



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS FERNANDES

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE EMAS, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758**

MOSSORÓ-RN
2024

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS FERNANDES

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE EMAS, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

F363m Fernandes, Pedro Henrique dos Santos.
 Morfologia, morfometria e parâmetros
 hematológicos de células sanguíneas de emas, Rhea
 americana LINNAEUS, 1758 / Pedro Henrique dos
 Santos Fernandes. - 2024.
 75 f. : il.

 Orientador: Moacir Franco de Oliveira.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
 Ciência Animal, 2024.

 1. Hematologia Aviária. 2. Hematimetria. 3.
 Ratita. 4. Sangue. 5. Microscopia. I. Oliveira,
 Moacir Franco de , orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS FERNANDES

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE EMAS, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Defendida em: 30/08/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA**
Data: 15/03/2025 23:51:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
(Orientador - Presidente)

Documento assinado digitalmente
 **AMILTON CESAR DOS SANTOS**
Data: 20/03/2025 21:47:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Amilton Cesar dos Santos (UNIFEOB)
(Membro Examinador)

Documento assinado digitalmente
 **AIRTON MENDES CONDE JÚNIOR**
Data: 16/03/2025 16:38:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior (UFPI)
(Membro Examinador)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS FERNANDES nasceu no dia 05 de abril de 1990, na cidade de Mossoró-RN. Concluiu o ensino médio no União Colégio e Curso, em Mossoró-RN, no ano de 2007. Possui graduação em Farmácia pela Faculdade Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN) (2020). É especialista em Farmácia Clínica e Prescrição Farmacêutica, pela Faculdade do Vale do Jaguaribe (2021). Ingressou, em agosto de 2022, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), em nível de Mestrado. Ao longo do Mestrado, como bolsista CAPES, realizou estágio docência na disciplina de Anatomia dos Animais Domésticos, no curso de Zootecnia. Tem experiência nas áreas de Farmácia, Análises Clínicas. Atualmente trabalha como farmacêutico na iniciativa privada e em Unidade Básica de Saúde do Município de Mossoró-RN.

A **Deus**, sustentáculo da minha vida; Aos meus amados pais, **Gustavo** (*in memoriam*) e **Kelzanira**, com toda a minha admiração, pelo amor, zelo e apoio incondicional de sempre; Aos meus irmãos, **Paulo Henrique** e **Kaísa**, por todo o apoio; A **Ramon**, pelo companheirismo, parceria, incentivo e cuidado.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu alicerce, por me guiar em todas as minhas decisões, por iluminar os meus caminhos, pelas inúmeras bênçãos concebidas e por me conceder força, sabedoria e me sustentar nos momentos de dificuldade, para que eu pudesse concluir essa jornada.

Aos meus pais, **Gustavo** (*in memoriam*) e **Kelzanira**, por todo o amor, pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo e apoio incondicional de sempre, por acreditarem nos meus sonhos e por todo o esforço feito, sem medidas, durante todo o meu processo de formação.

A **Ramon**, por ter sonhado antes de mim com a realização desse mestrado, ter me dado força, incentivado, me ouvido em todos os momentos de angústia e dificuldade e me fortalecido, com palavras e gestos, tendo sido compreensível em todos os momentos de renúncia para que eu pudesse me dedicar a construção de todo esse projeto.

Aos meus irmãos, **Paulo Henrique** e **Kaísa**, pela amizade, companheirismo e incentivo ao longo dessa jornada. Obrigado por sempre torcerem por mim.

Aos **meus avós** (*in memoriam*), exemplos de amor, caráter, fé e humildade, com quem aprendi importantes princípios e a quem devo muito por tudo que sou.

Aos demais familiares, por todas as orações, preocupações, apoio e por sempre vibrarem com as minhas conquistas.

Agradeço, em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. **Moacir Franco de Oliveira**, por ter me acolhido, no momento de maior dificuldade nessa jornada, quando necessitei mudar de orientador, e o mesmo aceitou que pudéssemos desenvolver esse projeto juntos. Agradeço pela sua paciência, compreensão e imensa colaboração em todas as etapas, tornando possível a conclusão deste trabalho. Sua experiência, seus ensinamentos e sua determinação foram fundamentais para que eu obtivesse esse sucesso ao final do mestrado.

Ao meu eterno professor e amigo, **André Menezes do Vale**, pela enorme contribuição com este trabalho, desde as primeiras ideias, quando falei que faria a seleção para o mestrado e o mesmo me instruiu, sanando dúvidas e me orientando sobre as etapas do processo. Agradeço pela ajuda durante as análises das minhas amostras no HOVET, quando mesmo estando ocupando com suas inúmeras demandas, não mediu esforços para me auxiliar em tudo que precisei, com sua experiência, sabedoria e paciência.

A **Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)**, por ter tornado possível a minha conclusão do Mestrado em Ciência Animal.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, em nome do atual coordenador Francisco Marlon Carneiro Feijó, através do qual agradeço a todos os professores, técnicos e auxiliares de laboratório, por terem contribuído com a minha formação e ajudado na construção desse projeto.

Ao **CEMAS – UFERSA**, pela disponibilização dos animais, objetos de estudo desse projeto, sem os quais não seria possível realizá-lo. Agradeço aos funcionários deste local pelo auxílio durante as coletas.

Ao **HOVET – UFERSA**, pela disponibilização do Laboratório de Patologia para que eu pudesse realizar parte das análises do meu experimento. Agradeço, especialmente, a residente **Milena** e ao funcionário **Erinaldo**, pela receptividade e por terem me orientado e me auxiliado durante as análises no laboratório.

Ao **CPVSA – UFERSA**, em especial a Bruno Fernandes, responsável pelas análises de microscopia eletrônica de varredura. Agradeço a paciência e pelos ensinamentos sobre a técnica.

Aos meus amigos, por acreditaram no meu potencial e estarem sempre na torcida pela realização desse sonho, sendo compreensivos nos momentos em que estive ausente.

Aos colegas do Labmorfa, em especial a **Radan Elvis, Igor Renno, João Augusto, Rysonely Maclay e Ericka Chagas** por não hesitarem em ajudar e por compartilharem experiências e momentos únicos, tornando a caminhada mais leve.

Aos colegas **Layla Ianca e Emanuel Lucas**, constituintes de outros laboratórios, mas considerados como nossos colegas de laboratório, agregados, colegas de jornada, com quem compartilhei momentos memoráveis durante esse tempo de mestrado, que levarei para a vida.

Aos alunos de iniciação científica, **Euziele, Alana e Antônio**, pela grande contribuição que me deram, auxiliando durante as coletas e me ajudando, sempre que possível, na rotina laboratorial, além das palavras de incentivo proferidas.

A **Marilu**, jovem cientista da USP, que esteve conosco durante um curto intervalo de tempo para realizar parte do seu experimento e me deu uma enorme contribuição, especialmente com as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus colegas de trabalho, pela compreensão, pelo incentivo, por terem ouvido todas as minhas queixas e dificuldades e acompanhado de perto a minha luta, pelos conselhos, pelas palavras e gestos de motivação, por terem segurado as pontas quando mais precisei. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse concluir essa etapa com sucesso.

A todos que citei, e aos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho, o meu muito obrigado! Essa conquista é nossa!

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS DE EMAS, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758

FERNANDES, P. H. S. **Morfologia, morfometria e parâmetros hematológicos de células sanguíneas de emas, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758.** 2024. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2024.

RESUMO: A ema (*Rhea americana* Linnaeus, 1758), considerada a maior espécie de ave nativa do Brasil, encontra-se entre os componentes da fauna silvestre que apresentam elevado potencial econômico e conservacional. Nesta perspectiva, avaliar o perfil hematológico desses animais é indispensável, uma vez que os sinais clínicos nas aves são bastante inespecíficos e os exames físicos fornecem informações limitadas. Este estudo teve o objetivo de caracterizar a morfologia, morfometria e os parâmetros hematológicos de células sanguíneas de emas criadas em cativeiro no semiárido potiguar. Foram utilizados 48 exemplares hígidos da espécie, distribuídos em três grupos, de acordo com a idade: jovens (cinco a nove meses), juvenis (11 a 15 meses) e adultos (2,5 a 3,5 anos). A caracterização morfológica de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foi feita utilizando-se técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise morfométrica das células foi realizada com o auxílio do Software analisador de imagens ImageJ® (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24), para a obtenção do diâmetro máximo e mínimo de eritrócitos, bem como o diâmetro de leucócitos e trombócitos e, para estabelecer comparações entre sexos e em diferentes idades foi aplicado o teste *t* de Student, considerando-se significativo o valor de $p \leq 0,05$. Os parâmetros sanguíneos foram analisados e comparados através dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney-Wilcoxon. A análise inédita das células sanguíneas de emas por meio de microscopia eletrônica de varredura nos permitiu observar a textura da superfície dos diferentes tipos celulares, além da presença de pequenas projeções como microvilosidades, presença de granulações e outras estruturas submembranares, irregularidades e rugosidades, dentre outras características. Morfometricamente, observaram-se diferenças estatísticas apenas em relação aos trombócitos dos machos quando comparados aos trombócitos das fêmeas, sendo estes maiores. Quando comparados em relação à idade, apenas o diâmetro maior dos eritrócitos de emas adultas variou em relação ao diâmetro maior dos eritrócitos de emas jovens e juvenis. Em relação aos parâmetros hematológicos, obteve-se os valores: eritrócitos ($2,84 \pm 0,61 \times 10^6/\mu\text{L}$), Hb ($13,5 \pm 3,84$ g/dL), Ht ($45,7 \pm 3,58$ %), VCM ($16,8 \pm 3,97$ fL), HCM ($52,8 \pm 13,5$ pg), CHCM ($31,2 \pm 2,20$ g/dL), leucócitos ($24.433 \pm 8.779/\mu\text{L}$), heterófilos ($67,9 \pm 6,20\%$), linfócitos ($27,3 \pm 6,51\%$), eosinófilos ($0,80 \pm 0,86\%$), monócitos ($3,40 \pm 0,82\%$), basófilos ($0,53 \pm 0,51\%$), trombócitos ($94.647 \pm 23.662/\mu\text{L}$) e proteínas totais ($6,08 \pm 0,93$ g/dL). Quando os parâmetros foram comparados em relação ao sexo do animal, evidenciou-se, estatisticamente, a existência de uma diferença significativa no CHCM e nas Proteínas Totais entre os sexos. Já entre as diferentes faixas etárias, verificou-se diferenças significativas nos níveis de Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito, VCM, HCM, Proteínas Totais, Leucócitos, Eosinófilos, Monócitos e Trombócitos, mostrando que a idade dos animais tem um impacto significativo em vários parâmetros hematológicos, enquanto alguns parâmetros permanecem consistentes, independentemente da faixa etária. Concluiu-se que o sangue da espécie *Rhea americana* apresenta as células sanguíneas em quantitativos que, quando estimados, encontram-se dentro dos padrões descritos para as aves em geral, com algumas diferenças nas características dos leucócitos em comparação aos leucócitos de outras aves e seus trombócitos possuem forma elíptica, condição descrita apenas para emas.

Palavras-chave: Sangue; Hematimetria; Hematologia Aviária; Ratita; Microscopia.

MORPHOLOGY, MORPHOMETRY AND HEMATOLOGICAL PROFILE OF BLOOD CELLS FROM GREAT RHEA, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758

FERNANDES, P. H. S. **Morphology, morphometry and hematological profile of blood cells from great rhea, *Rhea americana* LINNAEUS, 1758.** 2024. 57f. Dissertation (Master's in Animal Science) – Federal Rural University of Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2024.

ABSTRACT: The great rhea (*Rhea americana* Linnaeus, 1758), considered the largest species of bird native to Brazil, is among the components of wild fauna that have high economic and conservation potential. From this perspective, evaluating the hematological profile of these animals is essential, since clinical signs in birds are quite nonspecific and physical examinations provide limited information. This study aimed to characterize the morphology, morphometry and the hematological parameters of blood cells from emus bred in captivity in the semiarid region of Rio Grande do Norte. 48 healthy specimens of the species were used, distributed into three groups, according to age: young (five to nine months), juveniles (11 to 15 months) and adults (2.5 to 3.5 years). The morphological characterization of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes was carried out using optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM) techniques. The morphometric analysis of the cells was carried out with the aid of ImageJ® image analyzer software (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24), to obtain the maximum and minimum diameter of erythrocytes, as well as the diameter of leukocytes and thrombocytes and, to establish comparisons between sexes and at different ages, the Student's t test was applied, considering a p value ≤ 0.05 to be significant. Blood parameters were analyzed and compared using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney-Wilcoxon tests. Erythrocytes, leukocytes and thrombocytes were characterized morphologically. The unprecedented analysis of rhea blood cells using scanning electron microscopy allowed us to observe the surface texture of different cell types, in addition to the presence of small projections such as microvilli, the presence of granulations and other submembrane structures, irregularities and roughness, among others. characteristics. Morphometrically, statistical differences were observed only in relation to the thrombocytes of males when compared to the thrombocytes of females, which were larger. When compared in relation to age, only the largest diameter of erythrocytes from adult great rhea varied in relation to the largest diameter of erythrocytes from young and juvenile great rhea. Regarding hematological parameters, the following values were obtained: erythrocytes ($2.84 \pm 0.61 \times 10^6/\mu\text{L}$), Hb (13.5 ± 3.84 g/dL), Ht ($45.7 \pm 3.58\%$), VCM (16.8 ± 3.97 fL), HCM (52.8 ± 13.5 pg), MCHC (31.2 ± 2.20 g/dL), leukocytes ($24,433 \pm 8,779/\mu\text{L}$), heterophils ($67.9 \pm 6.20\%$), lymphocytes ($27.3 \pm 6.51\%$), eosinophils ($0.80 \pm 0.86\%$), monocytes ($3.40 \pm 0.82\%$), basophils ($0.53 \pm 0.51\%$), thrombocytes ($94,647 \pm 23,662/\mu\text{L}$) and total proteins (6.08 ± 0.93 g/dL). When the parameters were compared in relation to the sex of the animal, it was statistically evident that there was a significant difference in MCHC and Total Proteins between the sexes. Between the different age groups, there were significant differences in the levels of Erythrocytes, Hemoglobin, Hematocrit, MCV, HCM, Total Proteins, Leukocytes, Eosinophils, Monocytes and Thrombocytes, showing that the age of the animals has a significant impact on several hematological parameters, while some parameters remain consistent regardless of the age group. It was concluded that the blood of the *Rhea americana* species presents all the main cell types, in quantities that when estimated are within the standards described for birds in general, with some differences in the characteristics of leukocytes in comparison to leukocytes from other birds. and its thrombocytes have an elliptical shape, a condition described only for great rhea.

Keywords: Blood; Hematimetry; Avian Hematology; Ratite; Microscopy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEMAS - Centro de Multiplicação de Animais Silvestres

CPVSA - Centro de Pesquisas Vegetais do Semi-Árido

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

Hb – Hemoglobina

Ht - Hematócrito

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN - International Union for Conservation of Nature

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

ODS - Objetivos de Sustentabilidade Ambiental

SISBio - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-Árido

VCM - Volume Corpuscular Médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Emas (<i>Rhea americana</i>) no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA, 2024.....	25
Figura 2 – Fotografia dos piquetes, onde encontram-se distribuídos os animais, mostrando a estrutura formada por telas e a cobertura vegetal.....	26
Figura 3 – Fotomicrografias de esfregaços sanguíneos de emas (<i>Rhea americana</i>), em que aparecem em destaque, centralizados e identificados através de setas ou cabeça de seta, os principais tipos de células sanguíneas encontrados nestes animais, para caracterização da morfologia.....	34
Figura 4 – Micrografias de células sanguíneas de emas obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Morfometria das células sanguíneas de emas (<i>Rhea americana</i> Linnaeus, 1758), criadas em cativeiro, em função do sexo. CEMAS/UFERSA – 2024.....	37
Tabela 2 – Morfometria das células sanguíneas de emas (<i>Rhea americana</i> Linnaeus, 1758), criadas em cativeiro, em função da idade. CEMAS/UFERSA – 2024.....	38
Tabela 3 – Parâmetros hematológicos para emas (<i>Rhea americana</i>) jovens, juvenis e adultas, criadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA, 2024.....	39
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos para emas (<i>Rhea americana</i>) machos e fêmeas, criadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA, 2024.....	40
Tabela 5 – Parâmetros hematológicos de emas adultas (<i>Rhea americana</i>) criadas em cativeiro no Brasil.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 BIOLOGIA E COMPORTAMENTO DA EMA (<i>Rhea americana</i>)	16
2.2 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DAS AVES	17
2.3 PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE EMAS (<i>Rhea americana</i>)	20
2.4 COLETA E CONSERVAÇÃO DE SANGUE PERIFÉRICO EM AVES	21
3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5 MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 ANIMAIS E CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DE AMOSTRAGEM	25
5.2 COLETA DO MATERIAL	26
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS	27
5.3.1 Morfologia das células sanguíneas	27
a) Microscopia de luz.....	27
b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
5.3.2 Morfometria das células sanguíneas	28
5.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	29
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5.6 ASPECTOS ÉTICOS	31
6 RESULTADOS	32
6.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	32
6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
6.2 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS.....	36
6.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	38
7 DISCUSSÃO	41
7.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	41
7.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	45
7.2 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS.....	46
7.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	48
8 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Originárias evolutivamente de um grupo específico dos répteis, as aves compõem um dos grupos de vertebrados mais estudados para fins de preservação ambiental, pois no desenvolvimento de suas funções na natureza alcançaram adaptações fisiológicas que guardam relações diretas ou indiretas com os processos de polinização de vegetais, bem como atuam no controle de pragas ao se alimentarem de diferentes grupos de invertebrados, o que faz das mesmas importante grupo de animais cujas funções favorecem o equilíbrio dos ecossistemas em que habitam e, por conseguinte, com a sustentabilidade ambiental (Santos *et al.*, 2023).

A ema (*Rhea americana* LINNAEUS, 1758) é a maior espécie de ave brasileira e possui importância tanto econômica quanto conservacional, tendo em vista que está quase ameaçada de extinção (BirdLife International, 2022). Pertence à ordem *Rheiformes*, família *Rheidae* e ao gênero *Rhea*; faz parte do grupo das aves ratitas, juntamente com a avestruz da África e o Emu da Austrália (Sousa *et al.*, 2018).

A espécie é uma ave endêmica do continente americano e habita campos abertos do leste e centro do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte e centro da Argentina, escolhendo pastagens mais altas para nidificação (Picasso; Mosto, 2016). Costumam formar grupos mistos de machos e fêmeas, de diferentes idades, compostos por 5 a 30 indivíduos. Podem atingir o peso de 45 kg na idade adulta e 170 cm de comprimento do bico à cauda. A expectativa de vida desses animais na natureza é de cerca de 10 a 15 anos. Apresentam uma dieta onívora, alimentando-se de grande variedade de matéria vegetal (folhas, frutos, sementes), invertebrados e pequenos vertebrados (Lèche *et al.*, 2021).

Para avaliar o estado de saúde das aves e de outras espécies, em maneira geral, a hematologia representa uma ferramenta de diagnóstico indispensável, pois mesmo na ausência de sinais clínicos, podem ocorrer alterações hematológicas que servirão de subsídios para que o clínico possa monitorar a evolução de uma doença, avaliar a eficácia do protocolo terapêutico e proporcionar um prognóstico adequado (Samour, 2015).

Por entender-se que a partir de exames hematológicos é possível verificar, qualitativa e quantitativamente, as alterações nas frações dos glóbulos vermelhos e brancos, bem como alterações na morfologia celular que podem auxiliar no diagnóstico de doenças e patologias (Vila, 2013), buscou-se descrever o perfil hematológico, morfológico e morfométrico das células sanguíneas de emas, criadas no clima semiárido, em regime semiextensivo, tomado como base a ideia de que fatores ambientais interferem diretamente nesses perfis.

Assim, neste estudo, considerando que as emas são importantes aves nativas da América do Sul e que representam a ave atual mais antiga do continente sul-americano, bem como o fato de que são animais com caracteres morfológicos que possuem relevância quanto a aspectos zootécnicos e de produção, buscou-se investigar alguns aspectos do sangue desses animais, já que os mesmos se encontram em um criatório científico situado em ambiente semiárido. Para tanto, investigamos dados associados à morfologia, morfometria e ao perfil hematológico das células que integram esse tecido biológico, tanto pela importância biológica que a espécie possui, segundo nosso ponto de vista, mas também por entender que pesquisas que envolvam a caracterização do sangue de animais são sempre de grande relevância para subsidiar estudos com sanidade animal, assim como relevantes quando se observa aspectos de sustentabilidade ambiental se considerarmos os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), neste caso, em especial, aquele relativo a vida terrestre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA E COMPORTAMENTO DA EMA (*Rhea americana*)

Embora a grande maioria das aves brasileiras sejam classificadas como aves silvestres, muitas delas são criadas em cativeiro mesmo que de maneira ilegal ou são mantidas em criadouros com fins científicos ou comerciais. Castro *et al.* (2013), cita que esse grupo de animais representa a maioria das espécies da fauna silvestre, mantidos como animais de companhia. Dentre estas, a ema mostra-se como um modelo de interesse para a comunidade científica por condições associadas ao seu status evolutivo, ao seu porte, a sua distribuição no território sul-americano, entre outros.

A ema (*Rhea americana*) é uma ave silvestre de grande porte, endêmica do continente americano, encontrada no Brasil, Argentina e Uruguai (Ederli, 2012). Taxonomicamente, pertence à Ordem *Rheiforme*, Família *Rheidae* ao Gênero *Rhea*, compondo o grupo das aves ratitas, juntamente com a avestruz (*Struthio camelus*) da África e o emu (*Dromaius novaehollandiae*) da Austrália (Sousa *et al.*, 2018).

Dentre as aves nativas do Brasil, a ema representa a espécie com maior peso e altura, e de acordo com Cubas *et al.* (2014), pode atingir 45 kg e chegar a medir 1,7 m de altura. Esses animais são essencialmente terrícolas, razão pela qual são denominados de ratitas. Além disso, possuem asas consideravelmente grandes que podem ser abertas durante a corrida como forma de manter o equilíbrio. Silva (2001) cita que as asas também são utilizadas para a proteção dos filhotes e durante a cópula, além de serem úteis para a regulação da temperatura corpórea e para chamar a atenção da fêmea durante a conquista.

Nas aves, muitas vezes o dimorfismo é uma característica marcadamente associada a cor da plumagem. Nas emas, a plumagem é marcadamente cinza, com penas dorsais e ventrais brancas. Essa disposição, de acordo com Brandt e Neto (1999), caracteriza um leve dimorfismo sexual, embora este também associe ao dimorfismo a presença de maior robustez corporal e pescoço espesso nos machos.

Em estudos com aves, os aspectos comportamentais sempre chamam a atenção, pois são úteis para entender condições de manejo, sejam eles referentes a produção ou manutenção dessas em ambientes naturais. Em função disto, investigações que tratam do comportamento de machos quanto a maturidade sexual, da relação desses com as fêmeas que compõem determinado grupo, dentre outras características comportamentais, sempre são relevantes e tornam os estudos de comportamentos uma ferramenta de grande interesse. Nesse viés,

Machado e Rocha (2006) descrevem que em emas os machos normalmente atingem a maturidade sexual aos dois anos de idade ou mesmo de modo mais precoce, em função de fatores associados a alta incidência de luminosidade. Ou que formam haréns no início de cada estação reprodutiva, que podem conter de 2 a 12 fêmeas (Codenotti; Alvarez, 2001), bem como assumem a responsabilidade pela construção do ninho e incubação dos ovos (Gallo, 2013; Ederli, 2012), condição esta que caracteriza o sistema de cruzamento entre indivíduos da espécie como pertencente a categoria de poliginia e poliandria, uma vez que machos e fêmeas podem ter mais de um parceiro (Handford; Mares, 1985; Codenotti; Alvarez, 2001).

As emas, quando criadas em cativeiro, costumam ser dóceis e sociáveis, facilitando o manejo, o que pode ser uma condição importante para o desenvolvimento de políticas de conservação e políticas de para fins comerciais. Silva (2001) cita que, no Brasil, a atividade comercial de emas é reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), havendo produtores em todas as regiões devido ao elevado potencial reprodutivo em cativeiro, boa adaptação e produtos de qualidade como carne, penas, couro, ovos e gordura. Esta condição é importante, segundo nosso entendimento, pois pode fortalecer a cadeia produtiva e economia regional, mas também melhorara o status de conservação da espécie. Segundo a lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), a ema é classificada como quase ameaçada de extinção (BirdLife International, 2022), pelo fato de que a população desses animais tem reduzido em função de distintas ações do homem.

2.2 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DAS AVES

A hematologia na Medicina Veterinária é uma área da clínica médica em que se estuda os aspectos fisiológicos, etiológicos e patológicos do sangue do animal. Em aves, de maneira geral, a hematologia guarda similaridade com a de mamíferos, embora haja algumas diferenças e modificações importantes, que incluem a presença de núcleo nos eritrócitos e a existência de trombócitos e heterófilos, que equivalem às plaquetas e aos neutrófilos de mamíferos, respectivamente. Nas mesmas, embora pouco explorada, a hematologia é essencial para a detecção precoce de doenças, uma vez que, mesmo com a ausência de sinais clínicos, podem ocorrer alterações hematológicas importantes para subsidiar o clínico no estabelecimento prévio de tratamentos (Campbell, 2015).

Nas aves, o sangue é composto por três tipos celulares, os eritrócitos, os leucócitos e os trombócitos que circulam no plasma. Os leucócitos podem ainda ser divididos em granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos) (Harvey, 2011).

Os eritrócitos são células altamente especializadas, apresentando como principal função o transporte de gases, carreando oxigênio dos pulmões aos tecidos e dióxido de carbono no sentido inverso. Nas aves adaptadas ao voo, há uma necessidade ainda maior de circulação desses eritrócitos, para que possam suprir a demanda de oxigênio dos músculos responsáveis por essa função. Estas células são produzidas com frequência e passam por um processo de maturação que inclui diferentes estágios, cuja terminologia varia de acordo com a literatura (Campbell, 2015). Clark *et al.* (2009) descreve que durante esse processo de maturação, o eritrócito muda a sua forma de redonda para oval, o núcleo torna-se centralizado, a cromatina mais condensada e com uma coloração mais intensa, apresentando-se basofílica e uniformemente agrupada nas células maduras. A relação núcleo/citoplasma torna-se menor e o citoplasma apresenta-se mais abundante e com uma coloração eosinofílica e homogênea, sendo as Rheiformes possuidoras dos maiores eritrócitos da classe das aves (Benez, 2001). Em ratitas têm a forma oval com núcleo também oval, centralmente localizado, com cromatina condensada (Blue-Mclendon; Green, 2010).

Os neutrófilos, nas aves, são representados por polimorfonucleares denominados heterófilos, os quais apresentam o citoplasma repleto de grânulos acidófilos (Campbell, 2015). Assim como os neutrófilos, os heterófilos atuam na resposta inflamatória e participam dos processos de defesa a infecções bacterianas por meio de quimiotaxia, opsonização, fagocitose e lise (Capitelli; Crosta, 2013). Em ratitas, o heterófilo maduro é arredondado, com núcleo segmentado, geralmente preenchido por grande quantidade de grânulos fusiformes de cor laranja e citoplasma claro (Blue-Mclendon; Green, 2010).

Quanto aos eosinófilos, a morfologia celular pode variar de acordo com a espécie e, em função disto, Capitelli e Crosta (2013) recomendam realizar comparações com outros tipos de células sanguíneas para facilitar a diferenciação. Outro aspecto a considerar é que a morfologia dos eosinófilos se assemelha a dos heterófilos, dificultando a distinção dos dois tipos celulares, o que comumente é feito considerando que os eosinófilos apresentam citoplasma mais basofílico do que os heterófilos, seu núcleo é lobulado e basofílico e os grânulos eosinofílicos apresentam coloração mais intensa e tendem a ser mais redondos. Ademais, verifica-se a ausência do corpo refringente central presente nos heterófilos. Em ratitas, esse tipo celular, geralmente tem núcleo bilobulado, citoplasma azul claro com grande quantidade de grânulos vermelhos para rosa, pequenos e redondos (Blue-Mclendon; Green, 2010).

Os basófilos são células importantes para indicar processos inflamatórios e infecciosos e, nas aves são células que apresentam grânulos que geralmente deixam o núcleo escurecido. Os grânulos citoplasmáticos dos basófilos são constantemente afetados por colorações solubilizadas em álcool, podendo dissolver-se parcialmente ou agregar, apresentando anormalidade. Diferentemente dos basófilos de mamíferos, nas aves essas células são comumente encontradas no sangue periférico e tendem a ser menores do que os heterófilos e os eosinófilos. (Campbell, 1994). Em ratitas, os basófilos possuem núcleo excêntrico de formato arredondado a ovalado, não segmentado; citoplasma em quantidade moderada, apresentando cor púrpura, com grânulos escuros metacromáticos (Blue-Mclendon; Green, 2010).

Acredita-se que o papel dos basófilos é semelhante a dos basófilos e dos mastócitos de mamíferos, uma vez que seus grânulos citoplasmáticos apresentam histamina. Eles também atuam nas respostas inflamatórias agudas e de hipersensibilidade do tipo IV segundo descreve Thrall *et al.* (2015).

Em relação aos linfócitos das aves, estes assemelham-se, morfológicamente, às células dos mamíferos, com tamanhos que variam de pequenos a médios. Os maiores podem ser encontrados no sangue de aves normais e podem ser confundidos com monócitos, devido ao seu tamanho, volume citoplasmático e núcleo fracamente corado. Quanto às características, os linfócitos apresentam núcleo redondo, levemente denticulado, em posição central ou ligeiramente excêntrico. Quando maduros, a cromatina dos linfócitos é densamente condensada ou reticulada e o citoplasma, que geralmente se apresenta homogêneo e fracamente basofílico (azul-pálido), sem vacúolos e grânulos, ocupa pouco espaço, com exceção dos linfócitos maiores, conferindo a essas células uma alta relação núcleo/citoplasma (Thrall *et al.*, 2015).

Estudando o sangue de ratitas, Blue-Mclendon e Green (2010) descreve que os linfócitos são similares aos das outras espécies de aves, com células variando em tamanho, núcleo arredondado e citoplasma variando em quantidade, de escasso a moderado, e geralmente basofílico. Quanto à função destas células, Mitchell e Johns (2008) relatam que a exemplo do que ocorre em mamíferos, os linfócitos são responsáveis pela imunidade. Cita ainda que, os linfócitos B, dependentes da bursa de Fabrício, atuam na imunidade humoral, enquanto os linfócitos T, dependentes do timo, atuam na imunidade celular.

Os monócitos das aves também se assemelham aos dos mamíferos, apresentam formato arredondado ou amorfo e são maiores que os demais tipos de células leucocitárias. Esse tipo celular, apresenta citoplasma basofílico e abundante, com presença de discretos vacúolos e pequenos grânulos eosinofílicos, sendo a cromatina frouxamente condensada e o núcleo variando entre arredondado, ovalado ou lobulado (Mitchell; Johns, 2008). Em ratitas, os

monócitos são grandes, com moderada quantidade de citoplasma que se cora de azul a acinzentado, apresentando, ocasionalmente, vacúolos pequenos e discretos e núcleo pleomórfico, com cromatina menos condensada que nos linfócitos quando comparados entre si (Blue-Mclendon; Green, 2010).

Os trombócitos são considerados as menores células do sangue periférico, apresentando forma de redonda a ovalada, com núcleo arredondado e cromatina densamente condensada. Estes se diferenciam dos linfócitos, especialmente pela aparência do citoplasma. Outro aspecto a considerar é que pode ocorrer vacuolização citoplasmática em trombócitos ativados ou fagocíticos e a presença de um ou mais grânulos eosinofílicos distintos nos trombócitos (Campbell, 2015; Clark *et al.*, 2009). Quanto à função, essas células desempenham importante papel no processo de hemostasia, uma vez que participam de maneira ativada na formação de trombos e cicatrização de feridas, além de realizarem fagocitose e, assim como as plaquetas dos mamíferos, tenderem a se aglutinar nas extensões sanguíneas (Thrall e colaboradores, 2015).

2.3 PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE EMAS (*Rhea americana*)

Estudos com hematologia de aves no Brasil nos últimos anos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar aspectos clínicos de diversas espécies, mas, sobretudo, no sentido de estabelecer os perfis sanguíneos desse grupo de vertebrados, tendo em vista que os dados divulgados acerca desse aspecto ainda são muito tímidos (Blue-Mclendon; Green, 2010; Sabino *et al.*, 2011; Fortes *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2015; Gallo *et al.*, 2015).

Dessas pesquisas, observa-se que alguns autores sugerem que os dados obtidos sejam utilizados como parâmetros para a realização de estudos comparativos no tocante à hematologia de emas. Fortes *et al.* (2013) realizaram estudo com o objetivo de obter valores hematológicos para a espécie *Rhea americana*, utilizando 10 exemplares de diferentes idades, independente de sexo, criadas *ex situ*, em regime semi-intensivo. Os resultados para os parâmetros sanguíneos foram: hematócrito variando de 30 a 45, média 39,6%; hemoglobina de 9,4 a 26, média 16,3 g/dL; contagem total de eritrócitos de $1,6 \times 10^6$ a $2,9 \times 10^6$, média $2,4 \times 10^6$ por mm^3 de sangue; contagem total de leucócitos de 3.000 a 18.500, média 8.693 por mm^3 . Os valores relativos à contagem diferencial de leucócitos foram: heterófilos de 52 a 78, média 62,1%, totalizando 1.689 a 14.430, média 5.706 por mm^3 de sangue; eosinófilos de 0,3 a 3,1, média 2,2%, 39 a 360, média 176,4; basófilos de 1 a 6, média 2,7%, 58 a 363, média 208,2; monócitos de 1,4 a 9,7, média 6,0%, 171 a 1.115, média 450,2; linfócitos de 17,7 a 34,3, média 27,0%, 921 a 3.515, média 2.142.

Gallo *et al.*, (2015) realizaram um outro estudo com o objetivo de descrever valores e aspectos da hematologia de emas adultas, de ambos os sexos, cujos valores da série vermelha e dos índices hematimétricos foram: Eritrócitos ($2,81 \pm 0,15 \times 10^6 / \mu\text{L}$), Ht ($44,20 \pm 2,86\%$), Hb ($12,12 \pm 0,74 \text{ g/dL}$), VCM ($15,75 \pm 0,89 \text{ fL}$), HCM ($43,18 \pm 1,82 \text{ pg}$), CHCM ($27,44 \pm 0,80 \text{ g/dL}$); os valores da série branca foram: leucócitos ($12,072 \pm 4116 / \mu\text{L}$), heterofilos ($64,10 \pm 9,90\%$), eosinófilos ($2,05 \pm 2,06\%$), monócitos ($6,40 \pm 2,99\%$), linfócitos ($26,93 \pm 9,62\%$), basófilos ($0,52 \pm 1,27\%$). Esses valores hematológicos médios nas emas foram semelhantes aos valores de referência divulgados por Blue-Mclendon e Green (2010), com diferenças encontradas para a fração vermelha do hemograma, que incluíram contagens mais baixas de glóbulos vermelhos, valores inferiores de Ht e CHCM e valores mais elevados de VCM.

Ainda assim, são insipientes os dados disponíveis na literatura para definir parâmetros hematológicos nesta espécie. Não foram encontradas pesquisas que estabelecessem comparações entre sexos e diferentes faixas etárias para esses parâmetros em *Rhea americana*, sendo necessária a realização de novos estudos com esse intuito, e com amostra populacional considerável, realizando-se também a contagem de trombócitos, contribuindo para o aprimoramento dos dados.

2.4 COLETA E CONSERVAÇÃO DE SANGUE PERIFÉRICO EM AVES

O sucesso das análises de material sanguíneo é consequência de diversos cuidados que se iniciam previamente às coletas e devem observar aspectos como sexo e idade dos animais, assim como materiais, número de animais amostrados na população, dentre outros aspectos (Tessari *et al.*, 2015).

Clark *et al.*, (2009), afirmaram que o uso da técnica e o cuidado durante o procedimento de coleta sanguínea são fundamentais para a obtenção de amostras de qualidade para o exame hematológico e que a determinação do volume sanguíneo que pode ser obtido depende do peso corporal e do estado de saúde do animal, com a ressalva de que havendo algum nível de comprometimento, este volume deverá ser o mínimo possível e relataram ainda que, no caso das aves, o volume reduzido da amostra sanguínea constitui um fator limitante.

Em geral, considera-se seguro extrair até 10% do volume de sangue do animal, o que corresponde a aproximadamente 1% do peso corporal (Campbell e Ellis, 2007). Para amostras fracionadas, o ideal é que esse volume seja reduzido a 0,5% do peso corporal, porém, tratando-se das aves, apesar do baço não funcionar como um reservatório de eritrócitos, observa-se rápida recuperação após perdas de sangue (Clark *et al.*, 2009). A justificativa para este evento

é que como a vida média das hemácias das aves é mais curta que nos mamíferos, a regeneração é mais rápida (Capitelli; Crosta, 2013).

Capitelli e Crosta (2013) afirmaram que a técnica a ser utilizada na coleta sanguínea e o mecanismo de contenção dependem de fatores como tamanho do animal, agressividade, familiaridade do animal com os humanos e habilidade do veterinário. Em determinadas situações, sugere a utilização de objeto que limite os movimentos ou obstruir a visão do animal, reduzindo os riscos de ferimentos e facilitando a coleta. Durante o procedimento, cabe observar que o mecanismo de respiração das aves não apresenta a musculatura diafragmática e, portanto, a compressão exagerada dos sacos aéreos durante a contenção pode impedir a ventilação e levar a asfixia (Ritchie *et al.*, 1994).

A coleta do sangue periférico de aves pode ser feita por meio da punção da veia jugular direita, da veia ulnar (ou da asa) ou da metatarsiana medial. A escolha do local dependerá da espécie (Clark *et al.*, 2009). Todavia, ainda que haja algumas exceções, a veia jugular direita é a escolha preferencial na maioria das espécies. Levando em conta as duas jugulares, a direita é mais superficial e, com isso, o acesso é facilitado, apesar de ser muito móvel, sendo necessário estabilizá-la (Capitelli e Crosta, 2013).

Quanto ao anticoagulante de escolha para análise hematológica em aves, Capitelli e Crosta (2013) recomendam o uso do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por este apresentar menos interferência na amostra. O autor coloca que este processo é muito rápido e requer uma maior agilidade do clínico, para evitar a coagulação da amostra, o que invalidaria o exame hematológico. Deste modo, o recomendável é que após a obtenção do sangue, sejam realizados dois esfregaços com gotas de sangue sem anticoagulante e o restante transferido rapidamente para o tubo contendo EDTA (Campbell e Ellis, 2007).

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

3.1 Os valores de referência da hematologia de emas variam entre os sexos e idades dos animais.

3.2 A morfometria das células sanguíneas de emas varia em função da idade.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a morfologia, morfometria e o perfil hematológico de células sanguíneas de emas (*Rhea americana*), criadas em cativeiro no semiárido potiguar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever morfologicamente as células sanguíneas de emas;
- b) Estabelecer o tamanho médio dos eritrócitos, trombócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, considerando os sexos e diferentes idades;
- c) Definir os parâmetros hematológicos de emas, considerando os sexos e diferentes idades;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DE AMOSTRAGEM

Neste estudo foram utilizados 48 exemplares de *Rhea americana* (Figura 1), popularmente conhecida como ema, de ambos os sexos, distribuídos em três grupos, de acordo com a idade: jovens (cinco a nove meses), juvenis (11 a 15 meses) e adultos (2,5 a 3,5 anos), compostos por 20, 11 e 17 animais, respectivamente. Os animais foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), do município de Mossoró (5° 11' 17" S, 37° 20' 39" W), Rio Grande do Norte, Brasil. O CEMAS ocupa uma área de 20 ha e está registrado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como criadouro científico sob o número 1478912.

Figura 1. Emas (*Rhea americana*) no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA, 2024.



Fonte: Acervo do Autor (2024).

Os animais estavam distribuídos em nove piquetes telados e identificados por números, com acentuada cobertura vegetal (Figura 02), e tinham livre acesso a bebedouros e comedouros, de maneira que dispusessem de ração e água tratada diariamente. As aves são sexadas e registradas em planilhas com base em identificação feita em placas pendulares confeccionadas em alumínio.

Quanto à alimentação, os animais recebem, diariamente, ração peletizada para emas, composta de farelo de milho, trigo, soja, microminerais e vitaminas e adicionalmente frutas como mamão, goiaba e melancia e ramos de vegetais como volumosos.

Figura 2. Fotografia dos piquetes, onde estão distribuídos os animais, mostrando a estrutura formada por telas e a cobertura vegetal.



Fonte: Acerto do Autor (2024).

5.2 COLETA DO MATERIAL

A coleta do material ocorreu entre os meses de novembro de 2023 e fevereiro de 2024 e a contenção dos animais foi realizada por meios físicos pelos tratadores do próprio CEMAS, com cuidados especiais para não asfixiar os animais contidos e visando o menor grau de estresse

possível. Considerando que a coleta de uma amostra de alta qualidade é uma das partes mais importantes do exame hematológico, sendo essenciais a técnica e o cuidado no procedimento, foram adotadas todas as medidas necessárias, a fim de minimizar alterações nas respostas fisiológicas. Destaca-se que o tempo entre cada contenção e coleta nunca ultrapassou mais do que 10 minutos.

As amostragens foram realizadas no período da manhã, às 6h, para evitar estresse térmico. Após a contenção, foram colhidos 5 mL de sangue periférico de cada animal, por punção da veia braquial (veia da asa), realizando-se previamente a antissepsia local com solução de álcool iodado a 2%. Para isso, foram utilizadas seringas de 5 mL e *scalp* 23G, ambos descartáveis. Todas as coletas foram feitas sem a adição de anticoagulante à seringa.

Das amostras coletadas, para cada animal eram confeccionados esfregaços em três lâminas de vidro que, após secas e fixadas, eram coradas, em parte, com kit Panótico Rápido, o qual se baseia no princípio de coloração hematológica estabelecido por Romanowsky, e outra parte com Giemsa, segundo o protocolo de Valkiūnas (2004). Imediatamente após a confecção dos esfregaços, o volume sanguíneo restante era acondicionado em tubos de vidro contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em solução a 10%, identificados e mantidos sob refrigeração (4°C) até o seu processamento, por um período máximo de 5 horas após a coleta.

Os dados de cada coleta eram catalogados em uma ficha de acompanhamento contendo as informações de cada animal amostrado, conforme demonstrada no Apêndice A.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

5.3.1 Morfologia das células sanguíneas

A caracterização morfológica das células sanguíneas das emas foi feita utilizando-se técnicas de microscopia de luz convencional e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

a) Microscopia de luz

Para análise com microscopia de luz, os esfregaços sanguíneos, produzidos em triplicata, foram, em parte, corados pelo método de Panótico Rápido, seguindo as diretrizes previamente estabelecidas para coloração de Romanowsky, e outra parte fixada em metanol absoluto por 1 minuto e corados pelo método de Giemsa por 1 hora, seguindo o protocolo de Valkiūnas (2004). Após essa etapa, as lâminas foram analisadas por meio de um microscópio

óptico (Leica DM 500 HD) em aumento de 40x e de 100x (óleo de imersão) e as imagens mais representativas foram fotografadas utilizando um equipamento Leica ICC50 HD. As imagens obtidas com objetiva de 40x foram utilizadas, especialmente, as análises de morfometria das células sanguíneas, enquanto as imagens obtidas com a objetiva de 100x foram utilizadas para caracterizar a morfologia dos tipos celulares sanguíneos.

b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise dos tipos celulares do sangue de emas por meio de microscopia eletrônica de varredura, realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Vegetais do Semi-Árido (CPVSA) da UFERSA, foram utilizados 1 mL de cada amostra sanguínea, que foi disperso em solução de Karnovsky (PBS - Tampão fosfato de sódio 0,1 Molar em pH 7,4 a 4°C.) na relação 1:5 e após cerca de 30 minutos de fixação foi, então, centrifugado a 2.200 rpm por 5 minutos, para formação de um pellet.

Após esse tempo, os pellets foram removidos dos tubos sendo a série branca separada e diluída em 2 mL em de PBS e agitada levemente para homogeneizar a dispersão. Em seguida, a solução era distribuída em lâminas de vidros de 2x2 cm² e após secas eram coradas pelo Método do Panótico Rápido.

Posteriormente, as lâminas eram submetidas ao processo de metalização com ouro por “sputtering” (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., Laughton, East Sussex, UK), para então serem analisadas em microscópio eletrônico de varredura, sendo capturadas imagens com um detector de elétrons secundário em MEV (TESCAN VEJA 3 LMU, Tescan, Czech Republic), operando com um feixe de elétrons de 10kV.

5.3.2 Morfometria das células sanguíneas

Das lâminas obtidas de cada animal foi realizada a análise da morfometria das células sanguíneas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Leica DM 500 HD, em objetiva de 40x, com câmera Leica ICC50W acoplada e as imagens foram obtidas utilizando o programa LAS EZ Ink. Após serem identificados, os tipos celulares foram mensurados com auxílio do software ImageJ bundled with 64-bit Java 8. Foram medidas 5 células do mesmo tipo por animal, totalizando 95 mensurações por tipo celular para machos e 145 para fêmeas, com exceção dos basófilos, obtendo-se, assim, diâmetro médio geral da amostra e desvio padrão.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os exames laboratoriais dos animais foram realizados no setor de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Para a determinação do volume globular ou hematócrito (Ht) empregou-se o método do microhematócrito (Harvey, 2011), em que três quartos de um tubo capilar foram preenchidos com sangue total e uma das extremidades foi vedada com massa seladora. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos, utilizando-se a centrífuga Excelsa® 3400 Flex (FANEM), e o resultado foi determinado utilizando-se régua própria para leitura de hematócrito. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada utilizando-se a solução de Drabkin e avaliada em equipamento da Bioplus (BIO-2000), cuja leitura foi realizada com absorbância medida em 540 nm.

A determinação das proteínas plasmáticas totais (PPT) foi realizada por refratometria, utilizando-se o refratômetro de mão QUIMIS® Q767. Os tubos capilares utilizados para a determinação de microhematócrito de cada ave foram seccionados no limite entre o plasma e os elementos figurados sanguíneos; parte do plasma foi depositada no refratômetro, após sua calibração com água destilada, fornecendo a determinação das proteínas plasmáticas em g/dL.

Para a contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos utilizou-se o método de Natt-Herrick (Carisch *et al.*, 2019), que consiste na preparação da solução de Natt-Herrick (utilizada como diluente e corante). Para tanto, o sangue total foi diluído em razão de 1:200, utilizando a solução de Natt-Herrick. Posteriormente à homogeneização, o sangue diluído foi utilizado para preencher a câmara de contagem hematimétrica (câmara de Neubauer), permanecendo em repouso por 5 minutos, previamente à contagem. Assim, as células de cada quadrante da câmara de Neubauer foram diferenciadas e enumeradas com auxílio de microscópio óptico (Olympus CX 31RBSFA) em aumento de 40x. A concentração de cada tipo celular foi determinada por meio das equações I, II e III (Clark *et al.*, 2009).

a) Determinação do número de eritrócitos pelo método de Natt-Herrick:

$$N^{\circ} \text{ de eritrócitos} = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{altura} \times \text{diluição} \times n^{\circ} \text{ de quadrados} \quad (\text{I})$$

b) Determinação do número de leucócitos pelo método de Natt-Herrick:

$$N^{\circ} \text{ de leucócitos} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{altura (10)} \times \text{diluição}}{N^{\circ} \text{ de quadrados}} \quad (II)$$

c) Determinação do número de trombócitos pelo método de Natt-Herrick:

$$N^{\circ} \text{ de trombócitos} = \frac{\frac{N^{\circ} \text{ de trombócitos em 5 campos}}{5} \times N^{\circ} \text{ de eritrócitos}}{1.000 \times 1.000.000} \quad (III)$$

Quanto aos valores de volume corpuscular médio (VCM), de hemoglobina corpuscular média (HCM) e de concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), estes foram obtidos utilizando-se a metodologia descrita por Thrall *et al.* (2015), conforme as equações IV, V e VI, e os valores foram expressos em fentolitros (fL), picogramas (pg) e gramas por decilitro (g/dL), respectivamente. Essa metodologia foi desenvolvida para estudos com sangue de mamíferos, mas tem sido largamente utilizada para análise de sangue de aves.

$$VCM \text{ (fL)} = \frac{\text{Hematócrito (\%)} \times 10}{\text{Eritrócitos (em milhões)}} \quad (IV)$$

$$HCM \text{ (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}} \right) \times 10}{\text{Eritrócitos (em milhões)}} \quad (V)$$

$$CHCM \text{ (g/dL)} = \frac{\text{Hemoglobina} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}} \right) \times 100 (\%)}{\text{Hematócrito (\%)}} \quad (VI)$$

A contagem do diferencial de leucócitos foi realizada por meio de método manual. Após a fixação e coloração das extensões sanguíneas, descritas no item 6.3.1 para microscopia de luz, utilizando-se um microscópio óptico (Olympus CX 31RBSFA) em aumento de 100 x em óleo de imersão, para observação dos tipos celulares - heterófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos - contando 100 células por lâmina e fornecendo o resultado relativo da diferencial de leucócitos, expresso em unidades por microlitro (μL).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para calcular os valores de tendência central e comparar os comprimentos (diâmetro maior) e larguras (diâmetro menor) médios dos eritrócitos, bem como de seus núcleos, além do diâmetro médio geral de leucócitos e trombócitos presentes no sangue das emas, os dados foram submetidos a testes para verificar a parametricidade através das premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (Levene), apresentando-se como paramétricos. Assim sendo, foi então aplicado o teste t de Student, considerando-se significativo um valor de $p \leq 0,05$.

Com relação à análise dos parâmetros sanguíneos, em que buscou-se avaliar a existência de diferenças significativas para estes parâmetros entre diferentes faixas etárias e sexos dos animais, os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney-Wilcoxon foram escolhidos, pois os dados foram considerados como não-paramétricos, segundo indicou o teste de Shapiro-Wilk.

A utilização dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney-Wilcoxon justifica-se pela natureza não normal dos dados hematológicos e pela necessidade de comparar múltiplas faixas etárias e sexos, cujos resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Como análise adicional à realização do teste de Kruskal-Wallis, foram realizados testes post-hoc, para identificar quais grupos apresentaram diferenças significativas entre si.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos a aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio), sob solicitação de nº 91444, porém a pesquisa envolveu somente atividades *ex situ* (coleta de sangue de emas criadas em cativeiro), prescindindo de autorização ICMBio, de acordo com a Portaria ICMBIO nº 748, de 19 de setembro de 2022. Estes protocolos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFERSA (CEUA nº 29/2024).

6 RESULTADOS

6.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Os esfregaços de sangue de emas fixados e corados foram avaliados, quanto à morfologia das células sanguíneas, por microscopia óptica. Foram observados todos os tipos de célula encontrados nas aves em geral: eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Estes últimos, foram representados por granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos), linfócitos e monócitos, que apresentam morfologias distintas (Figura 3: a-f).

Os eritrócitos apresentam-se com forma oval à elíptica, nucleados, com núcleo também em formato oval ou elíptico, disposto em posição central, com cromatina condensada; o citoplasma abundante e acidófilo. Este apresenta coloração rósea-alaranjada, enquanto o núcleo destaca-se pela sua cor roxa escura intensa (Figura 3: a).

Os heterófilos são os leucócitos circulantes encontrados em maior quantidade nas extensões sanguíneas. Quanto à morfologia, apresentam-se como células grandes, com forma arredondada e uma alta relação citoplasma/núcleo. Os núcleos mostram-se bilobulares ou trilobulares, excêntricos, basofílicos, de cor púrpura, com regiões mais escuras contendo cromatina condensada. O citoplasma apresenta-se mais claro, com grânulos intensamente eosinofílicos, fusiformes, vermelhos ou laranja, em forma de bastonete (Figura 3: a).

Os basófilos apresentam forma esférica, destacando-se dos demais tipos de células por seus grânulos corarem-se de um azul escuro e intenso, que recobrem parcialmente o núcleo (Figura 3: b). Este apresenta-se central, arredondado, não segmentado e grande, ocupando grande parte do volume da célula e com regiões de cromatina condensada; o citoplasma apresenta-se escasso, de cor púrpura e preenchido pelos grânulos esféricos, fortemente corados. Quando comparado aos heterófilos e eosinófilos, os basófilos mostram-se menores.

Os eosinófilos observados são caracterizados como células arredondadas, com citoplasma fracamente corado, mais basofílico quando comparado ao dos heterófilos, apresentando grânulos pequenos e redondos, eosinofílicos, de coloração acidófila intensa, entre o rosa e o laranja, distribuídos uniformemente em aglomerados ou às vezes no núcleo. Este, por sua vez, mostra-se basofílico e polimórfico, geralmente bilobulado, com cromatina condensada, localizado central ou periféricamente em relação ao citoplasma, apresentando coloração violeta (Figura 3: c).

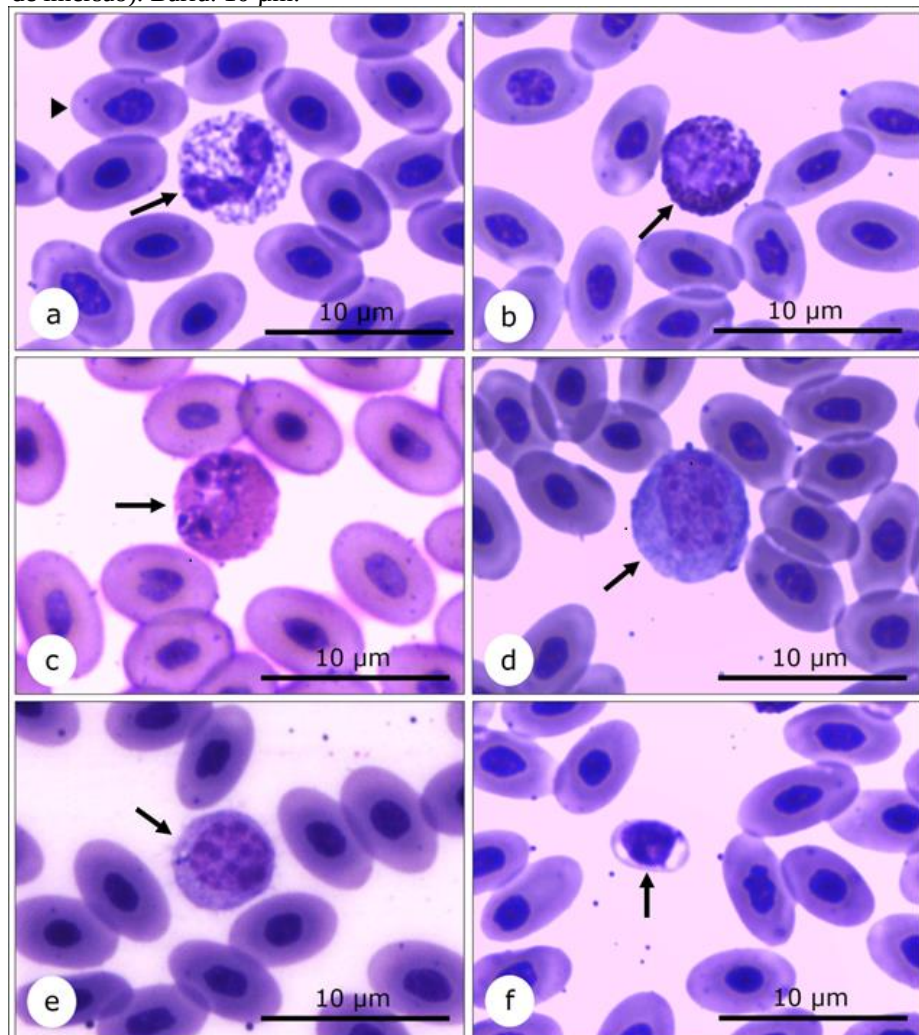
Os monócitos caracterizam-se como células grandes, maiores que os linfócitos, com formato arredondado ou irregular, citoplasma basofílico e abundante, azul acinzentado,

podendo-se observar vacúolos e pequenos grânulos em tons azuis escuros. Quanto ao núcleo, este apresenta variações em seu formato, de redondo a rineforme, cromatina pouco condensada quando comparada a dos linfócitos (Figura 3: d).

Os linfócitos identificados nas extensões sanguíneas mostram-se arredondados, com núcleo ligeiramente excêntrico, apresentando áreas de cromatina densamente condensada e uma alta relação núcleo/citoplasma. O citoplasma desta linhagem de células apresenta-se de escasso a moderado, ocupando pouco espaço quando comparado ao núcleo, homogêneo, basofílico, de tom azul claro, sem grânulos citoplasmáticos e sem vacuolização (Figura 3: e).

Os trombócitos, por sua vez, mostram-se como as menores células do sangue periférico, apresentando, aproximadamente, um terço do tamanho de um eritrócito maduro (Figura 3: f). Seu formato é geralmente elíptico, com um núcleo arredondado a elíptico, fortemente basofílico, contendo cromatina intensamente condensada e ocupando quase toda a célula, conferindo uma elevada relação núcleo/citoplasma. O citoplasma apresenta-se escasso, restrito aos polos da célula, fracamente corado, cuja aparência serve para diferenciá-los da linhagem linfocítica, podendo ocorrer vacuolizações.

Figura 3. Fotomicrografias de esfregaços sanguíneos de emas (*Rhea americana*), em que aparecem em destaque, centralizados e identificados através de setas ou cabeça de seta, as células sanguíneas encontrados nestes animais, para caracterização da morfologia. Em (a), observa-se um heterofilo (seta), apresentando formato arredondado, núcleo excêntrico, de coloração púrpura, lobulado e cromatina condensada; seu citoplasma é claro, contendo grânulos fusiformes e eosinofílicos. Em seu entorno, encontram-se vários eritrócitos maduros (cabeça de seta), apresentando formato elíptico, núcleo centralizado, cromatina condensada, fortemente corado; citoplasma abundante e acidófilo. Em (b), destaca-se o basófilo (seta), de formato esférico, apresentando grânulos citoplasmáticos redondos de coloração azul intensa; seu núcleo é redondo, central, não lobulado e denso. Em (c), tem-se um eosinófilo (seta) em destaque, mostrando seu formato redondo, com núcleo excêntrico, lobulado, basofílico e cromatina densa; seu citoplasma apresenta-se claro, contendo grande quantidade de grânulos redondos, acidófilos, de coloração róseo-alaranjada. Em (d), destaca-se, ao meio, um monócito (seta), de formato arredondado, citoplasma abundante, basofílico, apresentando poucos grânulos azuis escuros e um núcleo não segmentado, com cromatina geralmente frouxa, apresentando poucos pontos de condensação. Em (e), observa-se um linfócito (seta) em destaque, mostrando-se arredondado, com núcleo ligeiramente excêntrico, com alguns pontos de cromatina condensada; seu citoplasma ocupa pouco espaço ao redor do núcleo, apresentando-se homogêneo, basofílico, corado em tom de azul claro. Em (f), destaca-se o trombócito (seta), com formato elíptico, núcleo grande, ocupando grande espaço na célula e cromatina intensamente condensada; seu citoplasma escasso, hialino, restringe-se aos polos da célula. Colorações - Giemsa: a, b, d, e, f. Panótico: c. Aumento de 100x (óleo de imersão). Barra: 10 μ m.

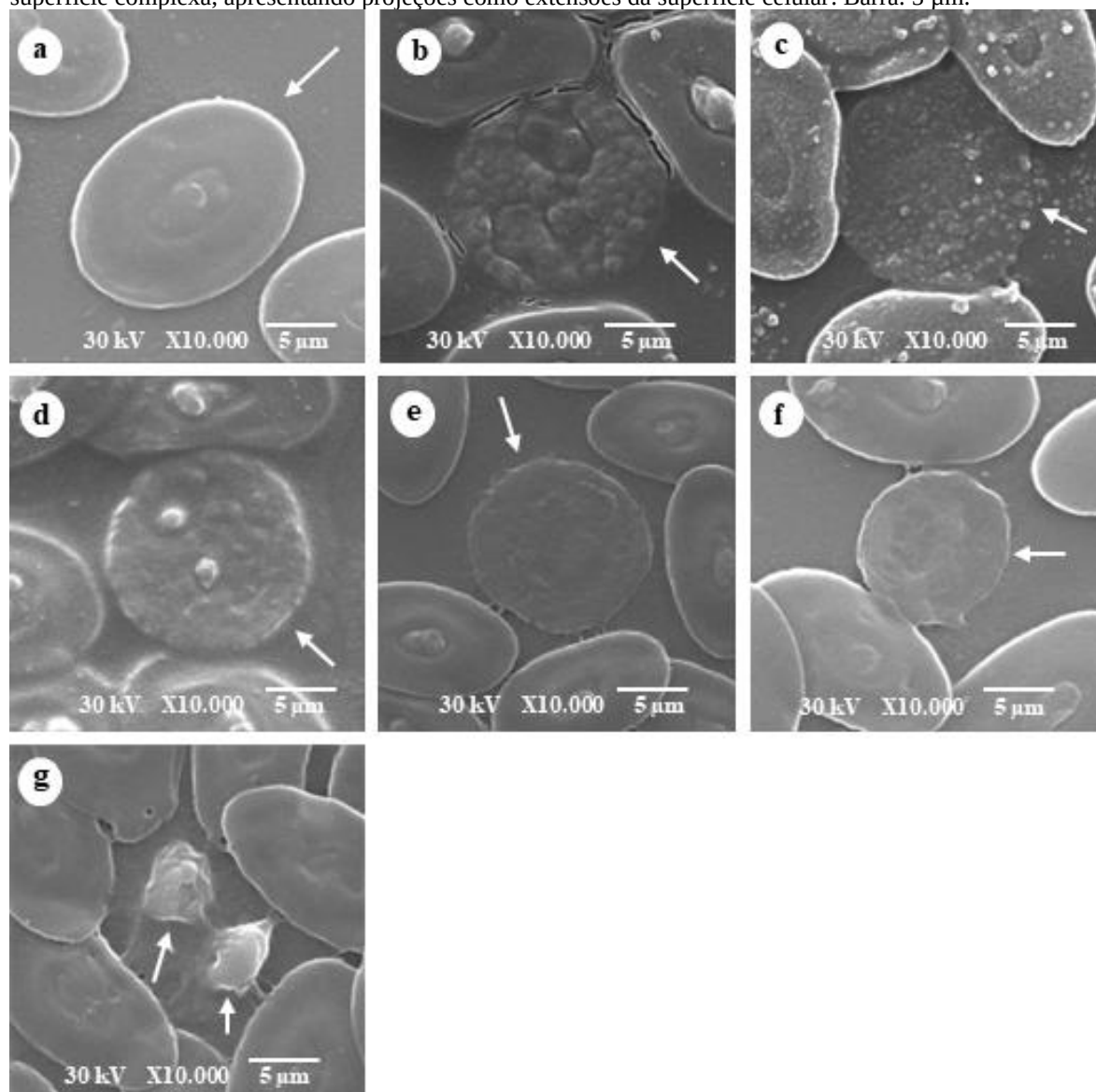


Fonte: Acervo do Autor (2024).

6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

De forma complementar, analisou-se a superfície das células sanguíneas de *Rhea americana* para a caracterização da morfologia, utilizando-se a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com ampliação de 10.000 vezes (Figura 4).

Figura 4. Micrografias dos principais tipos de célula sanguínea de emas (*Rhea americana*) observados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em ampliação de 10.000 vezes. (a) Eritrócito (seta), apresentando superfície lisa, uniforme, com forma elíptica e uma proeminência mais interna, central, contrastando com a membrana celular, representando o núcleo. (b) Heterofilo (seta) redondo, com superfície de membrana irregular, protuberâncias em função das granulações citoplasmáticas em torno do núcleo segmentado. (c) Basófilo (seta) redondo, com superfície irregular, com rugosidades e elevações, granulações citoplasmáticas densas submembranares, como elevações na superfície da célula. (d) Eosinófilo (seta) com forma redonda, superfície irregular, com grânulos submembranares projetando-se para a superfície de membrana. (e) Monócito (seta) forma redonda, com superfície geralmente irregular, apresentando rugosidades. (f) Linfócito (seta) redondo, com superfície relativamente áspera, indícios de granulações ou de outras estruturas submembranares através da superfície de membrana. (g) Trombócitos (setas) elípticos, com superfície complexa, apresentando projeções como extensões da superfície celular. Barra: 5 μm .



Fonte: Acervo do Autor (2024).

Os eritrócitos maduros (Figura 4: a) das emas são planos, com uma superfície lisa, relativamente uniforme, sem grandes rugosidades ou projeções, com forma elíptica, apresentando uma estrutura proeminente mais interna, centralizada na célula, de forma também elíptica, representando o núcleo. Quanto ao aspecto do núcleo este apresenta uma textura diferente, contrastando com a membrana celular.

Quanto aos leucócitos granulócitos, observou-se que os heterófilos (Figura 4: b) são redondos, com uma superfície de membrana irregular, apresentando rugosidades e protuberâncias devido às granulações citoplasmáticas e outras estruturas submembranares, delimitando a estrutura do núcleo segmentado. Os basófilos (Figura 4: c), por sua vez, são arredondados e apresentam uma superfície irregular e texturizada, com áreas de rugosidades e elevações, em função da presença de microvilosidades e possíveis projeções da membrana plasmática. Suas granulações citoplasmáticas aparecem como áreas densamente granulares sob a membrana plasmática, evidenciando-se como pequenas elevações ou pequenas projeções na superfície da célula. Essas irregularidades da superfície e as projeções podem conferir uma aparência ocasionalmente deformada ou denteada. Já os eosinófilos (Figura 4: d) são células também de formato arredondado, com uma superfície geralmente irregular, apresentando rugosidades, com muitos grânulos esféricos submembranares ou estruturas semelhantes a vilosidades projetando-se para sua superfície de membrana.

Os monócitos (Figura 4: e) são maiores que os linfócitos. Eles apresentam forma arredondada, com uma superfície de membrana também irregular, apresentando rugosidades, dobras e projeções. Os linfócitos (Figura 4: f) são pequenas células redondas, apresentando uma textura de membrana relativamente áspera, além de mostrar algumas irregularidades, com algumas projeções finas na superfície. Observou-se indícios de granulações ou de outras estruturas submembranares através da textura de sua superfície.

No que se refere aos trombócitos (Figura 4: g), estes têm forma geralmente elíptica, apresentando uma superfície bastante complexa, com várias irregularidades, rugosidades e dobras. Percebeu-se a presença de extensões da membrana celular, como pseudópodes ou outras pequenas projeções.

6.2 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS

Os dados morfométricos (diâmetro, diâmetro maior e diâmetro menor) foram analisados em função do sexo (Tabela 1) e da faixa etária (Tabela 2) dos animais, com o intuito de investigar possíveis diferenças na morfometria das células sanguíneas para estas variáveis, e

são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. Para tanto, realizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk e o teste de homoscedasticidade de Levene para dados paramétricos, e foi aplicado o teste t , adotando-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Levando-se em conta a morfologia dos eritrócitos das emas, cuja forma varia de oval a elíptico, foi necessário medir o diâmetro maior (D) e o diâmetro menor (d) destas células, bem como o diâmetro maior (N) e o diâmetro menor (n) de seu núcleo, que apresenta forma semelhante. Para os demais tipos celulares, leucócitos e trombócitos, obteve-se a medida do diâmetro. Quanto aos basófilos, devido a baixa quantidade desse tipo celular nas extensões sanguíneas utilizadas para realizar as mensurações, não foram realizadas análises morfométricas para estes.

Quando os dados morfométricos das células sanguíneas são comparados em relação ao sexo do animal, evidencia-se, estatisticamente, a existência de diferença significativa em relação aos trombócitos dos machos ($6,56 \pm 1,08$) em comparação aos trombócitos das fêmeas ($8,10 \pm 2,40$) (Tabela 1).

Tabela 1: Morfometria das células sanguíneas de emas (*Rhea americana* Linnaeus, 1758), criadas em cativeiro, em função do sexo. CEMAS/UFERSA – 2024.

Parâmetros	Emas		Teste	p*
	Machos	Fêmeas		
Eritrócitos D (μm)	12,75 $\pm$ 1,47 ^a	12,62 $\pm$ 0,82 ^a	-0,16	0,87
Eritrócitos d (μm)	7,69 $\pm$ 0,57 ^a	7,06 $\pm$ 1,48 ^a	-0,88	0,40
Eritrócitos N (μm)	5,32 $\pm$ 0,48 ^a	5,20 $\pm$ 0,80 ^a	-0,28	0,78
Eritrócitos n (μm)	3,70 $\pm$ 0,48 ^a	3,55 $\pm$ 0,81 ^a	-0,33	0,74
Heterofilos (μm)	12,53 $\pm$ 0,53 ^a	12,18 $\pm$ 0,32 ^a	-0,68	0,51
Linfócitos (μm)	6,38 $\pm$ 0,85 ^a	6,19 $\pm$ 0,59 ^a	-0,37	0,71
Eosinófilos (μm)	11,80 $\pm$ 1,94 ^a	12,53 $\pm$ 1,24 ^a	0,84	0,40
Monócitos (μm)	14,95 $\pm$ 0,76 ^a	14,64 $\pm$ 1,02 ^a	1,31	0,19
Basófilos (μm)	-	-	-	-
Trombócitos (μm)	6,56 $\pm$ 1,08 ^a	8,10 $\pm$ 2,40 ^b	2,26	0,05

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais. *Grau de significância ($p \leq 0,05$).

Da mesma forma, a morfometria das células sanguíneas das emas foi comparada entre animais jovens, juvenis e adultos, com o objetivo de verificar a existência de possíveis diferenças significativas nas medidas dos parâmetros analisados para diferentes faixas etárias. No entanto, somente o diâmetro maior (D) dos eritrócitos de emas adultas varia em relação ao diâmetro maior (D) de emas jovens e juvenis, não havendo diferença para este parâmetro entre

estes dois últimos grupos (Tabela 2). A mensuração dos demais parâmetros não varia significativamente entre os grupos (jovens, juvenis e adultos).

Tabela 2: Morfometria das células sanguíneas de emas (*Rhea americana* Linnaeus, 1758), criadas em cativeiro, em função da idade. CEMAS/UFERSA – 2024.

Parâmetros	Emas			Teste	p*
	Jovens	Juvenis	Adultos		
Eritrócitos D (µm)	11,82±0,87 ^a	12,32±1,54 ^a	13,56±0,43 ^b	3,99	0,004*
Eritrócitos d (µm)	7,84±0,68 ^a	8,02±0,94 ^a	6,92±1,33 ^a	-1,37	0,20
Eritrócitos N (µm)	5,02±0,64 ^a	5,18±0,59 ^a	5,51±0,56 ^a	1,28	0,23
Eritrócitos n (µm)	3,48±0,52 ^a	3,42±0,58 ^a	3,75±0,77 ^a	1,28	0,23
Heterófilos (µm)	12,34±0,78 ^a	12,42±1,03 ^a	12,36±0,84 ^a	0,02	0,98
Linfócitos (µm)	6,13±0,99 ^a	5,96±0,61 ^a	5,97±0,47 ^a	-0,37	0,71
Eosinófilos (µm)	10,90±1,98 ^a	10,92±1,98 ^a	11,99±1,34 ^a	1,43	0,18
Monócitos (µm)	14,30±1,85 ^a	14,57±1,29 ^a	15,15±1,60 ^a	2,10	0,19
Basófilos (µm)	-	-	-	-	-
Trombócitos (µm)	6,84±1,40 ^a	6,32±0,81 ^a	7,82±2,42 ^a	0,20	0,84

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais. *Grau de significância ($p \leq 0,05$).

6.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

No presente estudo, foram analisadas amostras sanguíneas de 48 animais da espécie *Rhea americana* para a caracterização do perfil hematológico e estabelecimento de comparações quanto ao sexo e a faixa etária dos animais, que foram agrupados em jovens, juvenis e adultos. Foram analisados os seguintes parâmetros: Eritrócitos, Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Leucócitos, Heterófilos, Linfócitos, Eosinófilos, Monócitos, Basófilos, Trombócitos e Proteínas Plasmáticas Totais, e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Os resultados dos testes de Kruskal-Wallis indicam que, ao nível de significância de 5%, existem diferenças significativas nos níveis de Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito, VCM, HCM, Proteínas Totais, Leucócitos, Eosinófilos, Monócitos e Trombócitos entre as diferentes faixas etárias dos animais. Não existem diferenças significativas nos níveis de CHCM, Heterófilos, Linfócitos e Basófilos entre as faixas etárias (Tabela 3).

De forma complementar, foram realizados testes post-hoc Dunn, com correção de Bonferroni, que confirmaram várias comparações significativas entre as faixas etárias para diferentes parâmetros hematológicos (Tabela 3). Para os eritrócitos, as adultas ($2,84 \pm 0,61$)

apresentam contagens significativamente maiores em comparação com jovens ($2,09 \pm 0,37$) e juvenis ($2,06 \pm 0,29$). Em termos de hemoglobina, há uma diferença significativa tanto entre adultas ($13,5 \pm 3,84$) e jovens ($11,5 \pm 1,31$) quanto entre jovens e juvenis ($13,6 \pm 0,85$), indicando variações notáveis entre essas faixas etárias. O hematócrito também mostra diferenças significativas entre adultas ($45,7 \pm 3,58$) e jovens ($35,3 \pm 3,62$), bem como entre jovens e juvenis ($42,6 \pm 2,84$). Para o volume corpuscular médio (VCM), a faixa etária juvenil ($21 \pm 2,92$) apresenta diferenças significativas em relação às adultas ($16,8 \pm 3,97$) e jovens ($17,4 \pm 3,64$). A hemoglobina corpuscular média (HCM) revela uma diferença significativa entre juvenis ($66,9 \pm 9,58$) e adultas ($52,8 \pm 13,5$), assim como entre juvenis e jovens ($57,0 \pm 13,4$).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos para emas (*Rhea americana*) jovens, juvenis e adultas, criadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres. CEMAS/UFERSA – 2024.

Parâmetros analisados		Unidade	N ¹	Jovens		Juvenis		Adultos	
				Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
Série Vermelha	Eritrócitos*	x10 ⁶ /μL	48	2,09	0,37 ^a	2,06	0,29 ^a	2,84	0,61 ^b
	Hemoglobina*	g/dL	48	11,5	1,31 ^a	13,6	0,854 ^b	13,5	3,84 ^b
	Hematócrito*	%	48	35,3	3,62 ^a	42,6	2,84 ^b	45,7	3,58 ^b
	VCM*	fL	48	17,4	3,64 ^a	21,0	2,92 ^b	16,8	3,97 ^a
	HCM*	pg	48	57,0	13,4 ^a	66,9	9,58 ^b	52,8	13,5 ^a
	CHCM	g/dL	48	32,6	2,15	31,8	0,968	31,2	2,20
Série Branca	Leucócitos*	/μL	48	24.788	19.345 ^a	13.500	2.438 ^{a,b}	24.433	8.779 ^{a,B}
	Heterófilos	%	48	70,8	6,35	69,2	5,78	67,9	6,20
	Linfócitos	%	48	22,0	6,38	23,4	5,77	27,3	6,51
	Eosinófilos*	%	48	1,76	1,03 ^a	2,73	0,90 ^{a,b}	0,80	0,86 ^{a,B}
	Monócitos*	%	48	3,40	1,34 ^{a,b}	4,18	0,87 ^a	3,40	0,82 ^{a,B}
	Basófilos	%	48	0,41	0,50	0,54	0,68	0,53	0,51
Trombócitos*		/μL	48	71.934	18.913 ^a	70.321	15.774 ^a	94.647	23.662 ^b
Proteínas Totais (PPT)*		g/dL	48	5,59	0,76 ^{a,b}	7,03	1,27 ^{a,B}	6,08	0,93 ^a

¹Número de animais amostrados. VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. *Parâmetros com variações significativas ($p \leq 0,05$) entre as faixas etárias. Letras iguais com alteração entre maiúsculas e minúsculas indicam diferença estatística.

As proteínas totais mostram uma diferença significativa apenas entre juvenis ($7,03 \pm 1,27$) e jovens ($5,59 \pm 0,76$). Em relação aos leucócitos, há uma diferença significativa entre adultas (24.433 ± 8.779) e juvenis (13.500 ± 2.438). Para os eosinófilos, observa-se uma diferença significativa entre adultas ($0,80 \pm 0,86$) e juvenis ($2,73 \pm 0,90$), com uma tendência de diferença entre adultas e jovens ($1,76 \pm 1,03$). A contagem de monócitos apresenta uma diferença significativa entre adultas ($3,40 \pm 0,82$) e jovens ($3,40 \pm 1,34$). Por fim, as trombócitos revelam diferenças significativas entre adultas (94.647 ± 23.662) e jovens (71.934 ± 18.913), bem como entre adultas e juvenis (70.321 ± 15.774) (Tabela 3).

Quando os parâmetros são comparados em relação ao sexo do animal, considerando-se um nível de significância de 5%, evidencia-se, estatisticamente, a existência de uma diferença significativa na Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) ($32,5 \pm 1,72$ para machos; $31,6 \pm 2,11$ para fêmeas) e nas Proteínas Totais ($5,64 \pm 0,83$ para machos; $6,42 \pm 1,16$ para fêmeas) entre os sexos (Tabela 4), indicando com base no teste de Wilcoxon Rank-Sum que a distribuição da CHCM e das proteínas totais diferem significativamente entre machos e fêmeas no seu conjunto de dados, com valores de p igual a 0,04038 e 0,01681, respectivamente, uma vez que foi considerado significativo valores de $p \leq 0,05$.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos para emas (*Rhea americana*) machos e fêmeas, criadas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres CEMAS/UFERSA – 2024.

	Parâmetros analisados	Unidade	N ¹	Machos		Fêmeas	
				Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
Série Vermelha	Eritrócitos	x10 ⁶ /μL	48	2,25	0,62	2,40	0,55
	Hemoglobina	g/dL	48	13,2	1,72	12,4	2,98
	Hematócrito	%	48	40,6	6,09	40,9	5,62
	VCM	fL	48	18,9	4,53	17,6	3,51
	HCM	pg	48	61,8	15,4	55,8	12,0
	CHCM*	g/dL	48	32,5	1,72 ^a	31,6	2,11 ^b
Série Branca	Leucócitos	/μL	48	20.731	13.965	22.396	14.124
	Heterófilos	%	48	69,3	6,15	69,4	6,25
	Linfócitos	%	48	24,8	7,31	23,9	6,22
	Eosinófilos	%	48	1,56	1,26	1,74	1,16
	Monócitos	%	48	4,0	1,32	4,41	1,25
	Basófilos	%	48	0,37	0,50	0,55	0,57
	Trombócitos	/μL	48	75.935	24.583	81.524	21.494
	Proteínas Totais (PPT)*	g/dL	48	5,64	0,83 ^a	6,42	1,16 ^b

¹Número de animais amostrados. VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. *Parâmetros com variações significativas ($p \leq 0,05$) entre os sexos. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

7 DISCUSSÃO

7.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O tecido sanguíneo é um tipo de tecido conjuntivo, composto por grande quantidade de plasma e células, sendo de fundamental importância para os animais (Khan *et al.*, 2011). Mudanças nos estados fisiológicos internos dos animais e estímulos do ambiente externo podem provocar alterações nas células sanguíneas. Neste sentido, o número, a morfologia e os componentes químicos dos diferentes tipos de célula sanguíneas podem representar o estado de saúde dos animais (Khan *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2018), e quaisquer mudanças incomuns podem ser associadas a alterações no estado de saúde do animal em função de inflamação, infecção por microrganismos patogênicos ou outras doenças (Salakij *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2014).

Em ampla perspectiva, a hematologia das aves assemelha-se a de outros vertebrados, especialmente a de humanos e outros mamíferos, ainda que haja algumas particularidades importantes, como a presença de núcleo nos eritrócitos e a existência de trombócitos e heterófilos, que equivalem às plaquetas e aos neutrófilos de mamíferos, respectivamente, no sangue periférico das aves (Campbell, 2015).

A morfologia dos eritrócitos encontrados nos esfregaços sanguíneos nos 48 exemplares de emas analisados seguem o mesmo padrão para outras aves, considerando os dados relatados na literatura, a exemplo das pesquisas desenvolvidas por Chanie (2014), Campbell (2015), Jones (2015), Pinto (2017), Bhattacharjee (2023), estudando hematologia de aves. A exemplo do observado nas aves por esses pesquisadores, nas emas os eritrócitos apresentam forma geométrica variando entre oval a elíptica, contendo um núcleo central de mesma geometria, de aparência uniforme, como nas espécies pesquisadas. Contudo, nossos resultados diferem dos achados de Blue-Mclendon e Green (2010) para eritrócitos, que ao estudarem células sanguíneas de ratitas, destacam que essas células eram ovais, com núcleos também ovais, a exemplo do que também relata Gallo *et al.* (2015) ao descrever a forma dos eritrócitos de emas adultas. Outro aspecto a considerar é que em nossos achados os eritrócitos, após corados com Panóptico Rápido, apresentaram citoplasma acidófilo, de cor róseo-alaranjada, e núcleo roxo escuro, com cromatina uniformemente aglomerada. Estes dados foram confrontados com os trabalhos desenvolvidos por Fortes *et al.* (2009) pesquisando emas adultas, o que permitiu que nós observássemos que os resultados para emas são similares aos do estudo desse pesquisador.

Chanie (2014) e Jones (2015), abordando sobre hematologia aviária, em que citam, dentre outras, aves do grupo das galinhas e dos falcões, respectivamente, ressaltam que dentre os leucócitos, os heterófilos foram as células encontradas em maior número nas extensões sanguíneas. Os achados morfológicos para essas células incluem sua forma arredondada, com relação citoplasma/núcleo elevada, núcleo lobulado, com cromatina condensada, geralmente excêntrico ou periférico; grânulos citoplasmáticos fusiformes, de cor vermelha ou alaranjada, semelhante ao que citam Fortes *et al.* (2009) e Gallo *et al.* (2015) para heterófilos de *Rhea americana*. É importante destacar que Gallo *et al.* (2015) especificam que também encontraram células monolobulares em suas análises, condição não identificada no nosso estudo, em que verificamos apenas a presença de heterófilos com dois ou mais lóbulos. Da mesma forma, é pertinente salientar que Blue-Mclendon e Green (2010), estudando as células sanguíneas de emas, descrevem que os heterófilos de ratitas possuem forma arredondada, núcleo segmentado, geralmente preenchido por grande quantidade de grânulos fusiformes de aspecto alaranjado e com um citoplasma claro, convergindo com os nossos achados descritos para o grupo de emas estudados no semiárido potiguar.

Os basófilos, considerados incomuns em esfregaços de sangue periférico de espécies aviárias (Jones, 2015), foram encontrados em baixa quantidade nos esfregaços sanguíneos. Contudo, foi possível descrever suas características com base nas técnicas de colorações utilizadas, conforme referenciado inicialmente. Tadjalli *et al.* (2013) relatam que os basófilos encontrados em sangue de avestruzes (*Struthio camelus*) são escassos e possuem forma arredondada, com um núcleo esférico, segmentado, situado em um lado do citoplasma. Este, por sua vez, continha grânulos esféricos, altamente basofílicos e geralmente sobrepunham o núcleo. Segundo alguns autores (Chanie, 2014; Campbell, 2015; Jones, 2015; Pinto, 2017), para as aves, em geral, os basófilos são ligeiramente menores que os heterófilos, possuem um citoplasma claro, de cor levemente azulada, núcleo não lobado e grânulos basofílicos redondos que muitas vezes obscurecem o núcleo. Em nossos esfregaços, esse grupo de células tem forma esférica, são menores que os demais granulócitos e o núcleo é central, arredondado, não segmentado e grande, de maneira que ocupa grande parte da célula, observando-se regiões com cromatina condensada. Essa condição faz com que o citoplasma seja reduzido. Ademais, o citoplasma cora-se na cor púrpura e é preenchido por grânulos esféricos, fortemente corados, condição que também pode ser observada quando se avalia os trabalhos desenvolvidos por Fortes *et al.* (2009) e Blue-Mclendon e Green (2010), analisando o sangue de emas e ratitas, de forma geral, respectivamente.

No que se refere aos eosinófilos, Pinto (2017) relata que existem variações, a depender da espécie, condição que leva o estudioso a recomendar a comparação com outros tipos celulares do esfregaço para facilitar a diferenciação. No entanto, eles comumente apresentam forma arredondada, um núcleo lobado e citoplasma azul claro, com grânulos eosinofílicos redondos a ovais que se coram de forma mais clara do que os dos heterófilos, devido a uma maior concentração de arginina nos grânulos dos eosinófilos, sendo possível diferenciá-los (Jones, 2015). Em ratitas, geralmente os eosinófilos têm núcleo bilobulado, citoplasma azul claro com grande quantidade de grânulos vermelhos para rosa, pequenos e redondos (Blue-Mclendon; Green, 2010). Em nossos achados para a espécie objeto de pesquisa desse estudo, os eosinófilos possuem forma geométrica esférica e apresentam o núcleo central ou periférico. Este apresenta coloração basofílica e aspecto polimórfico e com áreas de cromatina condensada, sendo geralmente bilobulado e grande, ocupando quase toda a célula. O citoplasma se apresenta reduzido em função do tamanho do núcleo e cora-se fracamente, dada a presença de poucos e pequenos grânulos eosinofílicos. Os estudos realizados por Fortes *et al.* (2009), referem-se a esse tipo celular exatamente dessa forma.

A análise dos esfregaços sanguíneos das emas utilizados nesse estudo permitiu descrever que os monócitos são células arredondadas, volumosas e com citoplasma abundante, com conteúdo que possui afinidade pelos corantes basofílicos. Os monócitos, também podem apresentar vacúolos citoplasmáticos e possuir núcleo variando sua forma entre oval e riniforme, além de cromatina frouxa, apresentando pequenos pontos de condensação, corroborando com os achados de Fortes *et al.* (2009) para monócitos de *Rhea americana*. Estudando ratitas, Blue-Mclendon e Green (2010) observaram monócitos grandes, com moderada quantidade de citoplasma azul acinzentado, apresentando vacúolos, com uma certa frequência, e núcleo pleomórfico, com cromatina menos condensada que nos linfócitos. Alguns autores como Jones (2015) e Pinto (2017) relataram a possibilidade de encontrar monócitos com núcleos de forma redonda em aves, porém não verificamos essa condição nas emas estudadas, bem como Almeida *et al.* (2015) e Tadjalli *et al.* (2013) também não verificaram em seus trabalhos com emus (*Dromaius novaehollandiae*) e avestruzes (*Struthio camelus*), respectivamente.

No que diz respeito aos linfócitos das aves, Mitchell e Johns (2008) inferem que a sua morfologia é semelhante a dos mamíferos, sendo representados por células redondas, de margem às vezes irregular, com o núcleo posicionado centralmente ou ligeiramente excêntrico, sendo a cromatina nuclear densamente condensada e a relação núcleo/citoplasma elevada, salvo naqueles linfócitos de maior tamanho. Nas aves, os linfócitos são considerados os menores e mais numerosos leucócitos mononucleares circulantes, segundo cita Bhattacharjee (2023) ao

desenvolver estudos com vários tipos de aves, como emas, emus, avestruzes, galinhas, gansos, onde relata que esses são células redondas, contendo núcleo redondo, não segmentado, localizado centralmente ou excêntricamente e cobrindo quase toda a célula, com cromatina condensada e corado em roxo. De acordo com o autor, nessas células o citoplasma é desprovido de vacúolos, é homogêneo, basofílico e apresenta um halo estreito ao redor do núcleo. Além disso, apresentam uma alta relação entre o volume do núcleo e o citoplasma.

Nas aves de nossa pesquisa, as análises dos esfregaços nos permitiram afirmar que os linfócitos são células arredondadas, contendo um núcleo acentuadamente grande em relação ao espaço citoplasmático e disposto muitas vezes de maneira excêntrica, onde se observam áreas de cromatina densamente condensada. O citoplasma desse grupo de células apresentou-se de escasso a moderado, uma vez que ele ocupa pouco espaço na célula quando comparado ao núcleo, homogêneo, basofílico, corado numa tonalidade de azul claro e desprovido de grânulos e de vacuolizações. Essa condição, foi descrita por Fortes *et al.* (2009) e Gallo *et al.* (2015) também em estudos com emas (*Rhea americana*).

Os trombócitos, nas aves e em vertebrados mais abaixo na escala evolutiva, são células sanguíneas nucleadas, funcionalmente equivalentes às plaquetas presentes no sangue dos mamíferos. Estas células, segundo Claver (2005), em sua pesquisa com trombócito aviário, são observadas nos esfregaços de sangue como células ovóides ou discóides, um pouco menores e mais arredondadas que os eritrócitos. Neles o núcleo é redondo ou oval e apresenta cromatina muito condensada, formando placas de heterocromatina e moderada quantidade de citoplasma azulado ou transparente que pode ser observado com aspecto reticular ou vacuolizado. Na superfície das dessas células podem ser observadas imagens de pseudópodes, lobopódios e invaginações da membrana plasmática.

Em *Rhea americana* os trombócitos caracterizaram-se por apresentar forma geralmente elíptica, com um núcleo arredondado a elíptico, fortemente basofílico, contendo cromatina condensada e ocupando quase toda a célula, conferindo uma elevada relação núcleo/citoplasma. Gallo e colaboradores (2015) encontraram trombócitos redondos ou ovais em seu estudo com emas, condição não verificada em nossa pesquisa. Fortes e colaboradores (2009) afirmaram que a forma elíptica dos trombócitos é exclusiva da espécie *Rhea americana*. De fato, em outras espécies de ratita, como avestruzes e emus, foram observados trombócitos com formato esférico a oval, como descrito por Tadjalli *et al.* (2013) e Almeida *et al.* (2015), respectivamente.

7.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Descrever de maneira minuciosa a superfície das células sanguíneas das aves pode proporcionar *insights* valiosos sobre a morfologia dessas células e, conseqüentemente, nos permite fazer correlações com situações associadas à saúde do animal, ao sistema imunológico e habilidade de combater doenças e lesões. Esses atributos desempenham um papel essencial na realização de diagnósticos e na aplicação de tratamentos eficientes na medicina veterinária voltada para aves.

Apesar da importância, após busca rebuscada na literatura, verificou-se a escassez de estudos que apresentassem resultados da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células sanguíneas de aves. Em nossa busca, localizamos um estudo com grou indiano (*Grus antigone sharpii*), realizado por Narkkong (2010) com o objetivo de descrever os aspectos da morfologia de células sanguíneas através da análise da superfície celular. Neste trabalho, os eritrócitos foram descritos como células planas, de superfície lisa; os linfócitos eram células redondas, com membrana rugosa; os monócitos eram maiores do que os linfócitos, e a superfície da membrana do linfócitos era diferente daquele dos monócitos; os heterófilos mostraram-se redondos, com grânulos esféricos regulares e espinhos na superfície da membrana; os basófilos eram células redondas, com uma superfície de membrana rugosa e continham espinhos que se projetavam da superfície da membrana; os eosinófilos eram células redondas com muitos espinhos esféricos projetando-se da superfície da membrana; e os trombócitos apresentavam um formato oval.

No entanto, as imagens de MEV apresentadas por Narkkong (2010) não mostram eritrócitos nucleados, apesar de sua análise por microscopia óptica mostrar células com núcleo. Em nossos achados para células sanguíneas de *Rhea americana* através de MEV, encontramos eritrócitos planos, com uma superfície lisa, relativamente uniforme, de formato elíptico, apresentando uma estrutura proeminente mais interna, centralizada na célula e bem destacada, de formato também elíptico, representando o núcleo. Outra diferença entre esses dois trabalhos, cuja discussão já havia sido iniciada, foi em relação ao formato dos trombócitos, uma vez que encontramos células de formato elíptico ou irregular, apresentando uma superfície bastante complexa, mostrando várias irregularidades, rugosidades e dobras, além da presença de extensões da membrana celular, como pseudópodes ou outras pequenas projeções e espículas, mostrando a adesão e interação com outros trombócitos e com a matriz extracelular.

A superfície celular dos leucócitos é especializada para se ligar e englobar patógenos, no processo conhecido como fagocitose. Assim, a estrutura e a morfologia dos leucócitos

analisadas por MEV, sugerem a presença de vilosidades, projeções e/ou espículas na superfície de membrana dessas células, que podem estar relacionadas ao processo de adaptação para uma resposta imunológica eficiente nas aves.

7.2 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS

Morfometricamente, os valores encontrados para emas neste estudo estavam dentro dos limites observados por Thrall e colaboradores (2015) para as aves em geral, destacando-se que foram utilizados animais jovens, juvenis e adultos em nossa pesquisa.

Quando mensuramos os eritrócitos das emas, encontramos valores médios para o diâmetro maior (D) de $12,75 \pm 1,47 \mu\text{m}$ e para o diâmetro menor (d) de $7,69 \pm 0,57 \mu\text{m}$ nos machos, sendo ligeiramente maiores do que os das fêmeas ($D = 12,62 \pm 0,82 \mu\text{m}$; $d = 7,06 \pm 1,48 \mu\text{m}$). Para essa mesma espécie, Gallo e colaboradores (2015) encontraram eritrócitos que mediram até $17 \mu\text{m}$ de comprimento e $12,35 \mu\text{m}$ de largura.

Ressalta-se que os eritrócitos maduros das aves podem variar em tamanho dependendo da espécie, mas normalmente estão na faixa de $10,7 \times 6,1 \mu\text{m}$ a $15,9 \times 10,2 \mu\text{m}$ (Thrall *et al.*, 2015). Neste sentido, os valores morfométricos que encontramos para os eritrócitos das emas foram menores do que aqueles encontrados para os eritrócitos em avestruzes machos por Sabino e colaboradores (2010), que apresentaram comprimento de $16,41 \pm 1,08 \mu\text{m}$ e largura de $9,66 \pm 0,75 \mu\text{m}$, salientando-se que essas variações interespecíficas podem estar relacionadas a fatores como o porte da espécie em estudo.

Almeida *et al.* (2015) também estudaram a morfometria de eritrócitos em pesquisa com emus, cujos valores, quando comparados os valores obtidos para emas, foram maiores, apresentando comprimento de $15,14 \pm 1,19 \mu\text{m}$ e largura de $9,45 \pm 0,81 \mu\text{m}$.

Sobre nossos resultados referentes à morfometria dos eritrócitos de *Rhea americana* em função do sexo, destaca-se que os dados não diferiram significativamente entre os sexos. Já Sabino e colaboradores (2010) encontraram eritrócitos com diâmetros maiores em avestruzes fêmeas quando comparadas com os machos. Para diferentes faixas etárias, encontramos diferenças significativas ($p < 0,004$) para o diâmetro maior (D) dos eritrócitos de animais adultos quando comparados com jovens e juvenis agrupados.

Essa tendência foi identificada por Sabino e colaboradores (2010) quando compararam os diâmetros dos eritrócitos de avestruzes em relação a faixa etária, encontrando em avestruzes fêmeas adultas diâmetro maior e menor com mensurações mais elevadas quando comparados aos diâmetros dos eritrócitos de avestruzes jovens e juvenis, sugerindo que com o avanço da

idade, os eritrócitos dessas aves podem ter seus tamanhos aumentados devido a fatores ligados à evolução das células, a questões metabólicas, influências hormonais, renovação celular e diversidades genéticas.

O que se observa em relação aos nossos dados de morfometria leucocitária é que estes não diferiram significativamente entre os sexos e, da análise dos grupos etários, constata-se que os valores se mantiveram dentro dos limites estabelecidos para as ratitas (Blue-Mclendon e Green, 2010), embora parte deles tenham sido maiores do que aqueles estabelecidos para outros grupos de aves, salvo os valores médios obtidos para os linfócitos (Gallo *et al.*, 2015). No entanto, pôde-se inferir através das análises morfométricas dos leucócitos das emas em estudo que os machos apresentaram médias ligeiramente maiores para os leucócitos, quando comparados com as fêmeas para estes mesmos parâmetros.

Os heterófilos de emas adultas mediram, em média, $12,36 \pm 0,84 \mu\text{m}$, e foram semelhantes aos valores encontrados para essa espécie por Gallo *et al.* (2015), em torno de $13,12 \pm 1,56 \mu\text{m}$; para emus (Almeida *et al.*, 2015), em média $12,59 \pm 1,02 \mu\text{m}$; e para avestruzes (Tadjalli, 2013), em torno de $11,50 \pm 1,02 \mu\text{m}$. Os eosinófilos de emas adultas mensurados chegaram à média de $11,99 \pm 1,34 \mu\text{m}$, enquanto em emus (Almeida *et al.*, 2015) mediram $12,80 \pm 1,77 \mu\text{m}$ e em avestruzes adultos (Tadjalli, 2013) foi de $11,57 \pm 1,72 \mu\text{m}$, aproximando-se da média de $13,15 \pm 1,65$ verificados em emas por Gallo *et al.* (2015).

Quanto aos basófilos, por serem raros nos esfregaços sanguíneos de *Rhea americana*, não puderam ser mensurados. Da mesma forma, Gallo e colaboradores (2015) e Almeida e colaboradores (2015) também não apresentaram valores para a morfometria deste tipo celular para emas e emus, respectivamente. Em avestruzes, o diâmetro dos basófilos mediu $10,89 \pm 1,72 \mu\text{m}$, segundo relato de Tadjalli (2013).

Quanto aos leucócitos mononucleares, os linfócitos presentes nas extensões sanguíneas analisadas mediram, em média, $6,13 \pm 0,99 \mu\text{m}$ em emas jovens e $5,97 \pm 0,47 \mu\text{m}$ em emas adultas, mas sem varrições significativas para as variáveis sexo e faixa etária, conforme análises estatísticas. Gallo e colaboradores (2015) encontraram linfócitos medindo de 6 a $12 \mu\text{m}$ para *Rhea americana* em animais adultos e afirmaram estar dentro da faixa descrita na literatura. Em avestruzes machos adultos (Tadjalli, 2013), o diâmetro dos linfócitos pequenos e médios foi de $7,33 \pm 0,60 \mu\text{m}$ e $11,00 \pm 1,70 \mu\text{m}$, respectivamente. Já para emus adultos (Almeida *et al.*, 2015), independente do sexo, os linfócitos tiveram seu diâmetro variando de 6 a $14 \mu\text{m}$. Dessa forma, nossos achados aproximam-se daqueles relatados para ratitas na literatura.

Os monócitos em emas jovens tiveram diâmetro médio igual a $14,30 \pm 1,85 \mu\text{m}$, em emas juvenis ($14,57 \pm 1,29 \mu\text{m}$) e em emas adultas ($15,15 \pm 1,60 \mu\text{m}$). Ao abordarem sobre a morfometria

dos monócitos de emas adultas, Gallo *et al.* (2015) relataram que os monócitos de emas medem, em média, $13,08 \pm 2,11 \mu\text{m}$, com valores variando entre 7 a $19 \mu\text{m}$ e citaram que parte dessas células apresentam medidas muito abaixo do padrão encontrado para as aves na literatura. Esse tipo celular também foi mensurado em emus adultos por Almeida *et al.* (2015), tendo o diâmetro variando entre 8 e $15 \mu\text{m}$, enquanto que em machos de avestruzes adultas (Tadjalli, 2013) o diâmetro médio dos monócitos foi de $12,50 \pm 1,30 \mu\text{m}$. Esses dados confirmam que os valores obtidos para os monócitos dos animais de nossa pesquisa estão dentro do intervalo obtido por esses estudiosos. Destaca-se que nossos animais se encontram em regime semiextensivo e em ambiente onde temos elevadas temperaturas, baixa umidade e um baixo aporte de alimentos para pastagem, já que a área de amostragem se localiza em região de clima semiárido.

Em relação à linhagem dos trombócitos, encontramos diferenças significativas ($p = 0,05$) quando comparamos as emas em relação ao sexo do animal. As fêmeas apresentaram células com diâmetro maior ($8,10 \pm 2,40 \mu\text{m}$) do que as dos machos ($6,56 \pm 1,08 \mu\text{m}$), e as adultas tinham trombócitos relativamente maiores ($7,82 \pm 2,42 \mu\text{m}$) quando comparadas com as jovens ($6,84 \pm 1,40 \mu\text{m}$) e as juvenis ($6,32 \pm 0,81 \mu\text{m}$). Sugerimos que a presença de trombócitos maiores nas fêmeas pode estar relacionado à necessidade de aprimorar o processo de coagulação e cicatrização, sobretudo em resposta às exigências reprodutivas e comportamentais relacionadas à postura de ovos e cuidado com a prole. Para as demais ratitas, como emus e avestruzes, foram encontrados trombócitos de formato redondo a oval, porém os resultados morfométricos para esse tipo de célula foram assemelharam-se aos dos animais objeto de nossa pesquisa. Almeida e colaboradores (2015), informaram o valor médio de $9,47 \pm 1,27 \mu\text{m}$ para o diâmetro de emus, enquanto Tadjalli (2013) encontrou nos avestruzes trombócitos com $6,18 \pm 0,75 \mu\text{m}$ de diâmetro.

7.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A coleta e o processamento de amostras sanguíneas possibilitam a análise das respostas hematológicas às doenças, assim como são importantes para a criação de bancos de dados em hematologia, visando estabelecer o registro de valores de referência para diferentes espécies de aves. Com os avanços significativos alcançados ao longo dos anos relativos aos testes hematológicos, possibilitou-se diferenciar condições patológicas nas diferentes classes de animais, sobretudo nas aves (Samour, 2015).

Todavia, conforme descrito por alguns autores (Jones, 2015; Pinto, 2017), embora tenham sido estabelecidos valores de referência para muitas espécies de aves, variações podem surgir em função da espécie, sexo, idade, fatores genéticos, estado fisiológico, estação, habitat,

fatores hormonais, dentre outros. Sobre esse contexto, Pinto (2017) acrescenta que os procedimentos de coleta do material e da técnica de processamento das amostras utilizada pelo laboratório pode interferir no resultado do hemograma. Outro fator importante a ser considerado é o pequeno número de animais utilizados em grande parte dos estudos, dificultando a interpretação do hemograma em aves. Com base nessas observações, Campbell (1994) sugeriu a utilização do termo “valores de decisão” em vez de “valores de referência”, pois estes são os valores críticos que necessitam de análise de todas essas condições citadas anteriormente para a sua correta interpretação.

A contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, os índices de Wintrobe – volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) –, bem como a contagem total e diferencial de leucócitos são usados para avaliar o hemograma aviário (Jones, 2015). Neste estudo, além desses parâmetros, foram dosadas também proteínas totais.

Os valores médios para a série vermelha nas emas estudadas foram semelhantes aos valores de referência encontrados por Blue-Mclendon e Green (2010) para ratitas e aproximaram-se dos valores encontrados por Fortes *et al.* (2009) para emas, com algumas diferenças em relação aos dados publicados por Gallo *et al.* (2015), também em estudos com emas (Tabela 5). No tocante aos trombócitos, nenhum dos autores citados avaliaram este parâmetro, podendo o nosso resultado (94.647 ± 23.662 / μ L) ser utilizado como valor de referência para *Rhea americana*. Da mesma forma, somente Gallo e colaboradores (2015) apresentaram resultados para análise de proteínas plasmáticas totais em emas ($6,41 \pm 0,95$ g/dL), cujos valores foram semelhantes aos estabelecidos no nosso estudo ($6,08 \pm 0,93$ g/dL).

Quanto aos leucócitos, para a contagem global, nossos achados foram superiores aos apresentados por outros estudos (Fortes *et al.*, 2009; Blue-Mclendon; Green, 2010; Gallo *et al.*, 2015) (Tabela 5). A reação ao estresse provocada pela contenção varia de acordo com a origem e o temperamento de cada animal (como no caso de animais selvagens em comparação com aqueles mantidos em cativeiro), e essa reação tem um impacto significativo nos resultados hematológicos (Vila, 2013). Pesquisas identificaram que as expressivas flutuações na contagem de heterofilos em experimentos estão relacionadas à resposta de estresse gerada durante os processos de contenção (Samour *et al.*, 2011). Dessa forma, atribuímos a elevação dos leucócitos em alguns animais amostrados como resultado da resposta ao estresse provocado pela contenção durante os procedimentos de coleta sanguínea, embora tenham sido adotados todos os cuidados necessários para minimizar alterações nas respostas fisiológicas.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de emas adultas (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no Brasil.

Parâmetros analisados	Estudo atual		Outros autores		
	N*		Fortes <i>et al.</i> (2009)	Green e Blue-Maclendon (2010)	Gallo <i>et al.</i> (2015)
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	48	2,84 $\pm$ 0,61	2,39 $\pm$ 0,52	2,25 $\pm$ 0,1	1,21 $\pm$ 0,80
Hemoglobina (g/dL)	48	13,5 $\pm$ 3,84	16,27 $\pm$ 4,40	13,4 $\pm$ 0,45	10,44 $\pm$ 1,39
Hematócrito (%)	48	45,7 $\pm$ 3,58	39,6 $\pm$ 5,48	41,6 $\pm$ 1,9	40,78 $\pm$ 4,47
VCM (fL)	48	16,8 $\pm$ 3,97	17,1 $\pm$ 3,44	18,5 $\pm$ 5,9	44,71 $\pm$ 20,09
HCM (pg)	48	52,8 $\pm$ 13,5	70 $\pm$ 19,70	59,56	113,53 $\pm$ 52,94
CHCM (g/dL)	48	31,2 $\pm$ 2,20	42,1 $\pm$ 12,78	32 $\pm$ 0,01	25,64 $\pm$ 2,49
Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	48	24.433 $\pm$ 8.779	8.683 $\pm$ 4.860	13.600 $\pm$ 3.300	12.072 $\pm$ 4.116
Heterófilos (%)	48	67,9 $\pm$ 6,20	62,09 $\pm$ 8,58	59,5 $\pm$ 33,3	64,10 $\pm$ 9,90
Linfócitos (%)	48	27,3 $\pm$ 6,51	27,04 $\pm$ 6,60	31,6 $\pm$ 23,2	26,93 $\pm$ 9,62
Eosinófilos (%)	48	0,80 $\pm$ 0,86	2,18 $\pm$ 1,02	1,47 $\pm$ 1,47	2,05 $\pm$ 2,06
Monócitos (%)	48	3,40 $\pm$ 0,82	6,01 $\pm$ 2,99	3,68 $\pm$ 2,94	6,40 $\pm$ 2,99
Basófilos (%)	48	0,53 $\pm$ 0,51	2,69 $\pm$ 1,43	3,68 $\pm$ 3,68	0,52 $\pm$ 1,27
Trombócitos ($/\mu\text{L}$)	48	94.647 $\pm$ 23.662	-	-	-
Proteínas Totais (g/dL)	48	6,08 $\pm$ 0,93	-	-	6,41 $\pm$ 0,95

*Número de animais amostrados.

Outro aspecto importante a ser relatado é que não foram encontrados estudos que estabeleceram comparações entre sexos e diferentes faixas etárias para o hemograma em *Rhea americana*, sendo este o primeiro a ser divulgado. Nossos achados revelaram a existência de diferenças estatísticas significativas para concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e para proteínas plasmáticas totais quando comparamos animais machos e fêmeas. É possível que a maior CHCM em emas machos esteja relacionada a uma combinação de fatores hormonais, necessidades metabólicas, comportamentais, ecológicas, genéticas e evolutivas. A testosterona pode estimular a produção de hemoglobina, ao passo que maiores exigências físicas e comportamentais dos machos podem levar a adaptações que aumentam a capacidade de transporte de oxigênio no sangue. Por outro lado, considerando que as emas fêmeas necessitam de uma quantidade significativa de proteínas para a produção de ovos e para manter processos fisiológicos complexos, sua demanda de proteínas plasmáticas totais no sangue atinge níveis mais elevados do que nos machos.

Diferenças significativas foram comprovadas em função da idade, em aves criadas e monitoradas em cativeiro. Os valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito eram menores nos juvenis quando comparados com os adultos (Vila, 2013). De fato, as emas adultas em estudo apresentaram valores médios de eritrócitos e hematócrito relativamente maiores em comparação com jovens e juvenis e média para hemoglobina semelhante às emas juvenis, indicando variações notáveis entre essas faixas etárias. Corroborando com nosso estudo, Sabino (2007) verificou um aumento do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito com a idade em avestruzes, apesar de não ter verificado diferenças estatísticas significativas em relação às

diferentes faixas etárias estudadas. Para o volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), a faixa etária juvenil apresentou diferenças significativas em relação às adultas e jovens, com valores mais elevados em comparação com esses dois últimos grupos. Em seu estudo, Sabino (2007) encontrou VCM menor em animais jovens, quando comparados aos juvenis e adultos, e HCM mais elevado em animais jovens, em comparação com as demais faixas etárias. Durgun *et al.* (2005) atribui o aumento do número de eritrócitos e da hemoglobina com a idade em avestruzes a uma maior demanda de oxigênio do animal durante a fase de crescimento, justificando as relações encontradas em nosso estudo.

Para a série branca, trombócitos e proteínas, cujos valores apresentaram diferenças significativas entre as faixas etárias, não foram encontrados estudos comparativos com outras espécies de ratitas para diferentes idades. As proteínas totais mostraram uma diferença significativa apenas entre juvenis e jovens, que pode estar relacionada às necessidades de crescimento e desenvolvimento acelerado dessa fase, maior demanda nutricional, síntese de proteínas hepáticas aumentada e a influência de hormônios do crescimento. Em relação aos leucócitos totais, eosinófilos e monócitos, as diferenças estatísticas significativas foram sempre entre animais adultos e os grupos de jovens e/ou juvenis, não havendo variações estatísticas entre estes dois últimos. Tais diferenças podem estar associadas à maturação do sistema imunológico, as demandas fisiológicas do crescimento e desenvolvimento, e a adaptação ao ambiente. Conforme já relatado, os valores elevados de leucócitos em alguns animais podem estar relacionados ao estresse provocado durante os procedimentos de coleta, já que os animais estavam visualmente hígidos e não houve alterações para os demais parâmetros. Por fim, os trombócitos revelaram diferenças significativas entre adultas e jovens, bem como entre adultas e juvenis, que podem estar relacionadas à manutenção da homeostase sanguínea, dos processos de coagulação e reparação tecidual, aumentando a sobrevivência e mostrando a importância de considerar a faixa etária ao interpretar dados hematológicos.

8 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, verificou-se que o sangue da espécie *Rhea americana* apresenta as células sanguíneas em quantitativos que, quando estimados, encontram-se dentro dos padrões descritos para as aves em geral, embora com algumas particularidades, a exemplo de:

- a) As células sanguíneas das emas, assim como das demais espécies da ordem *Rheiforme*, em geral são maiores do que aquelas encontrados em outros grupos de aves;
- b) Os trombócitos possuem forma elíptica, condição descrita apenas para emas;
- c) Eritrócitos, Hb, Ht, VCM, HCM, Proteínas Totais, Leucócitos, Eosinófilos, Monócitos e Trombócitos variaram entre as diferentes faixas etárias dos animais;
- d) CHCM e Proteínas Totais variaram entre os sexos dos animais;
- e) Morfometricamente, somente o diâmetro maior (D) dos eritrócitos de emas adultas variou em relação ao diâmetro maior (D) de emas jovens e juvenis;
- f) A análise inédita das células sanguíneas de emas por meio de microscopia eletrônica de varredura para caracterização da morfologia nos permitiu observar a textura da superfície dos diferentes tipos celulares, permitindo que se observasse a presença de pequenas projeções como vilosidades, presença de granulações e outras estruturas submembranares, irregularidades e rugosidades, características, que podem estar associadas à função imunológica, adesão e interação com outras células e com a matriz extracelular;
- g) A contagem de trombócitos em *Rhea americana*, é uma contribuição pioneira para fins de definição de perfil hematológico de emas, uma vez que essas informações não constam de outros estudos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. J.; SILVA, A. F.; GALLO, S. S. M.; ECKHARDT, L. A.; DIFILIPPO, P. A. Clinical aspects, morphometry, and morphology of blood cells of the emu (*Dromaius novaehollandiae*) reared in captivity. **Comp Clin Pathol** (2015) 24:1553–1558.
- BENEZ, S. M. **Aves**: criação, clínica, teoria, prática. Silvestres, ornamentais, avinhados. 3. ed. São Paulo: Robe, 2001. 522 p.
- BHATTACHERJEE, A. Avian Erythrocytes and Agranulocytes - a Review. **Science Reviews - Biology**, 2023, 2(2), 21-29. <https://doi.org/10.57098/SciRevs.Biology.2.2.2>
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2022. **Rhea americana**. The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T22678073A219615764. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/22678073/219615764>>. Acesso em: 17 mai. 2023.
- BLUE-MCLENDON, A; GREEN, R. A. 2010. Hematologia de ratites. In: DJ WEISS e KJ WARDROP, eds. **Hematologia veterinária de Schalm**. 6ª edição. Ames: Lippincott Williams & Wilkins, pp.
- BRANDT, L.F.S.; NETO, A. S. Introdução e Monitoramento de *Rhea americana* na EPDA Galheiro (Perdizes, MG). **CEMIG**: Belo Horizonte, Brasil, 1999.
- CAMPBELL, T. W. Hematology. In: RITCHIE, Branson W. et al. **Avian Medicine: Principles and Application**. Florida: Wingers Publishing, Inc, 1994. Cap. 9. p. 176-197
- CAMPBELL, T. W. Hematologia das Aves. In: THRALL, Mary Anna et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 19. p. 507-586.
- CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species. **Veterinary Clinics Of North America: Exotic Animal Practice**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 71-120, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2012.10.002>.
- CARISCH, L. et al. White blood cell count in birds: evaluation of a commercially available method. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-7, 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-019-1834-8>.
- CASTRO, P.F.; FANTONI, D.T.; MATERA, J.M. Retrospective study of surgical disorders in birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 33, n. 5, p. 662-668, 2013.
- CHANIE, M.; HAILE, Y. Comparative Aspects of the Clinical Hematology of Birds: A Review. **British Journal of Poultry Sciences** 3 (3): 88-95, 2014. ISSN 1995-901X. DOI: 10.5829/idosi.bjps.2014.3.3.83263
- CĪRULE, D.; KRAMA, T.; VRUBLEVSKA, J.; RANTALA, M. J; KRAMS, I. A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress? **Journal of Ornithology**, Heidelberg, v. 153, p. 161-166, 2012.

CLARK, P. *et al.* **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Reino Unido: Wiley-blackwell, 2009. 200 p.

CLAVER, J.A. El trombocito aviar. **Investigación Veterinaria**, v.7 (1), p.139-146, 2005.

CODENOTTI, T.L.; ALVAREZ, F. Mating behavior of the male greater rhea. **Wilson Bulletin**, v.113, n.1, p.85-89, 2001.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 2470 p.

DURGUN, Z.; KESKIN, E.; COL, E.; ATALAY, B. Selected haematological and biochemical values in ostrich chicks and growers. **Archiv fuer Gefluegelkunde**, v. 69, n. 2, p. 62-66, 2005.

EDERLI, N. B. **Nematoides parasitas de avestruzes, *Struthio camelus* Linnaeus, 1758 e emas, *Rhea americana* L., 1758: diagnóstico, patologia, taxonomia e análise filogenética**. 2012. 239 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Sanidade Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2012.

FANG, J.; CHEN, K.; CUI, H. M.; PENG, X.; LI, T.; ZUO, Z. C. Estudos morfológicos e citoquímicos de células sanguíneas periféricas de *Schizothorax prenanti*. **Anatomia, Histologia, Embryologia**. 2014; 43 (5):386–394. doi: 10.1111/ahe.12089.

FORTES, E. A. M.; SOUSA, A. F.; ALMEIDA, E. C. S.; CONDE JÚNIOR, A. M.; MOURA, W. L. Morfologia das células do sangue periférico em emas (*Rhea americana*). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 215-221, 2009.

FORTES, E. A. M.; MOURA, W. L.; SOUSA, A. F.; CONDE JÚNIOR, A. M. Valores hematológicos do sangue periférico de emas (*Rhea americana*) criadas em regime de semiconfinamento no município de Teresina, Piauí. **Medicina Veterinária**, Recife, v.7, n.2, p.1-6, 2013.

GALLO, S. S. M. **Parasitas gastrintestinais em emas, *Rhea americana*, de um criatório científico em Campos dos Goytacazes-RJ: aspectos morfológicos e moleculares**. 2013. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2013.

GALLO, S. S. M.; EDERLI, N. B.; BÔA-MORTE, M. O.; OLIVEIRA, F. C. R. Hematological, morphological and morphometric characteristics of blood cells from rhea, *Rhea Americana* (Struthioniformes: Rheidae): a standard for Brazilian birds. **Braz. J. Biol.**, 2015, vol. 75, no. 4, pp. 953-962. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.03414>

HANDFORD, P.; MARES, A. The mating system of ratites and tinamous: An evolutionary perspective. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.25, n.1, p.77-104, 1985.

HARVEY, John W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Florida: Elsevier, 2011. 367 p.

JONES, M. P. Avian Hematology, **Clinics in Laboratory Medicine**, Volume 35, Issue 3, 2015, Pages 649-659, ISSN 0272-2712, ISBN 9780323430272, <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>.

LÈCHE, A.; GISMONDI, E.; MARTELA, MB; NAVARRO, JL. Primeira avaliação de poluentes orgânicos persistentes na Grande Rhea (*Rhea americana*), uma ave herbívora quase ameaçada que não voa das pastagens dos Pampas. **Meio Ambiente. Ciência. Poluição. Res.** 2021, 28, 27681–27693.

MACHADO, T.M.M.; ROCHA, D.C.C. **Controle da reprodução de emas no cativeiro em Viçosa por meio da iluminação artificial** In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E NA AMÉRICA LATINA, 7., 2006, Ilhéus. Anais... Ilhéus: UESC [2006] (CD ROM)

MITCHELL, Elizabeth B.; JOHNS, Jennifer. Avian Hematology and Related Disorders. **Veterinary Clinics Of North America: Exotic Animal Practice**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.501-522, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.004>.

NARKKONG, N. A.; AENGWANICH, W.; TANOMTHONG, A. Morphology and morphometrics of hematological cells from eastern sarus crane, *Grus antigone sharpii*. **Comp Clin Pathol** (2011) 20:299–304. DOI 10.1007/s00580-010-0990-9

PENG, F.; CHEN, X. X.; MENG, T.; LI, E.; ZHOU, Y. K.; ZHANG, S. Z. Parâmetros de hematologia e bioquímica sérica de jacarés chineses em cativeiro (*Alligator sinensis*) durante os períodos ativo e de hibernação. **Tecido e célula**. 2018; 51 :8–13. doi: 10.1016/j.tice.2018.02.002.

PICASSO, M.B.; MOSTO, C. O Novo Status Taxonômico de *Rhea anchorenensis* (Ameghino e Rusconi, 1932) (Aves, Palaeognathae) do Pleistoceno da Argentina. **Annales de Paléontologie**, 2016, 102, 237–241.

PINTO, F. M. S. C.; HOLUM, S. B.; GONDIM, L. S. Q. **Atlas virtual de hematologia comparada de aves mantidas sob cuidado humano**. XVI SEPA – Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, UNIFACS, 2017. Disponível em: <http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa>. Acesso em: 20 Jun 2024.

RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and applications**. Florida: Wingers Publishing INC, 1994. 1384p.

SABINO, A. J.; TREVELIN, S. C.; ALMEIDA, B. F. M.; PEIRÓ, J. R.; CIARLINI, P. C. Eritrograma e morfometria eritrocitária de avestruzes (*Struthio camelus*) criados na região de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 234-238, 2011.

SALAKIJ, C.; SALAKIJ, J.; RATTANAKUNUPRAKARN, J.; TENGCHAI SRI, N.; TUNWATTANA, W.; APIBAL, S. Morfologia e citoquímica de células sanguíneas de cão selvagem asiático (*Cuon alpinus*). **Kasetsart Journal**. 2000; 34 (4):518–525.

SAMOUR, J. **Medicina aviária**. Elsevier Ciências da Saúde, 2015.

SANTOS, T. F.; SANTOS, S. S.; GOMES, I. S. A.; SIQUEIRA, A. J. S.; SANTOS, M. F.; OLIVEIRA, A. B. S. Interações entre aves e plantas: um estudo bibliométrico sobre a contribuição das aves como polinizadoras e dispersoras da flora. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, São José dos Pinhais, v.16, n.10, p.24745-24759, 2023.

SILVA, J. B. G. **Rheacultura. Criação de emas**: manual prático – nutrição, reprodução, manejo e enfermidades. Guaíba: Agropecuária, 2001. 144 p.

SOUSA, R.P.;MONTEIRO, H. M. D. A.;BEZERRA, D. D. O.;SOARES, L. L. D. S.;ASSIS NETO, A. C.;RICI, R. E.; JÚNIOR, C. M. A.;CARVALHO, M. A., 2018.Morfogênese do sistema respiratório da ema (*Rhea americana*) em diferentes estágios embrionários e fetais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38:154-166.

TADJALLI, M.; NAZIFI, S.; ABBASABADI, B. M.; MAJIDI, B. Histomorphometric study on blood cells in male adult ostrich. **Veterinary Research Forum**. 2013; 4 (3) 199 – 203.

THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

VALKIÜNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. 1ªEd.Washington: CRC Press, 2004, 932 p.

VILA, L. G. **HEMATOLOGIA EM AVES**: Revisão de literatura. 2013. 46 p. Seminário (Pós-Graduação em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2013.

APÊNDICE A – FICHA DE ACOMPANHAMENTO DA COLETA

	CHECK-LIST DA COLETA	Local:
		Sector:
		Data:
		Horário:

Espécie:
Piquete:
Placa de Identificação:
Faixa etária: Idade:
Sexo: ☐ Macho ☐ Fêmea
Análise visual do animal:
Tipo de coleta: Sanguínea
Contenção do animal: ☐ Física ☐ Química
Local da punção:
Volume coletado:
Material utilizado: ☐ Seringa ☐ Tubo (EDTA) ☐ Agulha ☐ Tubo (Heparina lítica) ☐ Catéter ☐ Tubo (Soro)
Esfregaços sanguíneos:
Armazenamento da amostra: Caixa térmica → Temperatura:

PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA AMOSTRA	Local:
	Sector:
	Data:
	Horário:

Fixação e coloração dos esfregaços sanguíneos:
Hematócrito (Ht):
Concentração de Hemoglobina (Hb):
Proteínas totais:
Contagem global de leucócitos:
Contagem global de eritrócitos:
Contagem global de trombócitos:

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo científico submetido à Revista Caatinga.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE EMAS (*Rhea americana*) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

RESUMO – A ema (*Rhea americana* Linnaeus, 1758), considerada a maior espécie de ave nativa do Brasil, encontra-se entre os componentes da fauna silvestre que apresentam elevado potencial econômico e conservacional. Nesta perspectiva, descrever a superfície das células sanguíneas dessas aves pode proporcionar *insights* valiosos sobre a morfologia dessas células e, conseqüentemente, permite estabelecer correlações com situações associadas ao sistema imunológico e à habilidade de combater doenças e lesões, bem como com situações relacionadas à saúde do animal como um todo. Este estudo objetivou caracterizar a morfologia de células sanguíneas de emas criadas em cativeiro no semiárido do Rio Grande do Norte, utilizando-se técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizados 48 exemplares hígidos da espécie, oriundos do CEMAS da UFERSA. A análise das células sanguíneas de emas por meio de MEV permitiu descrever a textura da superfície de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, observando-se a presença de granulações e outras estruturas submembranares, irregularidades e rugosidades, dentre outras características. Concluiu-se que o sangue da espécie *Rhea americana* apresenta todos os principais tipos de célula e que os leucócitos apresentaram algumas características diferentes quando comparados aos leucócitos de outras aves, assim como os trombócitos, que apresentaram forma elíptica, condição descrita apenas para emas. Já as características observadas por meio da MEV indicam a correlação dessas células com a função imunológica, adesão e interação com outros tipos celulares e com a matriz extracelular.

Palavras-chave: Sangue. Hematologia Aviária. Ratita.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF GREAT RHEA (*Rhea americana*) BLOOD CELLS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ABSTRACT – The great rhea (*Rhea americana* Linnaeus, 1758), considered to be Brazil's largest native bird species, is among the wildlife species with high economic and conservation potential. From this perspective, describing the surface of the blood cells of these birds can

provide valuable insights into the morphology of these cells and, consequently, allows us to establish correlations with situations associated with the immune system and the ability to fight diseases and injuries, as well as with situations related to the health of the animal as a whole. This study aimed to characterize the morphology of the blood cells of great rhea bred in captivity in the semi-arid region of Rio Grande do Norte, using light microscopy and scanning electron microscopy (SEM) techniques. We used 48 healthy specimens of the species from the CEMAS at UFERSA. Analysis of emu blood cells using SEM allowed the surface texture of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes to be described, observing the presence of granulations and other submembrane structures, irregularities and roughness, among other characteristics. It was concluded that the blood of the *Rhea americana* species has all the main cell types and that the leukocytes showed some different characteristics when compared to the leukocytes of other birds, as did the thrombocytes, which showed an elliptical shape, a condition described only for great rhea. On the other hand, the characteristics observed using SEM indicate the correlation of these cells with immune function, adhesion and interaction with other cell types and the extracellular matrix.

Keywords: Blood. Avian Hematology. Ratite.

INTRODUÇÃO

Originárias evolutivamente de um grupo específico dos répteis, as aves compõem um dos grupos de vertebrados mais estudados para fins de preservação ambiental, pois no desenvolvimento de suas funções na natureza alcançaram adaptações fisiológicas que guardam relações diretas ou indiretas com os processos de polinização de vegetais, bem como atuam no controle de pragas ao se alimentarem de diferentes grupos de invertebrados, o que faz das mesmas importante grupo de animais cujas funções favorecem o equilíbrio dos ecossistemas em que habitam e, por conseguinte, com a sustentabilidade ambiental (Santos *et al.*, 2023).

A ema (*Rhea americana* LINNAEUS, 1758) é a maior espécie de ave brasileira e possui importância tanto econômica quanto conservacional, tendo em vista que está quase ameaçada de extinção (BirdLife International, 2022). Pertence à ordem *Rheiformes*, família *Rheidae* e ao gênero *Rhea*, juntamente com a avestruz da África e o emu da Austrália, (Sousa *et al.*, 2018).

A espécie é uma ave endêmica do continente americano e habita campos abertos do leste e centro do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte e centro da Argentina, escolhendo pastagens mais altas para nidificação (Picasso; Mosto, 2016). Costuma formar grupos mistos de machos e

fêmeas, de diferentes idades, compostos por 5 a 30 indivíduos. Podem atingir o peso de 45 kg na idade adulta e 170 cm de comprimento do bico à cauda. Ademais, são aves com expectativa de vida de aproximadamente 10 a 15 anos, que apresentam uma dieta onívora, alimentando-se de grande variedade de matéria vegetal (folhas, frutos, sementes), invertebrados e pequenos vertebrados (Lèche *et al.*, 2021).

Para avaliar o estado de saúde de aves e de outras classes de animais, de maneira geral, a hematologia representa uma ferramenta de diagnóstico indispensável, pois mesmo na ausência de sinais clínicos, podem ocorrer alterações hematológicas que servirão de subsídios para que o clínico possa monitorar a evolução de uma doença, avaliar a eficácia de protocolos terapêuticos, proporcionando prognósticos adequados (Samour, 2015).

Por entender-se que a partir de exames hematológicos é possível verificar, qualitativa e quantitativamente, as alterações nas frações dos glóbulos vermelhos e brancos, bem como alterações na morfologia celular que podem auxiliar no diagnóstico de doenças e patologias (Vila, 2013), buscou-se descrever a morfologia das células sanguíneas de emas, criadas no clima semiárido, em regime semiextensivo.

Assim, neste estudo, considerando que as emas são importantes aves nativas da América do Sul, bem como o fato de que são animais com caracteres morfológicos que possuem relevância quanto a aspectos zootécnicos e de produção, buscou-se investigar alguns aspectos do sangue desses animais, já que os mesmos se encontram em um criatório científico situado em ambiente semiárido. Para tanto, investigamos dados associados à morfologia das células que integram esse tecido biológico, tanto pela importância biológica que a espécie possui, segundo nosso ponto de vista, mas também por entender que pesquisas que envolvam a caracterização do sangue de animais são sempre de grande relevância para subsidiar estudos com sanidade animal, assim como relevantes quando se observa aspectos de sustentabilidade ambiental se considerarmos os Objetivos de Sustentabilidade Ambiental (ODS), neste caso, em especial, aquele relativo a vida terrestre.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas de animais do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres pertencente à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEMAS/UFERSA), localizado na cidade de Mossoró, RN, Brasil, e registrado no IBAMA como criadouro científico (Registro nº 478912). Esse criadouro ocupa uma área de 20 ha, geograficamente localizado a 5°12'49,4 "S e 37°18'36,7 "W Gr e 16 m acima do nível do mar, apresentando temperatura média anual de

cerca de 27,4°C, podendo atingir 36°C em determinadas horas do dia, com umidade relativa de cerca de 70% (COSTA SARAIVA *et al.*, 2017).

Foram utilizados 48 exemplares hígidos de emas, de ambos os sexos, que encontravam-se distribuídas em nove piquetes telados, com acentuada cobertura vegetal, que compreende cerca de 0,33 ha e, onde são alimentados com ração peletizada para emas, além de frutas, ramos de vegetais e água *ad libitum*, de acordo com protocolo de manejo alimentar utilizado no CEMAS. As amostragens e análises prescindiram de autorização pelo SISBio, de acordo com a Portaria ICMBio nº 748, de 19 de setembro de 2022, pois envolveram somente atividades *ex situ* (coleta de sangue de emas em cativeiro) e foram autorizadas pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFERSA (CEUA nº 29/2024).

A coleta do material ocorreu entre os meses de novembro de 2023 e fevereiro de 2024 e a contenção dos animais foi realizada por meios físicos pelos tratadores do próprio CEMAS, não variando mais do que 10 min para cada animal. As amostragens foram realizadas no período da manhã, entre seis e sete horas, para evitar estresse térmico. Após contenção, foi realizada punção venosa de veia braquial e o sangue periférico foi coletado em tubos estéreis contendo EDTA 10% (5 mL), sem adição de anticoagulante. As amostras foram armazenadas em caixas de poliestireno expandido, contendo gelo reciclável, e levadas ao laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFERSA.

Foram preparados três esfregaços do sangue de cada animal para análise morfológica das células sanguíneas, corados, em parte, pelo método de Panóptico Rápido, e outra parte com Giemsa (Valkiūnas, 2004), que após secos foram analisados e fotografados em microscópio de luz (Leica DM 500 HD) em aumento de 100x (óleo de imersão). As imagens mais representativas foram fotografadas utilizando um equipamento Leica ICC50 HD, para caracterizar a morfologia dos tipos celulares sanguíneos.

Para análise dos tipos celulares do sangue de emas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Vegetais do Semi-Árido (CPVSA) da UFERSA, utilizou-se o protocolo de Choudhary *et al.* (2021) para o preparo das amostras. A solução obtida foi distribuída em lâminas de vidro de 2x2 cm² e após secas foram coradas pelo método do Panóptico Rápido para, posteriormente, serem submetidas ao processo de metalização com ouro por “sputtering” (Q150R ES, Quorum Technologies Ltda., Laughton, East Sussex, UK) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura, sendo capturadas imagens com um detector de elétrons secundário em MEV (TESCAN VEJA 3 LMU, Tescan, Czech Republic), operando com um feixe de elétrons de 10kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopia de Luz

Em ampla perspectiva, a hematologia das aves assemelha-se a de outros vertebrados, especialmente a de humanos e outros mamíferos, ainda que haja algumas particularidades importantes, como a presença de núcleo nos eritrócitos e a existência de trombócitos e heterofilos, que equivalem às plaquetas e aos neutrófilos de mamíferos, respectivamente, no sangue periférico das aves (Campbell, 2015).

A morfologia dos eritrócitos encontrados nos esfregaços sanguíneos nos 48 exemplares de emas analisados segue o mesmo padrão para outras aves, considerando os dados relatados na literatura, a exemplo das pesquisas desenvolvidas por Chanie e Hayle (2014), Campbell (2015), Jones (2015), Pinto (2017), Bhattacharjee (2023), estudando hematologia de aves.

A exemplo do observado nas aves por esses pesquisadores, nas emas os eritrócitos apresentam-se com forma geométrica variando entre oval a elíptica, nucleados, com núcleo também em formato oval ou elíptico, disposto em posição central, com cromatina condensada; o citoplasma abundante e acidófilo. Este apresenta coloração rósea-alaranjada, enquanto o núcleo destaca-se pela sua cor roxa escura intensa (Figura 1: a).

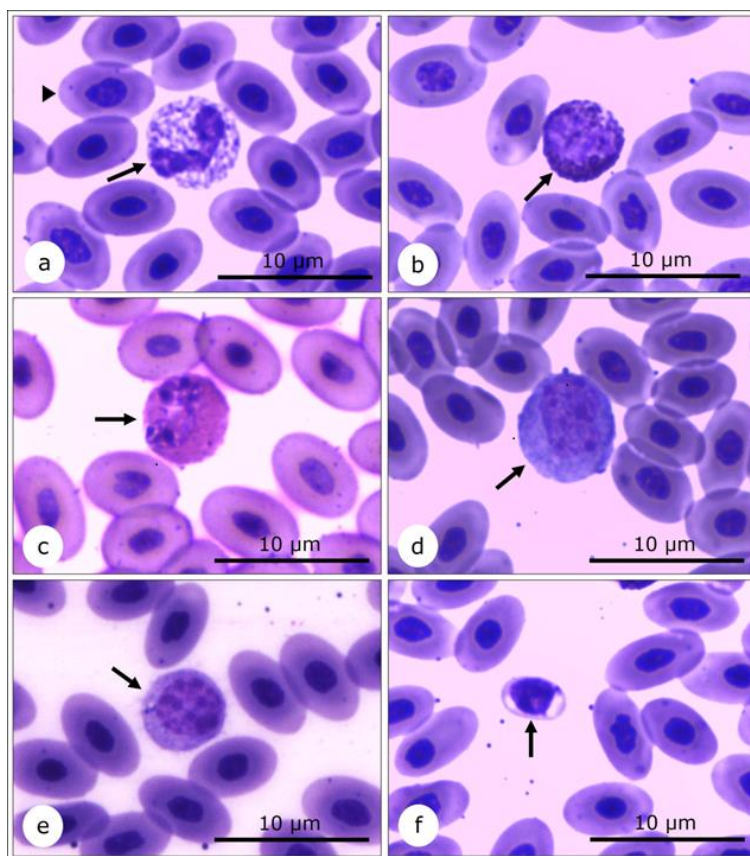


Figura 1. Fotomicrografias de esfregaços sanguíneos de emas (*Rhea americana*), em que aparecem em destaque, centralizados e identificados através de setas ou cabeça de seta, os principais tipos de células sanguíneas encontrados nestes animais, para caracterização da morfologia. (a) Heterofilo (seta). Em seu entorno, encontram-se vários eritrócitos maduros (cabeça de seta). (b) Basófilo (seta). (c) Eosinófilo (seta). (d) Monócito (seta). (e) Linfócito (seta). (f) Trombócito (seta). Colorações - Giemsa: a, b, d, e, f. Panótico: c. Aumento de 100x (óleo de imersão). Barra: 10 µm.

Contudo, nossos resultados diferem dos achados de Blue-Mclendon e Green (2010) para eritrócitos, que ao estudarem células sanguíneas de ratitas, destacam que essas células eram ovais, com núcleos também ovais, a exemplo do que também relata Gallo *et al.* (2015) ao descrever a forma dos eritrócitos de emas adultas.

Outro aspecto a considerar é que em nossos achados os eritrócitos, após corados com Panótico Rápido, apresentam citoplasma acidófilo, de cor róseo-alaranjada, e núcleo roxo escuro, com cromatina uniformemente aglomerada. Estes dados foram confrontados com os trabalhos desenvolvidos por Fortes *et al.* (2009) pesquisando emas adultas, o que permitiu que nós observássemos que os resultados para emas são similares aos do estudo desses pesquisadores.

Os eritrócitos maduros de galinhas e perus observados no sangue periférico são células elípticas grandes, que apresentam citoplasma eosinofílico homogêneo e um núcleo central redondo a oval, com um padrão de cromatina condensada, conforme dito por Chanie e Haile (2014). Em rapinantes da ordem Accipitriformes de vida livre, precisamente nas espécies *Rupornis magnirostris* (gavião-carijó) e *Parabuteo unicinctus* (gavião-asa-de-telha), foram observados eritrócitos com forma elíptica, citoplasma abundante, de coloração alaranjada a acinzentada, e núcleo centralizado, de formato também elíptico, com cromatina de aspecto denso e coloração azulada a púrpura (Araújo *et al.*, 2022).

Os heterófilos foram os leucócitos circulantes encontrados em maior quantidade nas extensões sanguíneas. Corroborando com nossa pesquisa, Chanie e Haile (2014) e Jones (2015), abordando sobre hematologia aviária, em que citam, dentre outras, aves do grupo das galinhas e dos falcões, respectivamente, ressaltam que dentre os leucócitos, os heterofilos foram as células encontradas em maior número nos esfregaços de sangue.

Quanto à morfologia, os heterófilos das emas apresentam-se como células grandes, com forma arredondada e uma alta relação citoplasma/núcleo. O citoplasma apresenta-se mais claro, com grânulos intensamente eosinofílicos, fusiformes, vermelhos ou laranja, em forma de bastonete (Figura1: a), semelhante ao que citam Fortes *et al.* (2009) e Gallo *et al.* (2015) para heterófilos de *Rhea americana*. Os núcleos mostram-se bilobulares ou trilobulares, excêntricos, basofílicos, de cor púrpura, com regiões mais escuras contendo cromatina condensada.

É importante destacar que Gallo *et al.* (2015) especificam que encontraram heterófilos monolobulares em suas análises, condição não identificada neste estudo, onde verificamos apenas a presença de heterófilos com dois ou mais lóbulos.

Da mesma forma, é pertinente salientar que Blue-Mclendon e Green (2010), estudando as células sanguíneas de emas, descrevem que os heterofilos de ratitas possuem forma arredondada, núcleo segmentado, geralmente preenchido por grande quantidade de grânulos fusiformes de aspecto alaranjado e com um citoplasma claro, convergindo com os nossos achados descritos para o grupo de emas estudados no semiárido potiguar.

De maneira geral, os heterofilos das aves tendem a ser redondos, com núcleos maduros apresentando de dois a três lóbulos, com uma cromatina condensada e de cor púrpura, sendo encontrado, muitas vezes, encoberto por grânulos citoplasmáticos. O citoplasma apresenta-se geralmente incolor e agrega grânulos eosinofílicos, cuja coloração varia do laranja escuro ao vermelho acastanhado (Wardrop; Weiss, 2010; Campbell, 2015; Pinto, 2017). Claver (2009) descreve os heterofilos das aves como células que apresentam citoplasma incolor e eosinofílico típico, grânulos em forma de bastonetes, juntamente com alguns outros grânulos arredondados.

De forma comparativa, assim como nas aves, os répteis apresentam heterófilos em vez de neutrófilos, possuindo grânulos citoplasmáticos acidófilos característicos em forma de agulha, com espécies crocodilianas apresentando grânulos maiores, embora em menor número do que cobras e lagartos. O núcleo tem formato redondo e pode ter dois lóbulos em alguns lagartos. Em termos de função, o heterófilo reptiliano é semelhante ao heterófilo aviário, sendo sua função primária a fagocitose (Claver, 2009).

Os basófilos, considerados incomuns em esfregaços de sangue periférico de espécies aviárias (Jones, 2015), foram encontrados em baixa quantidade nos esfregaços sanguíneos das emas estudadas, apresentando forma esférica, destacando-se dos demais tipos de célula por seus grânulos corarem-se de azul escuro e intenso, que recobrem parcialmente o núcleo (Figura 1: b). O citoplasma apresenta-se escasso, de cor púrpura e preenchido pelos grânulos esféricos, fortemente corados. Quando comparado aos heterófilos e eosinófilos, os basófilos mostram-se menores. Essas características também podem ser observadas quando comparadas ao trabalho desenvolvido por Fortes *et al.* (2009), analisando o sangue de emas. O núcleo, por sua vez, apresenta-se central, arredondado, não segmentado e grande, ocupando grande parte do volume da célula e com regiões de cromatina condensada;

Estudando sangue de avestruzes machos adultos (*Struthio camelus*), Tadjalli e colaboradores (2013) relatam que os basófilos encontrados são escassos e possuem forma arredondada, com um núcleo esférico, segmentado, situado em um lado do citoplasma. Este, por sua vez, continha grânulos esféricos, altamente basofílicos e geralmente sobrepujam o núcleo. Segundo alguns autores (Chanie, 2014; Campbell, 2015; Jones, 2015; Pinto, 2017), para as aves, em geral, os basófilos são ligeiramente menores que os heterófilos, possuem um citoplasma claro, de cor levemente azulada, núcleo não lobado e grânulos basofílicos redondos que muitas vezes obscurecem o núcleo.

Em seu estudo sobre morfologia funcional dos leucócitos sanguíneos das aves, Kolenisk e colaboradores (2020) afirmam que os basófilos são os menores granulócitos sanguíneos das aves, diferindo em estrutura e possuindo citoplasma de cor levemente basofílica, com grânulos intensamente basofílicos de formas arredondadas e relatam ainda que o número de grânulos nos basófilos muito menor do que nos outros tipos de leucócitos granulares.

Os basófilos encontrados em espécies de répteis se assemelham aos de pássaros, tanto em aparência quanto em função. Os quelônios tendem a ter um número maior de basófilos circulantes do que outros grupos de répteis, ainda que não se saiba o motivo de os quelônios terem níveis tão elevados de basófilos circulantes (Claver, 2009).

Os eosinófilos observados foram caracterizados como células arredondadas, com citoplasma fracamente corado, mais basofílico quando comparado ao dos heterófilos, apresentando grânulos pequenos e redondos, eosinofílicos, de coloração acidófila intensa, entre o rosa e o laranja, distribuídos uniformemente em aglomerados ou às vezes no núcleo. Este, por sua vez, mostra-se basofílico e polimórfico, geralmente bilobulado, com cromatina condensada, localizado central ou perifericamente em relação ao citoplasma, apresentando coloração violeta (Figura 1: c). Os estudos realizados por Fortes *et al.* (2009) com sangue de emas, referem-se a esse tipo celular exatamente dessa forma.

Pinto (2017) relata que existem variações, a depender da espécie, condição que leva o estudioso a recomendar a comparação com outros tipos celulares do esfregaço para facilitar a diferenciação. No entanto, eles comumente apresentam forma arredondada, um núcleo lobado e citoplasma azul claro, com grânulos eosinofílicos redondos a ovais que se coram de forma mais clara do que os dos heterófilos, devido a uma maior concentração de arginina nos grânulos dos eosinófilos, sendo possível diferenciá-los (Jones, 2015).

Em ratitas, geralmente os eosinófilos têm núcleo bilobulado, citoplasma azul claro com grande quantidade de grânulos vermelhos para rosa, pequenos e redondos (Blue-Mclendon; Green, 2010).

Os monócitos caracterizaram-se como células grandes, maiores que os linfócitos, com forma arredondada ou irregular, citoplasma basofílico e abundante, azul acinzentado, podendo-se observar vacúolos e pequenos grânulos em tons azuis escuros. Quanto ao núcleo, este apresentou variações em seu formato, de redondo a rineforme, cromatina pouco condensada quando comparada a dos linfócitos (Figura 1: d).

Estudando ratitas, Blue-Mclendon e Green (2010) observaram monócitos grandes, com moderada quantidade de citoplasma azul acinzentado, apresentando vacúolos, com uma certa frequência, e núcleo pleomórfico, com cromatina menos condensada que nos linfócitos.

Alguns autores como Jones (2015) e Pinto (2017) relataram a possibilidade de encontrar monócitos com núcleos de forma redonda em aves, porém não verificamos essa condição nas emas estudadas, bem como Almeida *et al.* (2015) e Tadjalliet *al.* (2013) também não verificaram em seus trabalhos com emus (*Dromaius novaehollandiae*) e avestruzes (*Struthio camelus*), respectivamente.

No que diz respeito aos linfócitos das aves, Mitchell e Johns (2008) inferem que a sua morfologia é semelhante à dos mamíferos. Nos esfregaços sanguíneos das emas de nossa pesquisa, os linfócitos mostraram-se arredondados, com núcleo ligeiramente excêntrico, apresentando áreas de cromatina densamente condensada e uma alta relação núcleo/citoplasma.

O citoplasma desta linhagem de células apresentou-se de escasso a moderado, ocupando pouco espaço celular quando comparado ao núcleo, homogêneo, basofílico, de tom azul claro, sem grânulos citoplasmáticos e sem vacuolização (Figura1: e). Essa condição, foi descrita por Fortes *et al.* (2009) e Gallo *et al.* (2015) também em estudos com emas (*Rhea americana*).

Nas aves, os linfócitos são considerados os menores e mais numerosos leucócitos mononucleares circulantes, segundo cita Bhattacharjee (2023) ao desenvolver estudos com vários tipos de aves, como emas, emus, avestruzes, galinhas, gansos, onde relata que esses são células redondas, contendo núcleo redondo, não segmentado, localizado centralmente ou excentricamente e cobrindo quase toda a célula, com cromatina condensada e corado em roxo. De acordo com o autor, nessas células o citoplasma é desprovido de vacúolos, é homogêneo, basofílico e apresenta um halo estreito ao redor do núcleo. Além disso, apresentam uma alta relação entre o volume do núcleo e o citoplasma.

Para a maioria dos répteis, os linfócitos são as células sanguíneas circulantes encontradas em maior número. Eles são semelhantes em aparência aos linfócitos de aves e mamíferos. Linfócitos T foram caracterizados em répteis e são funcionalmente semelhantes aos encontrados em aves. Monócitos e trombócitos são semelhantes em estrutura e função àqueles encontrados no sangue aviário (Claver, 2009).

Os trombóticos, nas aves e em vertebrados mais abaixo na escala evolutiva, são células sanguíneas nucleadas, funcionalmente equivalentes às plaquetas presentes no sangue dos mamíferos. Estas células, segundo Claver (2005), em sua pesquisa com trombócito aviário, são observadas nos esfregaços de sangue como células ovóides ou discóides, um pouco menores e mais arredondadas que os eritrócitos. Neles o núcleo é redondo ou oval e apresenta cromatina muito condensada, formando placas de heterocromatina e moderada quantidade de citoplasma azulado ou transparente que pode ser observado com aspecto reticular ou vacuolizado. Na superfície das dessas células podem ser observadas a presença de pseudópodes, lobopódios e invaginações da membrana plasmática.

Em *Rhea americana* os trombócitos caracterizaram-se por apresentar forma geralmente elíptica, com um núcleo arredondado a elíptico, fortemente basofílico, contendo cromatina condensada e ocupando quase toda a célula, conferindo uma elevada relação núcleo/citoplasma. Gallo e colaboradores (2015) encontraram trombócitos redondos ou ovais em seu estudo com emas, condição não verificada em nossa pesquisa. Fortes e colaboradores (2009) afirmaram que a forma elíptica dos trombócitos é exclusiva da espécie *Rhea americana*. De fato, em outras espécies de ratita, como avestruzes e emus, foram observados trombócitos com formato esférico a oval, como descrito por Tadjalli *et al.* (2013) e Almeida *et al.* (2015), respectivamente.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Descrever de maneira minuciosa a superfície das células sanguíneas das aves pode proporcionar *insights* valiosos sobre a morfologia dessas células e, conseqüentemente, permite estabelecer correlações com situações associadas ao sistema imunológico e à habilidade de combater doenças e lesões, bem como com situações relacionadas à saúde do animal como um todo. Esses atributos desempenham um papel essencial na realização de diagnósticos e na aplicação de tratamentos eficientes na medicina veterinária voltada para aves.

Apesar da importância, após busca rebuscada na literatura, verificamos a escassez de estudos que apresentassem resultados da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células sanguíneas de aves. Neste sentido, analisamos a superfície das células sanguíneas de *Rhea americana*, utilizando a MEV, com ampliação de 10.000 vezes (Figura 2), a fim de se obter informações mais detalhadas da morfologia dessas células.

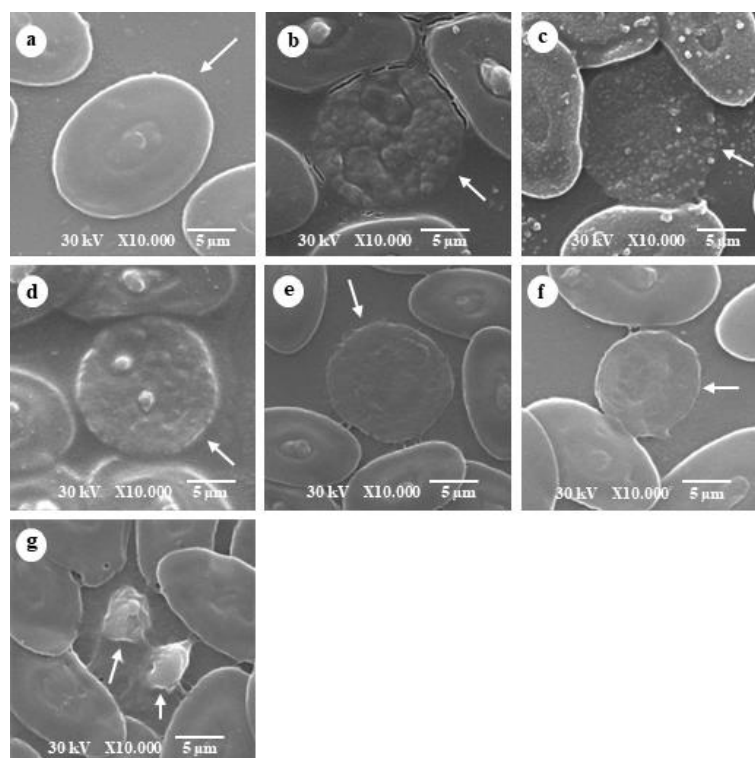


Figura 2. Micrografias dos principais tipos de célula sanguínea de emas (*Rhea americana*) observados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em ampliação de 10.000 vezes. (a) Eritrócito (seta). (b) Heterofilo (seta). (c) Basófilo (seta). (d) Eosinófilo (seta). (e) Monócito (seta). (f) Linfócito (seta). (g) Trombócitos (setas). Barra: 5 µm.

Os eritrócitos maduros (Figura 2: a) das emas eram planos, com uma superfície lisa, relativamente uniforme, sem grandes rugosidades ou projeções, com forma elíptica, apresentando uma estrutura proeminente mais interna, centralizada na célula, de forma também elíptica, representando o núcleo. Quanto ao aspecto do núcleo este apresentava uma textura diferente, contrastando com a membrana celular.

Uma pesquisa realizada com grou indiano (*Grus antigone sharpii*) por Narkkong (2010) com o objetivo de descrever os aspectos da morfologia de células sanguíneas por análise da superfície celular utilizando MEV, descreveu os eritrócitos como células planas, de superfície lisa. No entanto, as imagens de MEV apresentadas por Narkkong (2010) não mostram eritrócitos nucleados, apesar de sua análise por microscopia de luz mostrar eritrócitos com núcleo.

Quanto aos leucócitos granulócitos, observamos que os heterófilos (Figura 2: b) eram redondos, com uma superfície de membrana irregular, apresentando rugosidades e protuberâncias devido às granulações citoplasmáticas e outras estruturas submembranares, delimitando a estrutura do núcleo segmentado.

Os basófilos (Figura 2: c), por sua vez, eram arredondados e apresentavam uma superfície irregular e texturizada, com áreas de rugosidades e elevações, em função da presença de microvilosidades e possíveis projeções da membrana plasmática. Suas granulações citoplasmáticas aparecem como áreas densamente granulares sob a membrana plasmática, evidenciando-se como pequenas elevações ou pequenas projeções na superfície da célula. Essas irregularidades da superfície e as projeções podem conferir uma aparência ocasionalmente deformada ou denteada.

Os eosinófilos (Figura 2: d) eram células também de forma arredondada, com uma superfície geralmente irregular, apresentando rugosidades, com muitos grânulos esféricos submembranares ou estruturas semelhantes a vilosidades projetando-se para sua superfície de membrana.

Em sua pesquisa com grou indiano, Narkkong (2010) descreveu os heterófilos como células redondas, com grânulos esféricos regulares e espinhos na superfície da membrana; os basófilos eram células redondas, com uma superfície de membrana rugosa e continham espinhos que se projetavam da superfície da membrana; e os eosinófilos eram células redondas com muitos espinhos esféricos projetando-se da superfície da membrana.

Nossas análises mostraram que os monócitos (Figura 2: e) eram maiores que os linfócitos. Eles apresentavam forma arredondada, com uma superfície de membrana também irregular, apresentando rugosidades, dobras e projeções.

Os linfócitos (Figura 2: f) eram pequenas células redondas, apresentando uma textura de membrana relativamente áspera, além de mostrar algumas irregularidades, com algumas projeções finas na superfície. Observamos indícios de granulações ou de outras estruturas submembranares através da textura de sua superfície. Em grou indiano, Narkkong (2010) verificou que os linfócitos eram células redondas, com membrana rugosa, sendo sua superfície diferente daquela encontrada nos monócitos. Estes, por sua vez, eram maiores do que os linfócitos.

A superfície celular dos leucócitos é especializada para se ligar e englobar patógenos, no processo conhecido como fagocitose. Assim, a estrutura e a morfologia dos leucócitos analisadas por MEV, sugerem a presença de vilosidades, projeções e/ou espículas na superfície de membrana dessas células, que podem estar relacionadas ao processo de adaptação para uma resposta imunológica eficiente nas aves.

No que se refere aos trombócitos (Figura 2: g), estes tinham forma geralmente elíptica, apresentando uma superfície bastante complexa, apresentando várias irregularidades, rugosidades e dobras. Percebemos a presença de extensões da membrana celular, como pseudópodes ou outras pequenas projeções, mostrando a adesão e interação com outros trombócitos e com a matriz extracelular. Narkkong (2010) verificou que no grou indiano os trombócitos apresentavam um forma oval.

CONCLUSÃO

O sangue da espécie *Rhea americana* apresenta todos os principais tipos de célula. Seus leucócitos apresentam diferenças nas características em comparação aos leucócitos de outras aves e os trombócitos possuem forma elíptica, condição descrita apenas para emas.

Ademais, a análise inédita das células sanguíneas de emas por meio de microscopia eletrônica de varredura para caracterização da morfologia nos permitiu observar a textura da superfície dos diferentes tipos celulares, possibilitando que fosse notada a presença de pequenas projeções como vilosidades, presença de granulações e outras estruturas submembranares, irregularidades e rugosidades, características, que podem estar associadas à função imunológica, adesão e interação com outras células e com a matriz extracelular.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, A. J.; SILVA, A. F.; GALLO, S. S. M.; ECKHARDT, L. A.; DIFILIPPO, P. A. Clinical aspects, morphometry, and morphology of blood cells of the emu (*Dromaius novaehollandiae*) reared in captivity. **Comp Clin Pathol** (2015) 24:1553–1558.
- ARAUJO, S. T.; CAMPOS, S. D. E.; CUNHA, D. M.; PIRES, J. R.; JUNIOR, A. C. A. P.; TOMA, H. K.; SOUZA, A. M.; ALMOSNY, N. R. P. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, e227111032508, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32508>
- BHATTACHERJEE, A. Avian Erythrocytes and Agranulocytes - a Review. **Science Reviews - Biology**, 2023, 2(2), 21-29. <https://doi.org/10.57098/SciRevs.Biology.2.2.2>
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2022. **Rhea americana**. The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T22678073A219615764. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/22678073/219615764>>. Acesso em: 17 mai. 2024.
- BLUE-MCLENDON, A; GREEN, R. A. 2010. Hematologia de ratites. In: DJ WEISS e KJ WARDROP, eds. **Hematologia veterinária de Schalm**. 6ª edição. Ames: Lippincott Williams & Wilkins, pp.
- CAMPBELL, T. W. Hematologia das Aves. In: THRALL, Mary Anna et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 19. p. 507-586.
- CHANIE, M.; HAILE, Y. Comparative Aspect of the Clinical Hematology of Birds: A Review. **British Journal of Poultry Sciences** 3 (3): 88-95, 2014. ISSN 1995-901X. DOI: 10.5829/idosi.bjps.2014.3.3.83263
- CLAVER, J.A. El trombocito aviar. **Investigación Veterinaria**, v.7 (1), p.139-146, 2005.

- 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.
- COSTA SARAIVA, A.L.B.; VALE, C.C.; ZANELLA, M.E. Comportamento dos Elementos Climáticos no Município de Mossoró (RN) e os Impactos na Saúde Humana. **Revista GeoInterações**, 1(1): 87-105, 2017.
- FORTES, E. A. M.; SOUSA, A. F.; ALMEIDA, E. C. S.; CONDE JÚNIOR, A. M.; MOURA, W. L. Morfologia das células do sangue periférico em emas (*Rhea americana*). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 215-221, 2009.
- GALLO, S. S. M.; EDERLI, N. B.; BÔA-MORTE, M. O.; OLIVEIRA, F. C. R. Hematological, morphological and morphometric characteristics of blood cells from rhea, *Rhea Americana* (Struthioniformes: Rheidae): a standard for Brazilian birds. **Braz. J. Biol.**, 2015, vol. 75, no. 4, pp. 953-962. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.03414>
- JONES, M. P. Avian Hematology, **Clinics in Laboratory Medicine**, Volume 35, Issue 3, 2015, Pages 649-659, ISSN 0272-2712, ISBN 9780323430272, <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>.
- KOLESNIK, E.; DERKHO, M.; STRIZHIKOV, I.; STRIZHIKOVA, S.; SEREDA, T.; GIZATULLINA, F.; REBEZOV, M. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, December - 2020; Volume – 8(Spl-2- AABAS) page S374 – S380.
- LÈCHE, A.; GISMONDI, E.; MARTELA, MB; NAVARRO, JL. Primeira avaliação de poluentes orgânicos persistentes na Grande Rhea (*Rhea americana*), uma ave herbívora quase ameaçada que não voa das pastagens dos Pampas. **Meio Ambiente. Ciência. Poluição. Res.** 2021, 28, 27681–27693.
- MITCHELL, Elizabeth B.; JOHNS, Jennifer. Avian Hematology and Related Disorders. **Veterinary Clinics Of North America: Exotic Animal Practice**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.501-522, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.004>.

- 468 NARKKONG, N. A.; AENGWANICH, W.; TANOMTHONG, A.
 469 Morphology and morphometric of hematological cells from eastern sarus crane,
 470 *Grus antigones harpii*. **Comp Clin Pathol** (2011) 20:299–304. DOI 10.1007/s00580-010-0990-
 471 9
 472
- 473 PICASSO, M.B.J.; MOSTO, C. O Novo Status Taxonômico de *Rhea anchorenensis* (Ameghino e
 474 Rusconi, 1932) (Aves, Palaeognathae) do Pleistoceno da Argentina. **Annales**
 475 **de Paléontologie**, 2016, 102, 237–241.
 476
- 477 PINTO, F. M. S. C.; HOLM, S. B.; GONDIM, L. S. Q. **Atlas virtual de hematologia**
 478 **comparada de aves mantidas sob cuidado humano**. XVI SEPA – Seminário Estudantil de
 479 Produção Acadêmica, UNIFACS, 2017. Disponível em:
 480 <http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa>. Acesso em: 20 Jun 2024.
 481
- 482 SAMOUR, J. **Medicina aviária**. Elsevier Ciências da Saúde, 2015.
 483
- 484 SANTOS, T. F.; SANTOS, S. S.; GOMES, I. S. A.; SIQUEIRA, A. J. S.; SANTOS, M. F.;
 485 OLIVEIRA, A. B. S. Interações entre aves e plantas: um estudo bibliométrico sobre a
 486 contribuição das aves como polinizadoras e dispersoras da flora. **Contribuciones a Las**
 487 **Ciencias Sociales**, São José dos Pinhais, v.16, n.10, p.24745-24759, 2023.
 488
- 489 SOUSA, R.P.; MONTEIRO, H. M. D. A.; BEZERRA, D. D. O.; SOARES, L. L. D. S.; ASSIS
 490 NETO, A. C.; RICI, R. E.; JÚNIOR, C. M. A.; CARVALHO, M. A., 2018. Morfogênese do
 491 sistema respiratório da ema (*Rhea americana*) em diferentes estágios embrionários e fetais.
 492 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38:154-166.
 493
- 494 TADJALLI, M.; NAZIFI, S.; ABBASABADI, B. M.; MAJIDI, B.
 495 Histomorphometric study on blood cells in male adult ostrich. **Veterinary Research Forum**.
 496 2013; 4 (3) 199 – 203.
 497
- 498 VILA, L. G. **HEMATOLOGIA EM AVES**: Revisão de literatura. 2013. 46 p. Seminário
 499 (Pós-Graduação em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade
 500 Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2013.
 501

- 502 WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (2010). **Schalm's Veterinary Hematology**, 6^a Ed., Wiley
503 Blackwell, 968-1012.
504