential count and thrombogram (Martins et al., 2004), as well as the relation heterophil:lymphocyte (Campo and D'Avila, 2002). It was performed to measure the total area of erythrocytes (μm), evaluated about 290 erythrocytes by age group. The images of the erythrocytes were obtained and analysed through a digital camera (Moticam 2500) coupled to a optical microscope Zeiss, equipped with an image analysis system (Motic Images Plus, version 2.0).

Biochemical analysis

The serum was used to measure concentrations of total protein, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), triglycerides, total cholesterol, urea, uric acid and calcium by automatic spectrophotometer Mindray (BS-120) using commercial reagent kits.

The laboratory tests described above were carried out in the Clinical Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of the Department of Veterinary Science, Federal University of Paraíba.

Statistical analysis

First, it was applied to the groups the Shapiro-Wilk normality test through the statistical program BioEstat 5.0. Then, the comparison between two groups was made by t-test or the Mann-Whitney U. Finally, the comparison of more than two groups was taken by Tukey test or Kruskal-Wallis test at 5% significance level.

Results

It has been shown statistically that the average values of liver weights showed linear increases with the weight of the bird until 80 days of age (Table 1). The average values of the weight of lymphoid organs (bursa of Fabricius, thymus and spleen) showed a linear increase up to 42 days old. However, the birds at 80 days of age showed a decrease in the average weight of all lymphoid organs assessed ($P<0.05$). The average weight of the bursa of Fabricius in birds with 80 days of age was similar to the mean values of the weights observed in birds with 7 and 14 days of age. The thymus is the organ that has the highest rate of decrease in weight with 80 days of age. Therefore, the average value was similar to that observed in birds 7 days of age. On the other hand, the spleen was the organ which had the lowest weight decrease rate at the same age, whose average value was similar to that observed in birds 21, 28 and 35 days of age. Birds up to 42 days old presented bursa of Fabricius with highest weight compared to spleen weight. Nevertheless, birds with 80 days of age had higher spleen weight compared to the weight of bursa of Fabricius.

Thus, the ratio between the weight of the organs and body weight of the bird was affected by increase or decrease of organ weight. The mean values of the ratios between the bursa of Fabricius/bird and bursa of Fabricius/spleen showed a linear increase up to 35 days old. However, for the same ratio there was a decrease in birds at 80 days of age. The mean value of the spleen/bird ratio was constant up to 42 days old, but decreased at 80 days old. The mean value of liver/bird ratio showed a linear decrease up to 42 days of age, increasing in the 80 days of age.

Table 2 shows that birds with 7 days of age had the lowest average values of hematocrit (Hct), hematimetric and hemoglobin ($P<0.05$). Birds with 80 days of age showed

the highest average values of hemoglobin and Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) ($P<0.05$). The highest average Mean Corpuscular Volume (MCV) values were presented by quail at 7 and 14 days of age ($P<0.05$). After 21 days of age, the average MCV values did tend to stabilize, no significant differences up to 80 days.

The average values of relative lymphocyte count showed a linear increase in quail with 7 and up to 42 days of age. Birds at 7 days old showed 39.5% and they at 42 days 73.5% (Table 2), observing a total increase of lymphocytes by 34% (Table 3). The results in Table 3 show that the greatest percentage increase in the relative rates of lymphocyte were observed between 14 and 21 days (11.3%) and with quail between 21 and 28 days (13.3%). Concurrently, the average values of heterophils relative score showed a linear decrease in quail with 7 up to 42 days of age. Birds at 7 days of age showed 55.5% of heterophils and birds at 42 days of age showed only 20.5% (Table 2). The overall decrease of heterophils was 35% (Table 3). The results in Table 3 show that the greatest decrease rate of the count on heterophil quail were observed between 14 and 21 days of age (15%). As well as, for quail between 21 and 28 days of age (8%). Thus, from 21 days of age the lymphocyte was the predominant leukocytes in the blood stream followed by heterophils, eosinophils, monocytes and basophils.

It has been shown statistically that the smallest average value of the total WBC count was observed in quail at 7 days of age. The similar results were observed at 21, 28 and 80 days of age. Nevertheless, the highest average values of the total leukocyte were observed on quail to 14, 35 and 42 days (Table 2).

The lowest average value of absolute lymphocyte count was observed in the birds at 7 days of age. There is a linear leukocyte increase until 42 days of age, but a decrease is noted at 80 days of age ($P<0.05$). Birds at 7 days of age showed the lowest average value of

eosinophils ($P<0.05$). The greatest mean heterophils were seen in quail at 7 and 14 days of age ($P<0.05$). It is noted a decrease in heterophil/lymphocyte ratio between 7 to 42 days of age with an increase at 80 days of age ($P<0.05$).

It is noteworthy that birds at 80 days of age showed a decrease of the average values of the weights of lymphoid organs and concomitant decrease in mean values of relative and absolute lymphocyte count. The quails at 80 days showed mean absolute value of heterophils count similar to those observed in birds with 21, 28, 35 and 42 days of age ($P<0.05$). There was a correlation between the results of the lymphoid organs weight and heterophil/lymphocyte. So that, the weight of lymphoid organs increased and the ratio heterophil/lymphocyte decreased. In addition, the weight of these organs at 80 days decreased, and concomitantly, the heterophil/lymphocyte was heightened (Figure 1).

Due to the statistical differences presented in hematological parameters under the influence of age, there was a comparison gathering the birds analyzed in two classes of age groups (Table 4). Showing statistically that there are marked differences in hematological parameters in young birds up to 14 days old compared to birds aged 21-80 days.

The youngest quail showed comparatively higher average values of the total area of erythrocytes and as they grew older showed a linear decrease in this variable (Table 5). After reaching 35 days of age, the average values of the total area of erythrocytes tended to stabilize. Thus, when comparing the average values of the total area of quail erythrocytes at 7, 14, 21 and 28 days with birds after 35 days, one can observe an increase of the total area of erythrocytes 18%, 8% and 4-6% respectively.

Birds with 80 days of age had a significant increase (higher than 38%) in total protein concentration (Table 6). Mean values for ALT activity progressively decreased from 21 to 42 days of age but increasing in the 80 days of age ($P<0.05$). The highest average value of the

AST activity was observed in quail with 80 days of age ($P < 0.05$). The mean ALP activity in quail gradually decreased from 7 to 80 days of age ($P < 0.05$). Birds with 80 days of age also had a significant increase (over 15 times) in the concentration of triglycerides. The average values of calcium concentration increased progressively from 21 to 80 days of age ($P < 0.05$). Birds with 80 days of age showed an increase of more than three times in calcium concentration.

Discussion

The evaluation results of the weight of the lymphoid organs revealed involution of the bursa of Fabricius, spleen and thymus in quails at 80 days of age. Despite of the spleen involution, the weight of spleen exceeds the weight of the bursa of Fabricius. The involution of the bursa of Fabricius observed in this study is consistent with the results described by Khenenou et al. (2012) in chickens. Whom has reported that the onset of the bursa of Fabricius involution occurs after the tenth week of growth and reaches complete regression at the 27th week remaining in the fibrous state in adult birds.

In mammals is not observed progressive increase in red blood cell production. In addition, some authors have reported that some species may have increased such constituents in early life (Lorenzo et al., 2012; Lima et al., 2015). This apparent increase in the red blood cells production in birds may be related to an increased need for oxygen to organs and tissue growth. Furthermore, since birds have a metabolism and faster growth compared to other animal species. This increase in circulating erythrocytes and increased MCV in young birds also was observed by Atwal et al. (1964), Aina and Ajibade (2014) and Sujata *et al.* (2014).

In addition, birds up to 14 days of age had higher mean values of MCV due to the presence of red blood cells with higher average values of total area. These data correlate with

the findings of Tadjalli et al. (2003). Whom described the normal cell morphology of Japanese quails, and quail with less than one week old showed greater erythrocytes length compared to older birds.

The increase in the average value of the hemoglobin concentration observed in quails with 80 days of age may have been overestimated due to the presence of lipemia, which is a common finding in birds laying.

Japanese quail in the first two weeks of life showed the highest heterophils values. The prevalence of this type of leukocyte in these ages might be related to the role that cell in the body. Moreover, the heterophil has high power phagocytic and cell action as the front line of defense against pathogens (Rocha et al., 2014). Hence, during the development of acquired immunity, there is a decrease in mean heterophils and increase in average values of circulating lymphocytes.

The weight of lymphoid organs affected in some hematological parameters. Thereby, birds up to 42 days of age showed higher average values of the weights of organs. As a result, the increase in percentage mean values and absolute lymphocyte were observed. Likewise, this hypothesis is reinforced by the fact that quails at 80 days of age presented a decrease of the average values of the weights of these organs; as well as, the decrease in percentage and absolute averages of circulating lymphocytes.

The differences observed in the mean values of lymphocytes and heterophils directly affect the ratio H/L. This parameter is commonly used in the stress evaluation in welfare in poultry studies. The results show a linear decrease of the average values of the ratio H/L on birds with 7 up to 42 days of age. The study by Schmitd et al. (2007) with Ring-necked also noted the predominance of heterophils in the first weeks of life and linear decrease in H/L ratio.

Hematologic findings show that there are significant differences when comparing different age groups. Whereas birds with 21, 28, 35, 42 and 80 of age showed results closer to each other. Along these lines, it is advised to be established separately reference values for quail up to 14 days of age. Thereby, young birds had lower average values of packed cell volume, red blood cells, and hemoglobin concentrations. In addition, they had higher mean values of total area of erythrocytes and concomitantly higher average values of mean corpuscular volume. Furthermore, young birds had higher mean values of heterophile and lower average values lymphocytes, and consequently higher ratio H/L.

The results of the biochemical parameters also showed significant differences on the influence of age. It has showed an increase of the mean values of total serum protein, calcium and triglycerides in birds at 80 days of age. According Sturkie (1976), the increase of these components occurs due to estrogen action in the reproductive period. Parallely, Thrall et al. (2006) also reported that there is the mobilization of proteins to the reproductive organs of females.

The progressive decrease of ALP activity observed in the study may be related to bone growth that is faster in young birds (Thrall et al., 2006).

In birds, the Unopette system (Wiseman, 1931), method of Natt & Herrick (Natt and Herrick, 1952), toluidine blue solution 0.01%, and solution Rees-Ecker associated with the brilliant cresyl blue dilution 1:200 are the techniques most commonly used for total count of erythrocytes, leukocytes, and platelets. Despite of these methods, there is a great difficulty in differentiating between small lymphocytes and thrombocytes. Currently, some studies in fish and reptiles have shown that the indirect method on blood smears, although harder to make it, has higher data reliability when compared to direct method performed in a Neubauer chamber (Ishikawa et al., 2008; Tavares-Dias et al., 2008). Wherefore, it is noteworthy that the results

of leukocytes and total thrombocytes obtained in this study were obtained through indirect methodology in blood smears. Consequently, it is suggested with this experiment the normal laboratory values for hematology and biochemical parameters of the specie.

Conclusions

The results showed variations occurring in clinical biochemical and hematological parameters in Japanese quail according to age. Thus, these results serve as a warning for the evaluation of hematological parameters of the specie. Due to these variations are physiological and should not be associated with diseases.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Thankfulness

The authors thank to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) by providing grants and collaborators George Luís Dias dos Santos and Vinícius Mendes Gonçalves who contributed to this research.

References

- Atwal, O.S., Mcfarland, L.Z., Wilson, W.O., 1964. Hematology of *Coturnix* from Birth to Maturity. Poultry Science 43, 1392-401.
- Aina, O.O., Ajibade, T., 2014. Age-related changes in haematologic parameters of cage-raised Japanese quails (*Coturnix japonica*). Journal of Veterinary Medicine and Animal Health 6, 104-8.

- Campo, J.L., Dávila, S.G., 2002. Influence of mating ratio and group size on indicators of fearfulness and stress hens and cocks. *Poultry Science* 81, 1099-103.
- Goldenfarg, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology* 56, 35-9.
- IBGE, 2013. Produção da Pecuária Municipal. ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf (accessed 23 January 2016).
- Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., 2008. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science* 13, 54-63.
- Khenenou, T., Melizi, M., Benzaoui, H., 2012. Morpho-histological Study of the Bursa of Fabricius of Broiler Chickens during Post-hatching Age. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 6, 12-27.
- Lima, M.B., Monteiro, M.V.B., Jorge, E.M., Campello, C.C., Rodrigues, L.F.S., Viana, R.B., Monteiro, F.O.B., Costa, C.T.C., 2015. Intervalos de referência sanguíneos e a influência da idade e sexo sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos de ovinos da raça Santa Inês criados na Amazônia Oriental. *Acta Amazonica* 45, 317-22.
- Lourenço, M.L.G., Takahira, R.K., Machado, L.H.A., Moutinho, F.Q., Ferreira, H., Balieiro, J.C.C., Machado, L.P., Fonteque, J.H., 2012. Monitoramento de parâmetros laboratoriais em gatos sem raça definida durante o período neonatal. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32, 25-31.
- Martins, M.L., Pilarsky, F., Onaka, E.M., Nomura, D.T., Fenerick Jr., J., Ribeiro, K., Myiazaki, D.M.Y., Castro, M.P., Malheiros, E.B., 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim do Instituto de Pesca* 30, 71-80.
- Natt, M.P., Herrick, C.A.A., 1952. New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science* 31, 735-8.
- Pastore, S.M., Oliveira, W.P., Muniz, J.C.L., 2012. Panorama da coturnicultura no Brasil. *Revista Eletrônica Nutritime* 9, 2041-9.
- Rocha, T.M., Andrade, M.A., Santana, E.S., Fayad, A.R., Matias, T.D., 2014. Aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos de doenças imunossupressoras em aves. *Enciclopédia Biosfera* 10, 355-79.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras de aves e

- suínos. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. Third ed. Viçosa, MG, Brazil. 157-66.
- Sturkie, P.D., 1976. Avian physiology. Third ed. Springer-Verlag: New York, NY, USA. pp. 302-30.
- Sujata, P., Mohanty, P.K., Mallik, B.K., 2014. Haematological analyses of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) at different stages of growth. International Research Journal of Biological Sciences 3, 51-3.
- Schmidt, E.M.S., Paulillo, A.C., Dittrich, R.L., Elizabeth Santin, E., Silva, P.C.L., Beltrame, O., Oliveira, E.G., 2007. The effect of age on hematological and serum biochemical values on juvenile Ring-Necked Pheasants (*Phasianus colchicus*). International Journal of Poultry Science 6, 459-61.
- Tadjalli, M., Nazifi, S., Eemanparvar, A., 2003. Normal cellular morphology of the blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Comparative Clinical Pathology 12, p. 102-5.
- Tavares-Dias, M., Oliveira-Júnior, A.A., Marcon, J.L., 2008. Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle, *Podocnemis expansa*): an analysis and discussion. Acta Amazonica 38, 351-6.
- Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G., 2006. Hematologia e bioquímica veterinária. Second ed. Roca, São Paulo, SP, Brazil. pp. 215-460.
- Vali, N., 2008. The Japanese Quail: A Review. International Journal of Poultry Science 7, 925-31.
- Wiseman, B.K., 1931. An improved method for obtaining the total white cell count in avian blood. Proc Soc Exp Biol Med 28, 1030-3.

Table 1

Mean values/median followed by standard deviation/interquartile range of the total weight of the birds and weight of organs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in different age groups.

Organ	Age (days)						
	7	14	21	28	35	42	80
Bird (g)	18.4 ^g ±	41.0 ^f ±	64.8 ^e ±	90.6 ^d ±	109.7 ^c ±	123.2 ^b ±	161.8 ^a ±
	2.3	5.8	8.7	7.9	9.8	11.2	7.3
Bursa (g)	0.02 ^e ±	0.06 ^d ±	0.11 ^c ±	0.16 ^b ±	0.22 ^a ±	0.23 ^a ±	0.06 ^{de} ±
	0.01	0.02	0.04	0.04	0.05	0.06	0.02
Spleen (g)	0.02 ^e ±	0.04 ^d ±	0.06 ^{cd} ±	0.07 ^c ±	0.10 ^{ab} ±	0.11 ^a ±	0.09 ^{bc} ±
	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.02
Thymus (g)	0.04 ^e ±	0.11 ^d ±	0.22 ^c ±	0.33 ^b ±	0.36 ^{ab} ±	0.47 ^a ±	0.03 ^e ±
	0.03	0.04	0.10	0.12	0.08	0.27	0.01
Liver (g)	0.8 ^f ±	1.4 ^e ±	1.9 ^{de} ±	2.3 ^c ±	2.8 ^b ±	2.9 ^b ±	5.1 ^a ±
	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	1.1
Bursa/Bird (x10 ³)	1.2 ^c ±	1.4 ^{bc} ±	1.7 ^{ab} ±	1.7 ^{ab} ±	2.0 ^a ±	1.9 ^a ±	0.3 ^d ±
	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.2
Spleen/Bird (x10 ³)	0.8 ^a ±	0.9 ^a ±	0.8 ^a ±	0.8 ^a ±	0.9 ^a ±	0.9 ^a ±	0.5 ^b ±
	0.5	0.4	0.6	0.4	0.4	0.4	0.3
Thymus/Bird (x10 ³)	2.5 ^b ±	2.4 ^b ±	3.5 ^a ±	3.7 ^a ±	3.3 ^a ±	4.0 ^a ±	0.2 ^c ±
	1.7	0.9	1.0	1.3	0.9	1.6	0.1
Liver/Bird	42.5 ^a ±	34.4 ^b ±	29.4 ^{cd} ±	25.3 ^{de} ±	25.1 ^e ±	23.8 ^e ±	31.7 ^{bc} ±

($\times 10^3$)	10.2	8.4	3.7	3.0	3.3	3.4	8.0
Bursa/Spleen	1.5 ^c \pm	1.4 ^{bc} \pm	1.8 ^{ab} \pm	2.4 ^a \pm	2.4 ^a \pm	2.2 ^a \pm	0.8 ^d \pm
	0,9	1.3	1.3	1.2	1.4	1.3	0.5

Where: Values with different letters in the same row differ by Tukey test or Kruskal-Wallis test at 5% significance.

Table 2

It shows the mean values/median followed by standard deviation/interquartile range of the hematological parameters of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in different age groups.

		Age (days)						
		7	14	21	28	35	42	80
Hct (L/L)		0.33 ^e ±	0.36 ^{cd} ±	0.35 ^{de} ±	0.35 ^{de} ±	0.38 ^{bc}	0.40 ^a ±	0.39 ^{ab} ±
		0.04	0.02	0.04	0.03	± 0.03	0.03	0.05
Eri (x10 ¹² /L)		1.9 ^e ±	2.2 ^d ±	2.3 ^{cd} ±	2.3 ^{cd} ±	2.5 ^b ±	2.7 ^a ±	2.6 ^{ab} ±
		0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.5
Hb (g/L)		70.2 ^f ±	78.3 ^{cd} ±	74.1 ^{def} ±	79.9 ^{cd} ±	80.7 ^c ±	83.5 ^{bc} ±	97.2 ^a ±
		0.9	0.8	0.7	0.6	0.8	0.5	1.5
MCV (f/L)		178.7 ^a ±	163.5 ^b ±	151.8 ^c ±	153.7 ^c ±	149.2 ^c	149.6 ^c ±	151.0 ^c ±
		13.3	8.8	8.5	9.4	± 11.4	8.4	13.7
MCHC (%)		21.2 ^c ±	21.6 ^{bc} ±	21.1 ^c ±	22.8 ^b ±	21.5 ^c ±	20.9 ^c ±	24.6 ^a ±
		1.8	1.6	1.7	1.2	1.7	0.7	1.9
Tro (x10 ⁹ /L)		37.2 ^a ±	41.3 ^a ±	30.9 ^{ab} ±	28.3 ^{bc} ±	25.8 ^{bc}	30.8 ^{ab} ±	25.7 ^{bc} ±
		15.6	11.3	13.3	12.3	± 14,0	10.9	18.1
Relative values (%)	Mon	1.0 ^a ±	1.0 ^{abcd} ±	1.0 ^{ab} ±	0.0 ^{bcd} ±	0.0 ^{bcd} ±	1.0 ^a ±	0.5 ^{abc} ±
		1.3	1.9	1.5	0.5	0.5	0.5	1.5
	Linf	39.5 ^d ±	43.3 ^d ±	54.5 ^{cd} ±	67.8 ^{abc} ±	71.3 ^{ab}	73.5 ^a ±	58.8 ^{bc} ±
		18.0	17.5	18.0	14.6	± 9.4	14.8	25.0

Eos	1.5 ^c ±	2.8 ^{abc} ±	3.5 ^{ab} ±	3.5 ^{bc} ±	4.0 ^{ab} ±	4.5 ^{ab} ±	4.0 ^{ab} ±
	1.8	3.3	2.0	3.1	2.6	3.3	3.0
Het	55.5 ^a ±	52.0 ^{ab} ±	37.0 ^{bc} ±	29.0 ^{cde} ±	23.5 ^{de}	20.5 ^e ±	33.8 ^{cd} ±
	18.3	16.4	18.3	15.0	± 9.1	12.0	21.5
Baso	0.5 ^{ab} ±	0.0 ^{bcd} ±	0.5 ^{bcd} ±	0.0 ^d ±	0.0 ^d ±	0.5 ^{bcd} ±	0.5 ^{ab} ±
	0.8	0.4	1.0	0.0	0.5	0.5	1.0
WBC (x10 ⁹ /L)	9.4 ^e ±	13.7 ^{abcd}	10.7 ^{cde} ±	11.0 ^{cde} ±	14.0 ^{abcd}	17.5 ^a ±	10.5 ^{de} ±
	7.4	± 6.5	6.7	4.9	± 8.6	6.3	6.0
Mon	0.1 ^{abc} ±	0.1 ^{ab} ±	0.1 ^{abc} ±	0.0 ^{cd} ±	0.0 ^{bcd} ±	0.1 ^a ±	0.1 ^{abc} ±
	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
Linf	3.6 ^f ±	6.8 ^{de} ±	5.9 ^{def} ±	7.5 ^{cde} ±	10.0 ^{bc}	11.5 ^{ab} ±	6.4 ^{de} ±
	2.0	5.2	2.3	4.3	± 4.3	4.8	2.4
Eos	0.1 ^c ±	0.4 ^{ab} ±	0.4 ^{ab} ±	0.4 ^{bc} ±	0.6 ^{ab} ±	0.7 ^a ±	0.5 ^{ab} ±
	0.1	0.7	0.4	0.4	0.5	0.6	0.5
Het	5.7 ^{ab} ±	7.1 ^a ±	3.9 ^b ±	3.1 ^b ±	3.5 ^b ±	3.8 ^b ±	3.4 ^b ± 3.6
	4.9	4.5	3.7	1.6	2.0	2.5	
Baso	0.0 ^{ab} ±	0.0 ^{bcd} ±	0.0 ^{abcd} ±	0.0 ^d ±	0.0 ^{bcd} ±	0.1 ^{abc} ±	0.1 ^a ± 0.2
	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	
H/L	1.5 ^a ±	1.2 ^{ab} ±	0.7 ^{bc} ±	0.4 ^{bcd} ±	0.3 ^{cd} ±	0.3 ^d ±	0.6 ^c ± 0.7
	1.0	0.8	0.5	0.3	0.2	0.3	

Where: Hct - Hematocrit, Eri - total erythrocytes, Hb - hemoglobin, MCV - mean corpuscular volume, MCHC - mean corpuscular hemoglobin concentration, TPP - total plasma proteins, Tro - thrombogram, Mon - monocyte, Linf - lymphocyte, Eos - eosinophil, Het - heterophils, Baso - basophils, WBC - white blood cell count, and H/L - heterophil/lymphocyte ratio.

Values with different letters in the same row differ by Tukey test or Kruskal-Wallis test at 5% significance.

Table 3

The percentage values of the increase and decrease of lymphocytes and heterophils in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in different age groups.

Age (days)	Lymphocyte		Heterophil	
	Relative	Cumulative	Relative	Cumulative
	increase (%)	increase (%)	decrease (%)	decrease (%)
14	3.8	3.8	3.5	3.5
21	11.3	15.0	15.0	18.5
28	13.3	28.3	8.0	26.5
35	3.5	31.8	5.5	32.0
42	2.3	34.0	3.0	35.0

Table 4

The comparison of hematological parameters of two classes of age of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).

Variables	Days of age				P
	7 to 14		21 to 80		
	Med ± QD	Total range	Med ± QD	Total range	
Hct (L/L)	0.35 ^b ± 0.05	0.27 - 0.41	0.38 ^a ± 0.05	0.30 - 0.51	<0.01
Eri (x10 ¹² /L)	2.1 ^b ± 0.5	1.4 - 2.7	2.5 ^a ± 0.4	1.6 - 4.0	<0.01
Hb (g/L)	7.5 ^b ± 1.4	5.3 - 9.2	8.1 ^a ± 1.1	5.8 - 13.3	<0.01
MCV (f/L)	167.5 ^a ± 23.4	149.4 - 201.4	150.1 ^b ± 9.3	113.9 - 193.6	<0.01
MCHC (%)	21.1 ^b ± 2.6	17.4 - 24.7	21.9 ^a ± 2.5	16.0 - 30.8	0.01
PPT (g/L)	44.0 ± 4.6	36.0 - 54.0	42.0 ± 4.6	34,00 - 88.0	0.14
Tro (x10 ⁹ /L)	38.1 ^a ± 13.3	12.7 - 77.8	28.0 ^b ± 14.2	11.0 - 69.3	<0.01
WBC(x10 ⁹ /L)	12.4 ± 6.4	2.6 - 29.8	13.8 ± 56.0	3.7 - 35.6	0.15
Mon (x10 ⁹ /L)	0.1 ± 0.1	0.0 - 1.6	0.2 ± 0.1	0.0 - 1.4	0.08
Lim (x10 ⁹ /L)	4.3 ^b ± 3.6	1.3 - 18.0	8.0 ^a ± 5.2	1.9 - 23.4	<0.01
Eos (x10 ⁹ /L)	0.2 ^b ± 0.4	0.0 - 1,6	0.5 ^a ± 0.5	0.0 - 3.4	<0.01
Het (x10 ⁹ /L)	6.5 ^a ± 5.1	1.1 - 16.4	3.5 ^b ± 2.8	0.7 - 19.6	<0.01
Baso (x10 ⁹ /L)	0.0 ± 0.0	0.0 - 0.2	0.0 ± 0.1	0.0 - 0.8	0.87
H/ L	1.3 ^a ± 1.0	0.2 - 4.2	0.4 ^b ± 0.4	0.1 - 3.8	<0.01

Where: med - median, QD - quartile deviation, Hct - hematocrit, Ery- total erythrocytes, Hb - hemoglobin, MCV - mean corpuscular volume, MCHC - mean corpuscular hemoglobin concentration, PPT - total plasma proteins, Tro - thrombogram, Mon - monocyte, Lym -

lymphocyte, Eos - eosinophils, Het - heterophils, Baso - basophils, WBC - white blood cell count and H/L - ratio of heterophil/lymphocyte. Values with different letters in the same row differ by t-test or Mann-Whitney U in 5% significance level.

Table 5

The mean values followed by standard deviation of the total area of erythrocytes (μm) of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in different age groups.

Age (days)						
7	14	21	28	35	42	80
79.1 ^a \pm 8.4	72.5 ^b \pm 5.7	69.9 ^c \pm 6.3	70.8 ^c \pm 7.7	67.0 ^d \pm 5.0	65.7 ^{de} \pm 4.8	64.6 ^e \pm 5.2

Values with different letters in the same row differ by Tukey test at 5% significance level.

Table 6

Median values followed by interquartile range of serum constituents of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in different age groups.

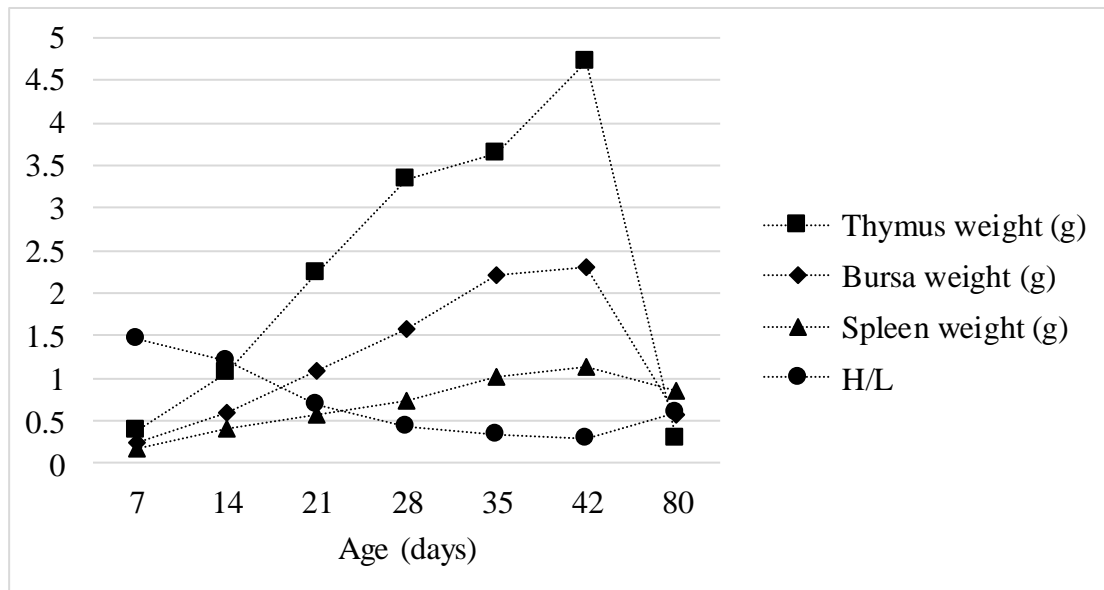
	Age (days)						
	7	14	21	28	35	42	80
TP (g/L)	34.4 ^c ± 4.5	32.7 ^{bc} ± 7.2	30.1 ^{bc} ± 3.8	30.2 ^b ± 3.7	32.1 ^{bc} ± 4.2	32.6 ^{bc} ± 4.9	51.9 ^a ± 10.1
ALT (nkat/L)	475.1 ^{ab} ± 266.7	516.8 ^a ± 200.0	283.4 ^{bc} ± 216.7	250.0 ^{bc} ± 116.7	250.0 ^{bcd} ± 108.4	150.0 ^d ± 37.5	300.1 ^b ± 220.9
AST (nkat/L)	3834.1 ^{bc} ± 1125.2	4967.7 ^{ab} ± 4509.2	4192.5 ^{bc} ± 954.4	4817.6 ^{ab} ± 1821.2	3617.4 ^c ± 1208.6	4250.9 ^{bc} ± 1500.3	6017.9 ^a ± 2817.2
ALP (nkat/L)	49926.7 ^a ± 14252.8	29172.5 ^{ab} ± 12085.8	24338.2 ^b ± 8051.6	22104.4 ^b ± 5609.5	13819.4 ^c ± 5884.5	10502.1 ^c ± 3600.7	7476.5 ^c ± 6047.0
GGT (nkat/L)	-	-	33.3 ^a ± 33.3	16.7 ^{ab} ± 33.3	0.0 ^b ± 16.7	16.7 ^{ab} ± 33.3	0.0 ^a ± 829.3
Urea (mmol/L)	0.8 ^a ± 0.3	0.6 ^{ab} ± 0.3	0.6 ^{ab} ± 0.3	0.5 ^b ± 0.2	0.5 ^b ± 0.3	0.6 ^b ± 0.2	0.8 ^a ± 0.4
Uric Acid (μmol/L)	334.9 ± 117.5	268.6 ± 160.0	273.0 ± 228.4	246.3 ± 118.5	261.7 ± 137.3	301.0 ± 144.2	320.6 ± 95.3
Cholesterol	4.2 ^{ab} ±	4.3 ^{ab} ±	3.7 ^b ±	3.7 ^b ±	3.8 ^b ±	3.8 ^b ±	5.2 ^a ±

(mmol/L)	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.5	1.8
Trig	1.7 ^b ±	1.2 ^{bc} ±	1.3 ^{bc} ±	1.1 ^c ±	1.3 ^{bc} ±	1.1 ^c ±	20.3 ^a ±
(mmol/L)	0.7	0.5	0.6	0.4	0.8	0.3	13.2
Calcium			1.6 ^c ±	1.7 ^{bc} ±	2.0 ^b ±	2.0 ^b ±	6.2 ^a ±
(mmol/L)	-	-	0.4	0.4	0.5	0.4	2.5

Where: TP - total protein, ALT - alanine aminotransferase, AST - aspartate aminotransferase, ALP - alkaline phosphatase, GGT - gamma-glutamyl transferase, Trig - triglycerides. Values with different letters in the same row differ by Kruskal-Wallis test at 5% significance level.

Figure legends

Fig.1. Evaluation of the weights of lymphoid organs in grams (x10) and the ratio of heterophil/lymphocyte for Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in different age groups.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo mostraram que houve diferenças significativas em alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) de acordo com a faixa etária. Desta forma, é importante que se estabeleçam valores de referência para os parâmetros hematológico e bioquímico clínico de codornas japonesas de acordo com a faixa etária, pois a não observação desta característica pode levar o clínico veterinário a erro na interpretação dos resultados fornecidos pelo laboratório de patologia clínica.

Além disso, a experiência adquirida por nossa equipe nos leva a indicar a metodologia indireta em esfregaços sanguíneos como o método mais preciso para determinação da leucometria global e trombograma.

REFERÊNCIAS

- ANDREASEN, C. B. et al. Determination of chicken and turkey plasma and serum protein concentrations by refractometry and the biuret method. **Avian Dis.**, v. 33, n. 1, p. 93-6, 1989.
- ALMEIDA, J. M. et al. Importância da imunidade nas aves. In: III Simpósio de Sustentabilidade e Ciência Animal. **Anais...** 2013.
- AINA, O. O.; AJIBADE, T. Age-related changes in haematologic parameters of cage-raised Japanese quails (*Coturnix japonica*). **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 6, n. 4, p. 104-8, 2014.
- ATWAL, O. S.; MCFARLAND, L. Z.; WILSON, W. O. Hematology of *Coturnix* from Birth to Maturity. **Poultry Science**, v. 43, n. 6, p.1392-401, 1964.
- BARBOSA, A. A. et al. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **R. Bras. Zootec.**, v. 39, n. 2, p. 308-12, 2010.
- BERNARDINO, M. G. S. et al. Avaliação hematológica em codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) com diferentes faixas etárias. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2014, Vitória/ES. **Anais...** Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.
- BOHLS, R. L. et al. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 9, p. 843-50, 2006.
- BORSA, A. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n. 1, p. 25-31, 2009.
- BURGESS, S. C.; DAVISON, T. F. Counting absolute numbers of specific leukocyte subpopulations in avian whole blood using a single-step flow cytometric technique: comparison of two inbred lines of chickens. **Journal of Immunological Methods**, v. 227, n. 1-2, p. 169-76, 1999.

CAMPBELL, F. Fine structure of bone marrow of chicken and pigeon. **J. Morphol.**, v. 123, n. 4, p. 405-39, 1967.

CAPRITA, R. et al. Spectrophotometric and Refractometric Determination of Total Protein in Avian Plasma. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, v. 46, n. 2, 2013.

CLARK, P.; BOARDMAN, W.S. J.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Wiley-Blackwell, Oxford, 2009. 198p.

CLAVER, J. A.; QUAGLIA, A. I. E. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 2, p. 87–97, 2009.

CRAY, C.; RODRIGUEZ, M.; ARHEART, K. L. Use of refractometry for determination of psittacine plasma protein concentration. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 4, p. 438-42, 2008.

CRAY, C.; WACK, A.; ARHEART, K. L. Invalid measurement of plasma albumin using bromocresol green methodology in penguins (*Spheniscus species*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 1, p. 14-22, 2011.

D'ALOIA, M. -A. et al. Haemopathologic responses to chronic inflammation in the houbara bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). **Comparative Haematology International**, v. 4, n. 4, p. 203-6, 1994.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, n. 83, p. 580-90, 2004.

FERNANDES, D. C. et al. Biologia do sistema imune de aves. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 5, p. 131-40, 2013.

GERTNER, L. R. S.; SANTIN, E.; SAAD, M. B. Influência da fumonisina sobre a resposta imunológica de aves: revisão bibliográfica. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, p. 401-11, 2008.

IBGE, 2009. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 37, p. 1-55. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/ppm2009.pdf>> Acesso em: 14 de setembro de 2015.

IBGE, 2013. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 41, p. 1-108. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf> Acesso em: 23 de janeiro de 2016.

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 54-63, 2008.

JONES, M. P. Avian Hematology. **Vet Clin Exot Anim**, v. 18, p. 51–61, 2015.

KRUPAKARAN, R. P. Serum biochemical profile of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 3, n. 1, p. 182-3, 2013.

LATIMER, K. S. et al. Leukocyte changes associated with acute inflammation in chickens. **Avian Diseases**, v. 32, n. 4, p. 760-72. 1988.

LAGANÁ, C. et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de frangos de corte em estresse por calor. **B. Industr. anim.**, v. 62, n. 2, p. 157-65, 2005.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and Related Disorders. **Vet Clin Exot Anim**, v. 11, p. 501-22, 2008.

MORAES, V. M. B.; ARIKI, J. Importância da nutrição na criação de codornas e qualidades nutricionais do ovo e da carne de codorna. In: III REUNIAO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 200. Mogi das Cruzes/SP. **Anais...** Mogi das Cruzes: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2000, p. 97-103.

MUNHOZ, A. D. et al. Studies of clinical signs and hematological alterations In Japanese Quails (*Coturnix japonica*) due to *Toxoplasma gondii* Nicolle and Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) Experimental Infection. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2004.

MUNHOZ, L. S.; VARGAS, G. D.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P. A.; HÜBNER, S.O. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 153-60, 2014.

NAUKKARINEN, A.; SORVARI, T. E. Involution of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 35, p. 281-90, 1984.

NAZIFI, S.; TADJALLI, M.; MOHAGHGHEGHZADEH, M. Normal haematopoiesis cellular components and M/E ratio in the bone marrow of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Comparative Haematology International**, v. 9, p. 188-92, 1999.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-38, 1952.

PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, W. P.; MUNIZ, J. C. L. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 06, p. 2041-49, 2012.

QURESHI, M. A. Avian Macrophage and Immune Response: An Overview. **Poultry Science**, n. 82, p. 691-98, 2003.

ROLL, V. F. B. et al. Hematologia de frangos alimentados com dietas contendo aflatoxinas e adsorvente de toxinas. **Arch. Zootec**, v. 59, n. 225, p. 93-101, 2010.

ROCHA, T. M. et al. Aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos de doenças imunossupressoras em aves. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 355-79, 2014.

ROSA, G. A. et al. Perfil hematológico de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) sob estresse térmico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1605-10, 2011.

RUPLEY, A. E. **Manual de clínica aviária**. São Paulo: Roca, 1999. 582 p.

SCHMIDT, E. M. S. et al. Determination of Ring-Necked Pheasant (*Phasianus colchicus*) Serum Protein Concentrations by Refractometry and the Biuret Method. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 7, p. 672-73, 2008.

SCHMIDT, E. M. S. et al. Comparison of electrophoretic and dye-binding methods for measuring albumin concentrations in female turkeys. **Comp Clin Pathol**, v. 21, p. 777-79, 2012.

SCHMIDT, E. M. S. et al. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007a.

SCHMIDT, E. M. S. et al. The Effect of Age on Hematological and Serum Biochemical Values on Juvenile Ring-Necked Pheasants (*Phasianus colchicus*). **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 6, p. 459-61, 2007b.

SCHMIDT, E. M. S. et al. Hematological and Serum Chemistry Values for the Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*): Variation with Sex and Age. **International Journal of Poultry Science**. v. 6, n. 2, p. 137-39, 2007c.

SCHOLTZ, N. et al. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. **Poultry Science**, v. 88, p. 1186-90, 2009.

SCHOSSLER, J. E. W. Valores laboratoriais e aspectos histológicos de codornas domésticas (*Coturnix coturnix japonica*). **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, 21, 2013.

SELIGER, C. et al. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, p. 86-99, 2012.

STURKIE, P. D. **Avian physiology**. 3 ed. Springer-Verlag: New York, 1976. 400p.

SUJATA, P.; MOHANTY, P. K.; MALLIK, B. K. Haematological analyses of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) at different stages of growth. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 11, p. 51-3, 2014.

TADJALLI, M.; S. NAZIFI, S.; EEMANPARVAR, A. Normal cellular morphology of the blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Comp Clin Path**, v. 12, p. 102-5, 2003.

TADJALLI, M.; NAZIFI, S.; HAGHJOO, R. Normal Haematopoiesis, Cellular Components and M/E Ratio in the Bone Marrow of the Turkey (*Meleagris gallopavo*). **J Anim Sci Adv**, v. 2, n. 6, p. 568-75, 2012.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. A.; MARCON, J. L. Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle, *Podocnemis expansa*): an analysis and discussion. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 351-56, 2008.

THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2006. 582p.

TUNSARINGKARN, T.; TUNGJAROENCHAI, W.; SIRIWONG, W. Nutrient benefits of Quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 5, 2013.

VALI, N. The Japanese Quail: A Review. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 9, p. 925-31, 2008.

WISEMAN, B. K. An improved method for obtaining the total white cell count in avian blood. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 28, p. 1030-33, 1931.

WITKOWSKI, A.; THAXTON, J. P. Morphology of the Eosinophil in Japanese Quail. **Poultry Science**, v. 60, n. 7, p. 1587-90, 1981.