

FILIPA CORTESÃO CASIMIRO COUTINHO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DE VALORES SÉRICOS DE CÁLCIO
IONIZADO EM CATURRAS (*NYMPHICUS
HOLLANDICUS*) EM CONDIÇÕES ‘INDOOR’ E
‘OUTDOOR’**

Orientador: Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2020

FILIPA CORTESÃO CASIMIRO COUTINHO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DE VALORES SÉRICOS DE CÁLCIO
IONIZADO EM CATURRAS (*NYMPHICUS
HOLLANDICUS*) EM CONDIÇÕES ‘INDOOR’ E
‘OUTDOOR’**

Dissertação defendida para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 17 de Março de 2020, com o despacho reitoral nº80/2020, de 27 de fevereiro, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Inês Carolino

Orientador: Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha

Co-Orientador: Dr. Rui Filipe Galinho Patrício

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

No me hagas caso. Soy de otro planeta.
Todavía veo horizontes donde tú dibujas
fronteras.

- Frida Kahlo

Aos meus pais.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, a todos os docentes e colaboradores por terem contribuído para a minha formação profissional e crescimento pessoal.

À minha orientadora, Professora Doutora Nazaré Pinto da Cunha e ao meu co-orientador, Professor Dr. Rui Filipe Galinho Patrício por toda a ajuda, pelos conselhos e pela colaboração na escolha do tema e realização desta dissertação.

À Universidade Lusófona pela bolsa de investigação que financiou este estudo.

Aos meus pais por todo esforço que fizeram por mim e pelo apoio incondicional. – Pai, obrigada por confiares em mim e por teres partilhado comigo todo o teu valioso conhecimento. Muito do que sei hoje, aprendi contigo. Mãe, obrigada por me ouvires, por me dares força e por acreditares nas minhas capacidades, sempre.

À Rita, porque foi durante todo este percurso, e é sempre, a grande companheira dos momentos de vitória e dos momentos difíceis.

À Renata, pela amizade e apoio, e porque ao fim de tantos anos ainda me ajuda com os números.

À Raquel, porque é amiga de todas as horas e companheira de luta.

À Catarina e ao Mário, pelos concelhos, pela amizade e por terem reservado o vosso pouco tempo livre para me ajudarem.

À Carol, à Gabriela, à Sandy, e a todos os amigos que me acompanharam durante o percurso académico pelos bons momentos, pelas gargalhadas e pela força que me deram.

Ao Balé Balé, à São, à Joana, ao Marco, ao tio Zé, tia Tó e à minha prima Catarina porque me empurraram na direção certa.

Ao Carlos, pelo que me ensinou, por me ter convidado a entrar no mundo dos exóticos e pelas experiências e gargalhadas que tivemos juntos.

Ao professor Resende por ter aberto a sua porta e por ter acompanhado a evolução desta dissertação.

À Luisa e ao John pela companhia nas noites de estudo.

Por fim quero agradecer aos meus animais e em especial, à Lolita, ao Rocky, à Jade, ao Napoleão e ao Houdini por todo o carinho e inspiração. – Convosco apaixonei-me pelas aves e por vós persegui o meu sonho.

Obrigada.

Resumo

A hipocalcemia e a doença óssea metabólica são duas das condições mais prevalentes em aves de cativeiro. Estas advêm principalmente de uma alimentação incorreta e insuficiente exposição solar. Existem estudos que demonstram esta relação causa-efeito, maioritariamente em aves de produção, mas também noutras espécies como o papagaio cinzento (*Psittacus erithacus*). Contudo, não foi até à data realizado este estudo em caturras, um dos animais de estimação mais comuns em todo o mundo.

Pretendeu-se com o presente trabalho caracterizar os efeitos da exposição solar nos níveis séricos de cálcio ionizado (iCa) em caturras (*Nymphicus hollandicus*) e criar um intervalo de referência com base numa população padrão. Para tal procedeu-se a uma avaliação comparativa em 60 animais alimentados à base de sementes e expostos a diferentes ambientes, com e sem exposição direta a radiação ultravioleta tipo B (UVB). Verificou-se uma correlação positiva entre os valores de cálcio ionizado e a exposição solar direta e foi criado um intervalo de referência para o cálcio ionizado nesta espécie [1,31 – 1,65] (mmol/L). Foi ainda possível a criação de intervalos de referência para os animais 'indoor' [1,34 – 1,59] (mmol/L) e 'outdoor' [1,32 – 1,71] (mmol/L), preenchendo uma lacuna na medicina de aves e providenciando um parâmetro de elevado valor diagnóstico.

Palavras-chave: Cálcio ionizado; Caturras; Radiação ultravioleta; Intervalo de referência; Aves.

Abstract

Hypocalcemia and metabolic bone disease are two of the most prevalent conditions in captive birds. These come mainly from poor diet and insufficient sun exposure. Studies have shown this cause-effect relationship, mainly in production birds, but also in other species such as the African Grey parrot (*Psittacus erithacus*). However, this study has not yet been conducted on cockatiels, one of the most common pets in the world. This work aimed to characterize the effects of sun exposure on serum ionized calcium (iCa) levels in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and to create a reference range based on a standard population. For this purpose, a comparative evaluation was performed in 60 seed-fed animals exposed to different environments, with and without direct exposure to type B ultraviolet radiation (UVB). A positive correlation was found between ionized calcium values and direct sun exposure and a reference range was created for ionized calcium in this species, [1,31 - 1,65] (mmol/L). It was also possible to create reference ranges for indoor [1.34 - 1.59] (mmol/L), and outdoor [1.32 - 1.71] (mmol/L) animals, filling a gap that existed in bird medicine and providing a parameter of high diagnostic value.

Key-words: Ionized calcium; Cockatiels; Ultraviolet radiation; Reference range; Birds.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

[iCa] – Concentração de cálcio ionizado

< – Menor que

> – Maior que

® – Marca Registrada

⁴⁵Ca – Cálcio-45

ASVCP – Sociedade Americana de patologia clínica veterinária, do inglês “*American Society for Veterinary Clinical Pathology*”

Ca – Cálcio

CT – Calcitonina

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês ‘*deoxyribonucleic acid*’

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês ‘*Ethylenediamine tetraacetic acid*’

Et al. – E outros, da locução latina “*et alli*”

g – Grama

GH – Hormona de crescimento, do inglês ‘*growth hormone*’

gl – Grau de liberdade

H₀ – Hipótese nula

I – Imprecisão

IC – Intervalo de confiança

iCa – Cálcio ionizado

IR – Intervalo de referência

ISE – Eléctrodo seletivo de iões do inglês, ‘*ion-selective electrode*’

Kg – Quilograma

Mg/dL – Miligramas por decilitro

mmol/L – Milimoles por litro

nm – Nanómetros

OPG – Osteoprotegerina

P_i – Fósforo inorgânico

PTH – Paratormona

RANK – recetor ativador do fator nuclear κ B

RANKL – ligando para o recetor ativador do fator nuclear κ B

tCa – Cálcio total

UI – Unidades Internacionais

UVB – Radiação ultravioleta tipo B

Índice geral

1. Casuística do estágio	12
2. Introdução	15
2.1. Metabolismo do cálcio em aves	15
2.2. Vitamina D3 e o seu papel no metabolismo do cálcio	16
2.3. Paratormona	21
2.4. Calcitonina	21
2.5. Estrogénio	22
2.6. Prostaglandinas	22
2.7. Desordens do metabolismo de cálcio	23
2.7.1. Hipocalcemia	23
2.7.2. Hipercalcemia	26
2.7.3. Hiperparatiroidismo	28
2.7.4. Hipoparatiroidismo	29
2.8. Nutrição de aves em cativeiro	30
2.8.1. Sementes versus ração	30
2.8.2. Rácio cálcio:fósforo	31
2.9. <i>Nymphicus hollandicus</i> – Caracterização da espécie	32
2.10. Objetivos	33
3. Material e métodos	34
3.1. Análise estatística	35
4. Resultados	36
5. Discussão	45
6. Conclusão	47
7. Bibliografia	48

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição das consultas, por área.	13
Tabela 2: Distribuição de cirurgias, por tipo.	13
Tabela 3: Sinais clínicos de hipovitaminose D3.	19
Tabela 4: Sinais clínicos de hipervitaminose D3.	19
Tabela 5: Etiologias de hipocalcemia e pseudo-hipocalcemia.	24
Tabela 6: Sinais clínicos de hipocalcemia.	25
Tabela 7: Diagnóstico de hipocalcemia.	25
Tabela 8: Etiologias de hipercalcemia e pseudo-hipercalcemia.	28
Tabela 9: Distribuição de [iCa] (mmol/L), por grupo.	36
Tabela 10: Teste de normalidade.	37
Tabela 11: Teste de uma amostra.	37
Tabela 12: Comparação de [iCa] (mmol/L) entre os grupos (Indoor e Outdoor).	38
Tabela 13: Comparação de [iCa] (mmol/L) entre os grupos (Indoor e Outdoor), por sexo.	39
Tabela 14: Comparação de [iCa] (mmol/L) entre o sexo, por grupo (Indoor e Outdoor).	39
Tabela 15: Distribuição de [iCa] (mmol/L) para o total da amostra (n=53).	41
Tabela 16: Teste de normalidade para o total da amostra.	41
Tabela 17: Teste de uma amostra (n=53).	42
Tabela 18: Intervalo de referência de [iCa] (mmol/L) em <i>Nymphicus hollandicus</i> , para 95% da população, determinado seguindo as 'guidelines' da American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).	42
Tabela 19: Intervalo de referência de [iCa] (mmol/L) em <i>Nymphicus hollandicus</i> , para 95% da população 'indoor', determinado seguindo as guidelines da American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).	43
Tabela 20: Intervalo de referência de [iCa] (mmol/L) em <i>Nymphicus hollandicus</i> , para 95% da população 'outdoor', determinado seguindo as guidelines da American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).	43
Tabela 21: Intervalos de referência para [iCa] (mmol/L) em <i>Nymphicus hollandicus</i>	44

Índice de figuras

Figura 1: Metabolismo da Vitamina D, em aves (Adaptado de Matos, 2008 e Bar, 2008). ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição.	20
Figura 2: O controlo da hipocalcemia. As concentrações de cálcio sanguíneo são repostas maioritariamente pela ação da PTH e 1,25-di-hidroxivitamina D3 no osso, rins e trato intestinal (Adaptado de Matos, 2008). ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição.	24
Figura 3: Radiografia ventrodorsal de uma caturra fêmea adulta com história de anorexia há 7 dias, letargia e prostração. Esta ave tinha uma dieta exclusivamente à base de sementes. A densidade óssea está diminuída de uma forma geral e o rádio e ulna direitos, bem como o tarsometatarso esquerdo, apresentam fraturas patológicas (setas). Os valores plasmáticos de cálcio total nesta ave estavam dentro do intervalo de referência para a espécie (Adaptado de Matos, 2008).	26
Figura 4: Controlo da hipercalcemia. O cálcio plasmático é repostado através do aumento da excreção renal, diminuição da absorção intestinal e pela diminuição da reabsorção óssea (Adaptado de Matos, 2008). ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição.	27
Figura 5: Desenho ilustrativo de uma Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>) (Ilustração de C. W. Gedney, 1877).	32

Índice de gráficos

Gráfico 1: Distribuição das consultas, por área.....	14
Gráfico 2: Distribuição de cirurgias, por tipo.....	14
Gráfico 3: Histograma, animais Indoor.....	38
Gráfico 4: Histograma, animais Outdoor.....	38
Gráfico 5: Gráfico de barras, comparativo das médias das populações indoor e outdoor.	38
Gráfico 6: Histograma, animais Indoor, sexo masculino.....	40
Gráfico 7: Histograma, animais Indoor, sexo feminino.....	40
Gráfico 8: Histograma, animais Outdoor, sexo masculino.....	40
Gráfico 9: Histograma, animais Outdoor, sexo feminino.....	40

1. Casuística do estágio

O meu estágio curricular foi realizado na Exoclinic - clínica veterinária de aves e exóticos, em Lisboa. Este estágio teve a duração de 5 meses, de 1 de Outubro de 2018 a 28 de Fevereiro de 2019. Durante estas 22 semanas tive a oportunidade de acompanhar todos os médicos da clínica e de assistir a consultas e procedimentos cirúrgicos nas áreas de aves, répteis e mamíferos exóticos, tendo adotado um sistema de rotação entre consultas (Tabela 1 e Gráfico 1), cirurgias (Tabela 2 e Gráfico 2) e internamento que me permitiu desenvolver inúmeras competências em cada área.

Foram-me atribuídas diversas responsabilidades, tais como a elaboração de protocolos cirúrgicos e de tratamento, administração de medicações, gestão do internamento, colheitas de sangue, assistência em cirurgia e em domicílios, realização de exames radiográficos e ecográficos e também algum trabalho no laboratório, como a realização de análises sanguíneas, análises de urina, análises coprológicas, observação ao microscópio e interpretação de diversas amostras.

Este foi um estágio enriquecedor no qual adquiri e consolidei conhecimentos sobre áreas muito distintas e no qual desenvolvi importantes competências de comunicação com o cliente.

As tabelas e gráficos abaixo são representativos do número e descrição das consultas e cirurgias realizadas durante o estágio.

Tabela 1: Distribuição das consultas, por área.

Consultas	
Área	Nº de casos
Gastroenterologia	51
Dentisteria	46
Medicina preventiva	32
Medicina interna	23
Maneio	15
Urgências	13
Trauma	13
Ortopedia	11
Oncologia	11
Pneumologia	10
Dermatologia	9
Reprodução	8
Medicina de grupo	7
Neonatologia	6
Neurologia	6
Endocrinologia	5
Geriatria	5
Oftalmologia	3
Comportamento	3
Cardiologia	3
Urologia e Nefrologia	2
Total	282

Tabela 2: Distribuição de cirurgias, por tipo.

Cirurgias	
Tipo	Nº de casos
Correção/extração dentária	14
Marsupialização de abcesso	9
Remoção de tumores	6
Orquiectomia	5
Ovariohisterectomia	5
Gastrotomia	3
Enterotomia	1
Total	43

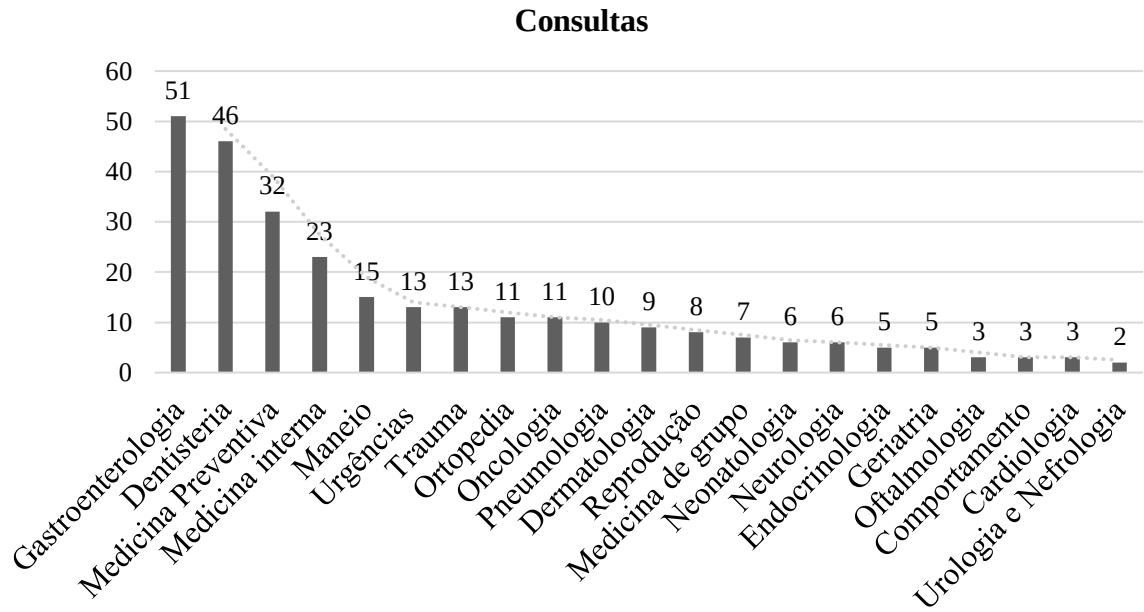


Gráfico 1: Distribuição das consultas, por área.

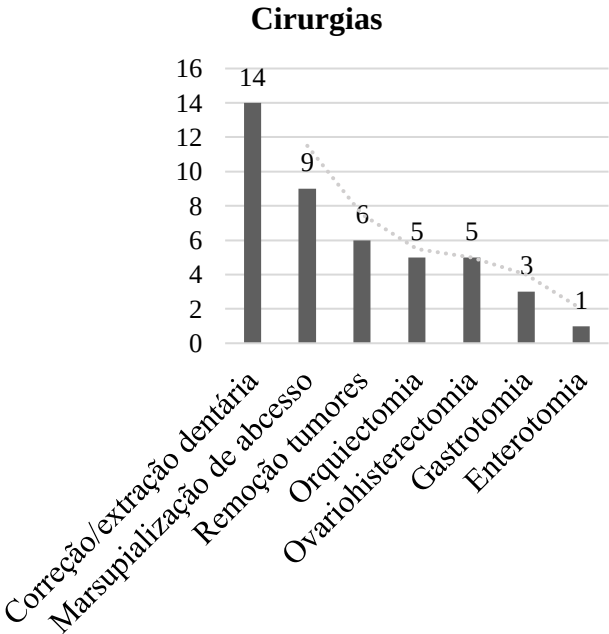


Gráfico 2: Distribuição de cirurgias, por tipo.

2. Introdução

2.1. Metabolismo do cálcio em aves

O cálcio (Ca) é um mineral essencial a múltiplas funções biológicas, nomeadamente na formação e força estrutural do esqueleto, na contração muscular, na cascata de coagulação ou na produção da casca do ovo das aves (Stanford, 2005a). Este mineral existe no soro das aves sobre três formas: na forma ionizada, ligado a proteínas (principalmente à albumina) e na forma complexa ligado a aniões como o citrato, bicarbonato e lactato (de Matos, 2008). A medição do cálcio total (tCa) não é o parâmetro de maior valor diagnóstico, uma vez que, mesmo apresentando um cálcio total normal, um indivíduo com níveis anormais de proteína não está verdadeiramente normocalcémico. Como tal, o cálcio ionizado é o parâmetro laboratorial de eleição para avaliar as alterações do metabolismo do cálcio (Stanford, 2007).

O cálcio ionizado, sendo a forma biologicamente ativa do cálcio sérico, representa 60% a 70% do cálcio total (Tröndle, Steinmetz, Rüegg, Müller, & Liesegang, 2018) e é essencial à homeostase óssea, condução nervosa e muscular, coagulação sanguínea e controlo da secreção hormonal, particularmente da vitamina D3 e da hormona paratiroide.

O controlo do metabolismo do cálcio é um sistema homeostático altamente eficiente e capaz de providenciar uma resposta rápida a uma demanda súbita de cálcio. Esta é uma das diferenças mais marcantes entre as aves e os mamíferos, sendo que estes dois grupos filogenéticos apresentam uma taxa metabólica em tempos de demanda muito distinta podendo as galinhas, segundo alguns estudos, corrigir hipocalcémias em minutos contrariamente a mamíferos na mesma condição, que respondem ao longo de 24 horas (Stanford, 2005b).

O metabolismo do cálcio nas aves é bastante mais rápido e eficiente do que nos mamíferos, possivelmente devido ao facto das aves demandarem quantidades extremamente elevadas de cálcio durante a formação do ovo, processo esse que se estima requerer cerca de 10% do cálcio total da ave. Estima-se que o fluxo de saída do cálcio dos ossos corresponda a 80% do fluxo de entrada e que esta interação ocorra em intervalos de apenas alguns minutos. Um estudo realizado num pinto de uma semana de idade a quem foi administrada uma dose intravenosa de cálcio-45 (^{45}Ca) evidenciou que ao fim de 15 minutos, 40% do cálcio já se encontrava no osso (Shaw, Whittaker, & Dacke, 1989).

O metabolismo do cálcio é regulado pela vitamina D3 (colecalfiferol) que controla a absorção de cálcio no trato intestinal e a sua deposição nos ossos, pela PTH que atua

principalmente a nível renal e em menor escala a nível ósseo, pela calcitonina que controla a hipercalcemia através da diminuição da reabsorção óssea, pelo estrogénio e prostaglandinas que facilitam a reabsorção óssea, e ainda por fatores intracelulares como o factor nuclear ativado pelo receptor κ -B (RANK), ligante RANK (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (Rosol, Chew, Nagode, & Capen, 1995). A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína expressa pelos osteoblastos e células do estroma, com uma alta afinidade para o RANKL, impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu recetor RANK, regulando deste modo a osteoclastogénese e a reabsorção óssea (Christopher G. Dacke, 2015).

Existem estudos que não só comprovam a importância da radiação UVB no metabolismo do cálcio, como reportam a existência de benefícios para a visão, comportamento social e até mesmo reprodutivo, uma vez que muitas espécies de aves têm capacidade visual no espectro ultravioleta (Schaftenaar & van Leeuwen, 2015; Woodhouse & Rick, 2016).

2.2. Vitamina D3 e o seu papel no metabolismo do cálcio

A síntese da vitamina D3 (Figura 1) começa com a conversão do colesterol em 7-desidrocolesterol pela sua isomerização. Esta reação ocorre nas células epiteliais das zonas sem penas das aves, nomeadamente nas patas, e também nos olhos.

Em seguida o 7-desidrocolesterol (pró-vitamina D3), que se encontra na pele e na córnea, quando exposto diretamente (sem interferência de um vidro ou acrílico) a radiação UVB (290-315nm) (Stanford, 2005b), sofre uma quebra da ligação entre os carbonos 9 e 10 do anel B do ciclo pentanoperidrofenantreno, dando origem a uma molécula secosteroide, altamente termoinstável, a que chamamos de pré-vitamina D3. Pela sua termoinstabilidade, esta molécula quando exposta a temperaturas mais elevadas que a pele do próprio animal, sofre uma reação de isomerização e assume uma estrutura tridimensional mais estável, a Vitamina D3. A energia produzida por esta reação promove a sua entrada para a corrente sanguínea (Castro, 2011).

De seguida, será transportada para o fígado onde se transforma em 25-hidroxicolecalciferol, ou calcidiol, nas frações microssomais das células hepáticas por ação da enzima 25-hidroxilase. O próximo e provavelmente mais importante passo na ativação da vitamina D3 ocorre nas mitocôndrias das células do córtex renal, onde esta será convertida pela enzima 1α -hidroxilase em 1,25-di-hidroxivitamina D3 [1,25- (OH) $2D_3$], ou calcitriol, uma hormona esteroide e o metabolito ativo da Vitamina D3. Quando existe calcitriol em circulação

em quantidades suficientes, o calcidiol passa a ser convertido em 24,25-(OH)₂-D₃ por ação da 24-hidroxilase, sendo posteriormente transportado para o osso. (Norman, 1987). A produção de 1,25-di-hidroxivitamina D₃ aumenta particularmente nas fêmeas durante a fase de produção da casca dos ovos devido à ação da prolactina que aumenta a produção de 1 α -hidroxilase. Em galinhas, a administração de estrogênio exógeno produz um efeito semelhante. A 1,25-di-hidroxivitamina D₃, por sua vez, aumenta a síntese de proteínas ligadoras de cálcio, aumentando assim a reabsorção intestinal e em conjunto com a PTH para promover a diminuição da excreção renal de cálcio através do aumento da reabsorção tubular (Watson & Mitchell, 2014). A forma ativa da vitamina D₃ atua também sobre os osteoclastos em resposta à hipocalcemia, promovendo a liberação de cálcio e fósforo para a corrente sanguínea, e nos osteoblastos estimulando a produção de novo osso num estado de eucalemia (Howard, Kass, Lamberski, & Wack, 2004; Stanford, 2007).

Coloca-se a hipótese de que a glândula uropigial produza também precursores da Vitamina D tendo um papel na produção de Vitamina D₃, no entanto alguns estudos demonstram que apenas pequenas quantidades de pró-vitamina D foram encontradas no óleo desta glândula (Bar, 2008; Stanford, 2005b).

Esta é uma vitamina encontrada em todo o reino animal e muito raramente em plantas, nas quais a vitamina D existe como ergocalciferol ou vitamina D₂. A vitamina D₂ pode ser utilizada pela maioria dos mamíferos (exceto alguns primatas do Novo Mundo) ao contrário das aves (Massengale & Nussmeier, 1935) que não o podem fazer devido ao aumento da 'clearance' renal de vitamina D₂ pelo rim *versus*, má absorção intestinal e porque a ligação da vitamina D₂ às proteínas plasmáticas nas aves é menos eficiente do que nos mamíferos (Doneley, 2016a).

O metabolismo da vitamina D₃ tem sido extensamente estudado em aves de capoeira. Alguns desses estudos demonstram que em explorações 'indoor', quando excluída a radiação UVB artificial, ainda que, com uma dieta suplementada com 400 UI/kg, de colecalciferol, os animais apresentam sinais de raquitismo com valores baixos de cálcio ionizado (Stanford, 2005b). A Vitamina D₃ tem um papel chave no metabolismo do cálcio, nomeadamente no desenvolvimento ósseo devido à sua função de regulação da absorção mineral e controlo da diferenciação dos seus elementos celulares, bem como no sistema imunitário, segundo alguns estudos em pintos que concluem que a deficiência de vitamina D₃ causa depressão da resposta imunocelular (Watson & Mitchell, 2014).

A literatura sugere que aves sujeitas a uma exposição solar adequada não têm necessidade de suplementação de vitamina D na dieta (de Matos, 2008; Tröndle et al., 2018).

No entanto a Vitamina D3 em excesso na dieta está associada a toxicidade e causa alterações (Tabela 4) no metabolismo do cálcio e fósforo que podem resultar em calcificação dos tecidos moles associados, nomeadamente no rim (Stanford, 2005b).

Para prevenir esta toxicidade, a suplementação deve ser feita com o precursor inativo (colecalciferol) que vai requerer hidroxilações para se transformar num produto biologicamente ativo (Doneley, 2016a).

Existe uma variação interespecie na suscetibilidade à toxicidade da vitamina D3. Foi demonstrado em vários grupos de araras que a toxicidade ocorre em níveis mais baixos de vitamina D3 comparativamente a outras espécies de aves (Stanford, 2005b).

Não existem casos reportados de intoxicação por exposição excessiva a radiação UVB uma vez que o colecalciferol é degradado e transformado em compostos inertes reversíveis como o taquiesterol e o lumisterol, no entanto a exposição artificial com lâmpadas UVB deve ser feita de forma conscienciosa pelo risco de lesões como fotoqueratites e fotodermatites (Tröndle *et al.*, 2018).

A hipovitaminose D3 (Tabela 3) pode ocorrer devido a um deficiente aporte na dieta, exposição solar inadequada, em animais com desordens intestinais e em animais que apresentem doença renal e/ou hepática, tendo a doença renal um impacto significativamente maior que a hepática (de Matos, 2008).

Em medicina humana, está descrito raquitismo dependente da vitamina D3, causado por deficiências nos recetores da vitamina D3. Foi também demonstrado em humana, que é necessário existir mais de 90% de perda da função hepática para que a produção de 25-hidroxicolecalciferol seja afetada (Stanford, 2005b).

Tabela 3: Sinais clínicos de hipovitaminose D3.

Sinais clínicos de hipovitaminose D3 (Lumeij, 1994; Macwhirter, 2009; Orosz, Monks, & Matos, 2015)
Diminuição da absorção de cálcio
Hipocalcemia
Aumento da PTH
Desmineralização óssea
Deformação óssea
Fraturas patológicas
Ovos de casca fina, mole e de forma anormal

Tabela 4: Sinais clínicos de hipervitaminose D3.

Sinais clínicos de hipervitaminose D3 (Lumeij, 1994; Macwhirter, 2009; Orosz et al., 2015)
Aumento da absorção de cálcio e reabsorção óssea
Hipercalcemia
Diminuição da PTH
Mineralização de tecidos moles, nomeadamente nefrocalcinose
Poliúria

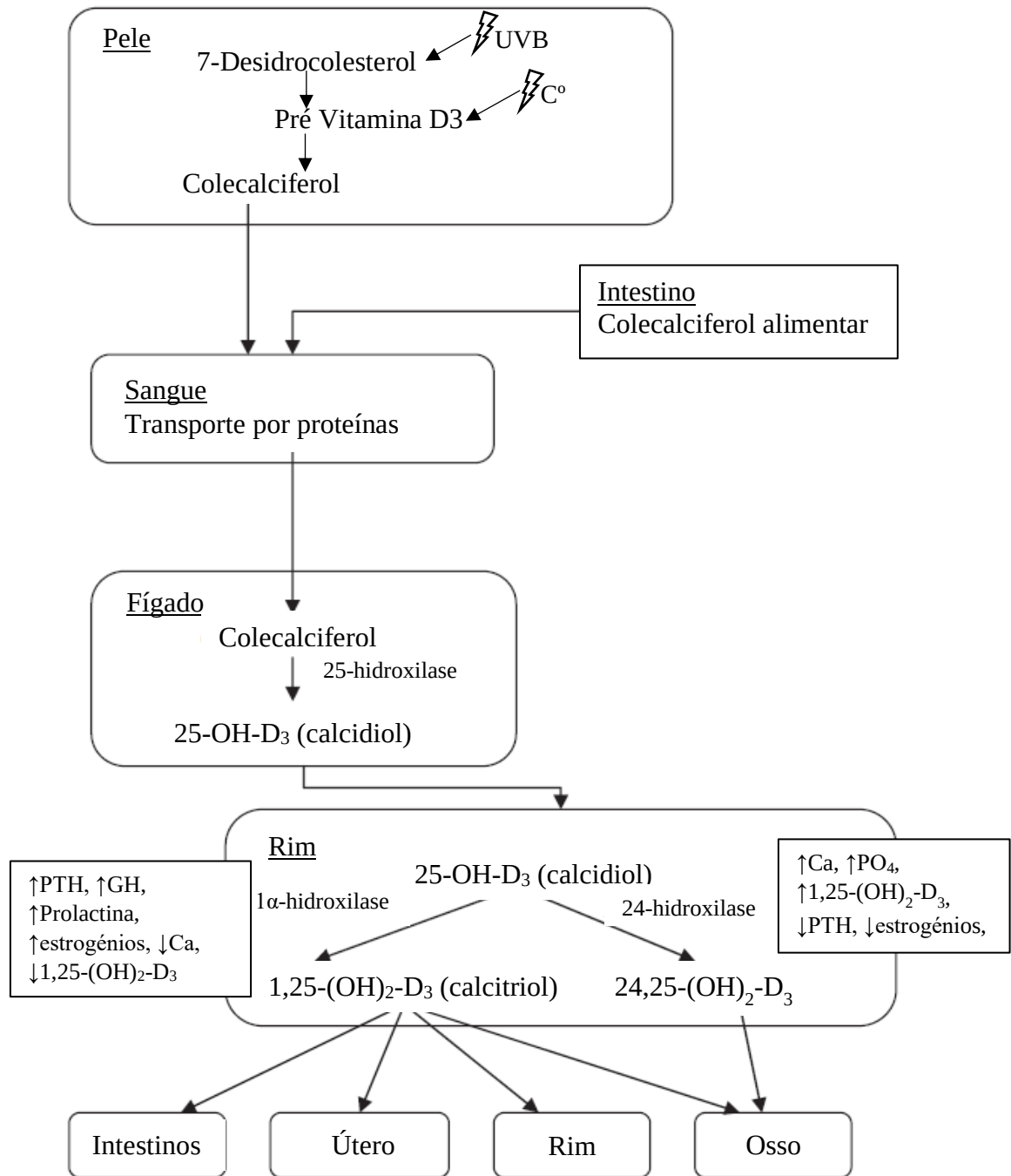


Figura 1: Metabolismo da Vitamina D, em aves (Adaptado de Matos, 2008 e Bar, 2008).
↑ - Aumento; ↓ - Diminuição.

2.3. Paratormona

A paratormona (PTH) é sintetizada, armazenada e mais tarde secretada pelas quatro glândulas paratiroides que se encontram localizadas em par caudalmente à tiroide. Ao contrário do que acontece nos mamíferos, a grande maioria das espécies de aves não tem células oxífilas (Christopher G. Dacke, 2015; Doneley, 2016a; Hurwitz, 1989).

Esta hormona tem um papel crucial na regulação do cálcio plasmático, reagindo por um mecanismo de retrocontrolo negativo e atuando por fases em resposta a estados de hipocalcemia (Doneley, 2016a; Johnston & Ivey, 2002). A resposta mais imediata à hipocalcemia pela PTH acontece em cerca de 8 minutos (nos mamíferos em 30 minutos) e dá-se a nível renal. Nesta fase vai provocar um aumento da reabsorção tubular do cálcio, diminuindo assim a excreção deste mineral pela urina (Candlish & Taylor, 1970). Em seguida vai aumentar a excreção urinária de fosfato. E por fim, vai aumentar a atividade da 1α -hidroxilase e inibir a atividade da 24-hidroxilase, estimulando a conversão de 25-hidroxivitamina D3 em 1,25-dihidroxivitamina D3, a forma biologicamente ativa. A 1,25-dihidroxivitamina D3, por sua vez e por um mecanismo de retrocontrolo positivo, vai estimular ainda mais a produção de PTH, e vai além de elevar a absorção intestinal de cálcio e fósforo, trabalhar em conjunto com a PTH para aumentar a reabsorção óssea de cálcio. Uma vez repostos os níveis de cálcio, a vitamina D3 encarrega-se de inibir a libertação de PTH (N. B. Clark & Sasayama, 1981; N. Clark, Braun, & Wideman RF, 1976; Doneley, 2016a).

2.4. Calcitonina

A calcitonina é produzida pela glândula ultimobranquial das aves (Lasmole, Jullienne, Desplan, Milhaud, & Moukhtar, 1985), ao passo que nos mamíferos é produzida nas células C da tiroide. Esta hormona atua diminuindo a atividade dos osteócitos e osteoclastos em prol da redução da saída de cálcio dos ossos quando existe um aumento nos níveis séricos de cálcio ionizado (Yasuoka, Kawashima, Takahashi, Tatematsu, & Tanaka, 1998).

A calcitonina é secretada pelas células C das glândulas ultimobranquiais. Embora o papel da calcitonina em aves não esteja ainda completamente esclarecido, sabe-se que, ao contrário do que acontece nos mamíferos, em aves esta hormona não consegue provocar hipocalcemia em animais normocalcémicos, atuando apenas quando na presença de uma

hipercalcemia. Nestes casos o seu mecanismo de ação é diminuir a reabsorção óssea de cálcio (Christopher G. Dacke, 2015; Copp, D.H., Kline, 1989; Johnston & Ivey, 2002).

2.5. Estrogénio

O papel do estrogénio no metabolismo de cálcio está principalmente relacionado com o seu transporte, mobilização e armazenamento (Orosz *et al.*, 2015).

O estrogénio é, em aves, indutor de hipercalcemia e estimula um aumento da concentração da vitamina D3, nos dias que antecedem a ovulação, devido a uma grande demanda de cálcio para a formação da casca do ovo. Este aumento acontece devido a um incremento das proteínas ligadoras do cálcio, secundariamente ao transporte das proteínas da gema para o ovário como complexos de cálcio (Lumeij, 1994).

No rim, juntamente com a prolactina, promove a ativação da enzima 1α -hidroxilase e a diminuição da enzima 24-hidroxilase. No intestino, regula os recetores de 1,25-dihidroxitamina D3 na mucosa, promovendo a absorção de cálcio (Beck & Hansen, 2004).

O estrogénio é também um importante fator no crescimento e maturação do osso, bem como, no ‘turnover’ em adultos, sendo o seu deficit responsável por um aumento da reabsorção óssea (Beck & Hansen, 2004; de Matos, 2008).

A formação de osso medular pode ser iniciada por estrogénios e androgénios sem a presença de Vitamina D3, contudo, a mineralização só é concluída na presença de valores adequados da mesma (Beck & Hansen, 2004; Macwhirter, 2009).

2.6. Prostaglandinas

As prostaglandinas são substâncias promotoras da reabsorção óssea que têm ação nos osteoclastos e, tal como a PTH e metabolitos da Vitamina D3, exercem um efeito hipercalcémico (Baggio & Pita, 2013).

Um estudo evidenciou que a administração de prostaglandinas em frangos, produz hipercalcemia e que a administração de antagonistas das prostaglandinas tem o efeito oposto, levando a uma hipocalcemia (Christopher G. Dacke, 2015).

2.7. Desordens do metabolismo de cálcio

2.7.1. Hipocalcemia

A hipocalcemia (Figura 2) é uma patologia que tem particular impacto nas aves de companhia, pois é tipicamente uma doença do cativeiro, cujas causas mais comuns são nutricionais, por deficiência em cálcio e D3 ou rácio cálcio:fósforo inadequado na dieta (Tabela 5).

A insuficiente exposição a radiação UVB, nomeadamente no caso de aves ‘indoor’, também diminui a biodisponibilidade do cálcio devido à deficiente produção de vitamina D3 (Doneley, 2016a). As patologias associadas à hipocalcemia incluem, frequentemente, osteoporose, raquitismo em aves jovens e osteomalacia em aves adultas (de Matos, 2008; Doneley, 2016a).

Os sinais clínicos de hipocalcemia são (Tabela 6 e Figura 3) astenia, alterações neurológicas como convulsões, ataxia, paresia, fraturas patológicas, e problemas reprodutivos. Fêmeas reprodutoras ou com ovopostura crónica podem apresentar-se com distocia, prostradas, fracas, dispneicas e com distensão abdominal com uma massa palpável (Graham, 2016). Nestes casos o cálcio total pode encontrar-se dentro dos valores de referência [8,5 – 13] (mg/dL) (Hawkins, Barron, Speer, Pollock, & Carpenter, 2012) e é importante recorrer a análise do cálcio ionizado para um maior valor diagnóstico (Tabela 7). Esta é uma situação que acomete frequentemente caturras (Harcourt-Brown, 2009a).

Ao contrário do que acontece nas outras espécies animais, não foi ainda confirmada uma relação entre a hipocalcemia e a doença renal, não tendo nunca sido descrito nenhum caso de hiperparatiroidismo renal secundário (Orosz *et al.*, 2015).

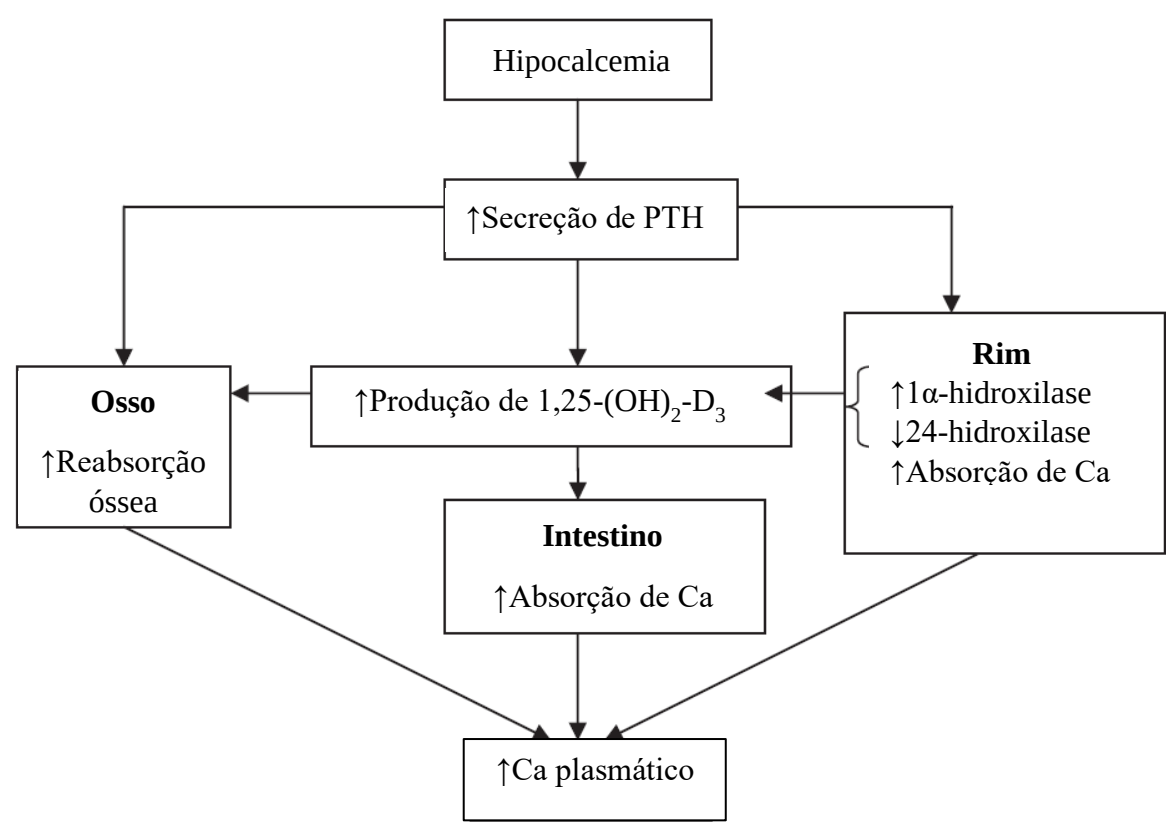


Figura 2: O controlo da hipocalcemia. As concentrações de cálcio sanguíneo são repostas maioritariamente pela ação da PTH e 1,25-di-hidroxivitamina D3 no osso, rins e trato intestinal (Adaptado de Matos, 2008). ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição.

Tabela 5: Etiologias de hipocalcemia e pseudo-hipocalcemia.

Causas (de Matos, 2008; Graham, 2016)
Hipocalcemia:
Nutricional
Excesso de fósforo na dieta
Deficiência de cálcio na dieta
Deficiência em vitamina D3
Ovopostura crónica
Pseudo-hipocalcemia:
Hipoalbuminemia
Colheita em tubos com EDTA
Diluição da amostra

Tabela 6: Sinais clínicos de hipocalcemia.

Sinais clínicos (de Matos, 2008; Graham, 2016; Lumeij, 1994; Macwhirter, 2009; Orosz et al., 2015)
Ovos anormais (casca fina, mole e de forma anormal) Distocia Aumento da mortalidade embrionária Fraturas patológicas Fraqueza Ataxia Convulsões Crescimento anormal Paresia secundária a fraturas Paralisia secundária a fraturas Fasciculação muscular

Tabela 7: Diagnóstico de hipocalcemia.

Diagnóstico (Doneley, 2016a; Graham, 2016; Lumeij, 1994)
Historial de má nutrição Ovopostura recorrente Achados no exame físico Exame radiográfico (fraturas patológicas, deformação óssea, desmineralização óssea) Bioquímicas (em particular cálcio total + proteínas totais, cálcio ionizado e PTH)



Figura 3: Radiografia ventrodorsal de uma caturra fêmea adulta com história de anorexia há 7 dias, letargia e prostração. Esta ave tinha uma dieta exclusivamente à base de sementes. A densidade óssea está diminuída de uma forma geral e o rádio e ulna direitos, bem como o tarsometatarso esquerdo, apresentam fraturas patológicas (setas). Os valores plasmáticos de cálcio total nesta ave estavam dentro do intervalo de referência para a espécie (Adaptado de Matos, 2008).

2.7.2. Hipercalcemia

A hipercalcemia (Figura 4), caracteriza-se por uma concentração total de cálcio acima dos valores normais específicos para cada espécie, com sintomatologia como polidipsia e poliúria, fraqueza muscular, náusea, anorexia, arritmias, entre outros. É uma condição raramente reportada em aves, com exceção de casos fisiológicos como é o caso da fase pré-ovulatória, em que os valores de cálcio chegam a 40mg/dl sem que o animal manifeste qualquer sintoma (de Matos, 2008).

Os casos de hipercalcemia patológica em aves estão quase sempre associados a (Tabela 8) uma suplementação excessiva e, portanto, incorreta de cálcio, ou de cálcio mais vitamina D3. Estão descritos casos em avestruzes, galinhas e periquitos em que esta suplementação

excessiva leva a nefrocalcinose ou calcinose difusa (Orosz et al., 2015; Tangredi & Krook, 1999).

Foram descritos em 2003, pela primeira vez, dois casos de síndrome paraneoplásica em papagaios amazonas (*Amazona aestiva* e *Amazona amazonica*) (de Wit, Schoemaker, Kik, & Westerhof, 2003).

O hiperparatireoidismo primário é outra causa comum de hipercalcemia noutros animais, no entanto não foi, até há data, descrito em aves (de Matos, 2008).

Recentemente foi associada hipercalcemia à ingestão acidental de rodenticida (colecálciferol), num bando de aves de um jardim zoológico (Swenson & Bradley, 2013).

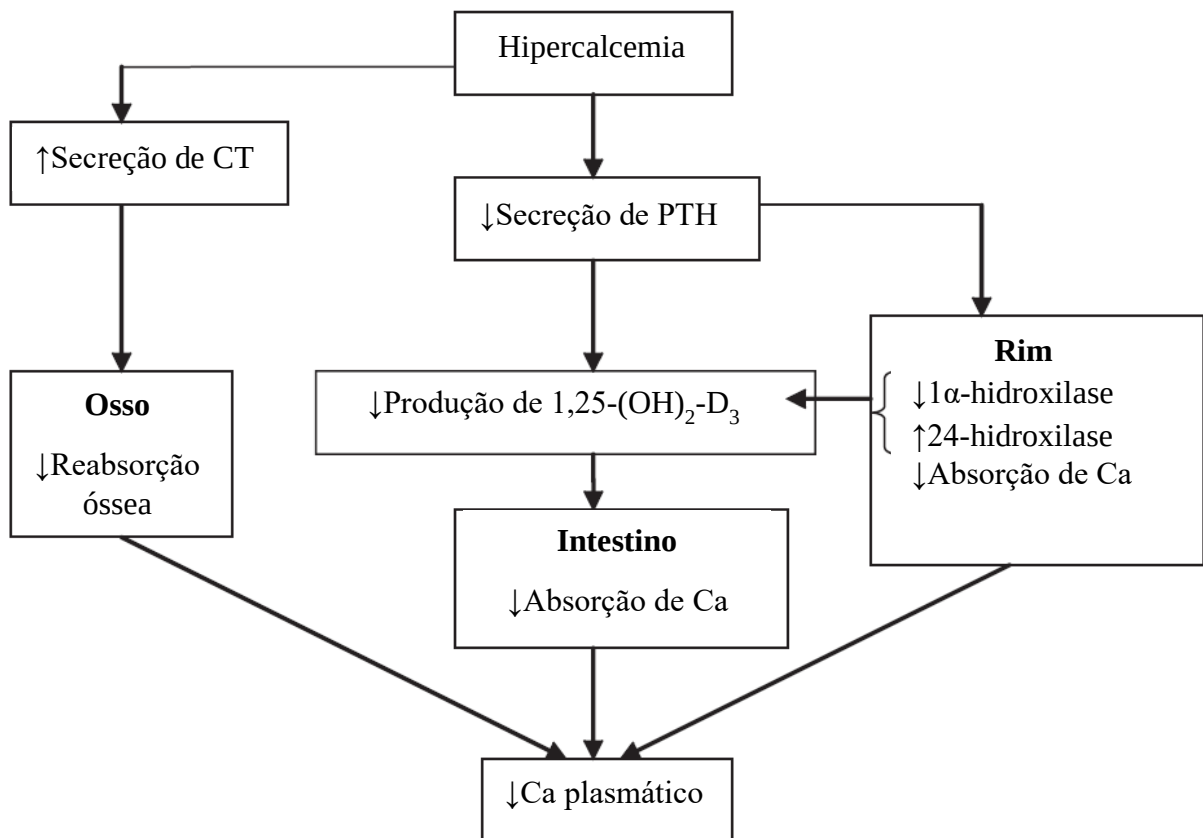


Figura 4: Controlo da hipercalcemia. O cálcio plasmático é reposto através do aumento da excreção renal, diminuição da absorção intestinal e pela diminuição da reabsorção óssea (Adaptado de Matos, 2008). ↑ - Aumento; ↓ - Diminuição.

Tabela 8: Etiologias de hipercalcemia e pseudo-hipercalcemia.

Causas (de Matos, 2008)
Hipercalcemia:
Nutricional
Excesso de cálcio na dieta
Excesso de Vitamina D3 na dieta
Pseudo-hipercalcemia:
Hiperalbuminemia
Lipémia

2.7.3. Hiperparatiroidismo

O hiperparatiroidismo é uma doença que se caracteriza pela hiperfunção das glândulas paratiroides levando a um excesso de produção de PTH. Pode ser classificado como primário, secundário ou terciário, consoante a origem do problema (Macwhirter, 2009; Orosz et al., 2015). O hiperparatiroidismo primário está geralmente associado a neoplasias como adenomas ou carcinomas da paratiroide ou defeitos genéticos e não foi até à data descrito em aves. No entanto, as neoplasias na paratiroide já foram descritas várias vezes em aves, pelo que será apenas uma questão de tempo até que sejam reportados casos de hiperparatiroidismo primário (Lumeij, 1994; Orosz et al., 2015).

O hiperparatiroidismo secundário está associado a uma resposta normal da paratiroide à presença de valores de cálcio sanguíneo alterados (Diamond, T; Blackburn, 2007).

Nas aves a forma mais comum desta doença é o hiperparatiroidismo nutricional secundário, sendo que a segunda possível causa seria por doença renal, algo que não foi ainda reportado em nenhuma ave (Rae, 2000).

O hiperparatiroidismo nutricional secundário ou doença óssea metabólica, derivada de uma dieta deficiente em cálcio, Vitamina D3, fósforo, rácio cálcio:fósforo desadequado e/ou falta de acesso a radiação solar direta, é geralmente uma suspeita, quando na presença do seu quadro clínico típico, nomeadamente deficiências nutricionais (alimentação à base de sementes), anomalias radiográficas (fraturas patológicas, baixa densidade óssea e deformidades) e um

quadro de hipocalcemia (fraqueza, sinais neurológicos como convulsões, distocia, etc (Graham, 2016), que nem sempre vem acompanhado de valores séricos de cálcio baixos, a maioria das vezes estes valores serão normais ou altos até (Stanford, 2005a).

O modo mais eficaz de diagnosticar esta doença será a determinação dos valores sanguíneos de PTH, de cálcio ionizado e até mesmo de vitamina D3 (Norman, 1987).

O hiperparatireoidismo terciário, não está reportado em aves, mas em humanos está associado à cronicidade de um hiperparatireoidismo secundário, que leva a hiperplasia e hiperfunção da glândula paratireoide (de Matos, 2008; Lumeij, 1994; Rae, 2000).

2.7.4. Hipoparatiroidismo

O hipoparatiroidismo acontece quando a glândula paratireoide não tem capacidade de secretar paratormona em quantidade suficiente, ou quando a paratormona não consegue interagir adequadamente com os seus recetores (Stanford, 2005b). É caracterizada por baixos níveis sanguíneos de cálcio, baixos níveis de PTH e aumento da excitabilidade neuromuscular e tetania. Embora seja uma doença rara, já foram reportados alguns casos em gatos após tireoidectomia, possivelmente pela remoção acidental de uma porção da paratireoide, e em cães com suspeita de doença imunomediada, no entanto não existe nenhum caso reportado em aves (Rosol *et al.*, 1995).

2.8. Nutrição de aves em cativeiro

Na alimentação destes animais, o cálcio encontra-se tipicamente em baixos valores nas misturas tradicionais de sementes, ao contrário das rações comerciais que apresentam valores mais elevados de cálcio, e que são geralmente suplementadas com vitamina D3. Estudos sugerem que as rações comerciais têm um elevado impacto nos níveis séricos de cálcio ionizado, cálcio total e colecalciferol em papagaios cinzentos (Stanford, 2005b). A deficiência em cálcio e vitamina D3 ou um rácio cálcio:fósforo inadequado na alimentação, assim como exposição solar insuficiente verificam-se frequentemente em aves com hipocalcemia (Harcourt-Brown, 2009a).

2.8.1. Sementes versus ração

A alimentação à base de sementes, antigamente, e por vezes ainda atualmente, comercializada como ideal para aves de cativeiro, é rica em gordura, e baixíssima em cálcio, iodo, vitaminas e proteínas (Brue, 1994). A médio/longo prazo, o consumo exclusivo destes alimentos provoca deficiências nutricionais e vitamínicas graves. Esta dieta, foi defendida durante anos por ser considerada, muito próxima do que os animais consumiriam na natureza, no entanto, não só esta afirmação não é totalmente verdadeira, pois os psitacídeos em estado selvagem têm uma alimentação muito variada, como vegetais, frutas, frutos secos, alguns invertebrados e até mesmo carne de outros animais, como também, não tem em conta o nível de atividade muitíssimo mais elevado e portanto maior gasto energético, que estes animais têm em estado selvagem (Harcourt-Brown, 2009b).

Além disto, o consumo de sementes diretamente do solo, “obriga” ao consumo accidental ou não de terra, restos de animais e restos de plantas, que trazem um aporte nutricional interessante a estes animais (Doneley, 2016b).

Nos anos mais recentes, as rações comerciais têm vindo a ganhar espaço de mercado. Estas rações têm um valor nutricional mais adequado, podendo ser com “grãos” de igual cor e forma, não permitindo a diferenciação por parte do animal dos alimentos que prefere, ou ser em formato de “muesli”, que permite a escolha por parte do animal, mas que geralmente está ligada ao consumo apenas dos alimentos com menos interesse nutricional mas altamente palatáveis (Doneley, 2016b). Estas novas formas de alimentação, se de marcas com qualidade, têm

benefícios nutricionais elevados, no entanto, devem ser acompanhadas de vegetais e frutas variados, tanto por estes suprirem eventuais faltas vitamínicas/nutricionais, como pela estimulação e saúde mental do animal (Brue, 1994; Harcourt-Brown, 2009b).

2.8.2 Rácio cálcio:fósforo

O cálcio e o fósforo são os principais constituintes minerais do corpo animal, existindo nas estruturas ósseas onde se encontram em maior quantidade, respetivamente 99% e 80% (Baggio & Pita, 2013) sobre a forma de hidroxiapatite (Stanford, 2005b), mas também nos dentes e tecidos moles. Estes minerais participam nas funções vitais, no equilíbrio ácido-base e nos sistemas enzimáticos, contração muscular e funcionamento do tecido nervoso, sendo também os principais constituintes da casca do ovo (Velasco *et al.*, 2016). Quando estes minerais não se encontram em equilíbrio, tanto o excesso como a deficiência têm um efeito marcante sobre a homeostasia. O excesso de cálcio, bem como o de fósforo, leva à formação de fosfato de cálcio insolúvel no sistema digestivo, levando à indisponibilidade do mineral em menor quantidade (Baggio & Pita, 2013). A deficiência de cálcio por deficiência na dieta, suplementação inadequada de Vitamina D3 ou excesso de fósforo na dieta, dá origem a um hiperparatiroidismo nutricional secundário (de Matos, 2008; Stanford, 2005b), ao passo que, a deficiência em fósforo leva a alterações no metabolismo de hidratos de carbono, gordura e aminoácidos, bem como, nos processos químicos sanguíneos, crescimento ósseo e ao nível do transporte de ácidos gordos e outros lípidos (Velasco *et al.*, 2016; Zhang, He, Li, Hu, & Piao, 2019). O rácio cálcio:fósforo considerado ideal na dieta é de 2:1, tal como no osso. Dietas formuladas à base de sementes frequentemente apresentam rácios baixos como de 1:10. Muitas frutas, frutos secos, bem como a maioria dos vegetais são deficientes em cálcio e/ou contêm excesso de fósforo (Doneley, 2016b; Macwhirter, 2009).

2.9. *Nymphicus hollandicus* – Caracterização da espécie

A caturra (*Nymphicus hollandicus*) (Figura 5) é uma ave psitaciforme nativa da Austrália e o mais pequeno membro da família das Catatuas (*Cacatuidae*). Esta ave recebeu, no século XIX, o seu nome comum “cockatiel” em inglês, sendo este uma adaptação das expressões holandesa e portuguesa para “pequena catatua”, dado por Jamrach, um comerciante e amante de aves.

Esta espécie apresenta uma esperança média de vida de 15 anos e um peso médio de 90g. Originalmente tem o corpo cinza, rosáceas cor de laranja nas bochechas, uma cauda comprida e uma distinta crista tanto em machos como fêmeas. Possui dimorfismo sexual tendo o macho mais amarelo na zona da cabeça e na crista, e a fêmea apresentando um padrão com barras nas penas (Harcourt-Brown, 2009b). Existem outras mutações nas quais não é possível fazer a distinção sem recorrer a uma sexagem por DNA (Harcourt-Brown, 2009a).

Esta é uma espécie que nasce dependente dos pais e de olhos fechados sendo por isso considerada uma espécie altricial (Roudybush & Grau, 1991). Na natureza, as caturras alimentam-se de sementes de gramíneas, frutas, bagas e culturas de grãos. Contudo, em cativeiro, alimentam-se de misturas de sementes não formuladas para a espécie ou de rações comerciais (Brue, 1994; Harcourt-Brown, 2009b).

Estudos têm vindo a revelar que possuem requisitos nutricionais específicos e respostas diferentes às das aves de capoeira tao extensamente estudadas e das quais, ainda hoje, se extrapola muita informação (Macwhirter, 2009).

São fantásticas reprodutoras pondo em média 4-7 ovos por postura, o que pode revelar-se um problema no cativeiro, devido à sua propensão para a hipocalcemia (Harcourt-brown & Chitty, 2005).

Estas são aves cada vez mais comuns de serem mantidas como animal de estimação nos dias de hoje, devido à sua beleza, natureza alegre e social, bem como à sua capacidade de mímica (Harcourt-Brown, 2009b).



COCKATIEL, or PARRAKEET COCKATOO.
(*Nymphicus Nova Hollandia*.)

Figura 5: Desenho ilustrativo de uma Caturra (*Nymphicus hollandicus*) (Ilustração de C. W. Gedney, 1877).

2.10. Objetivos

Este trabalho tem como finalidade caracterizar o impacto da exposição solar nos níveis séricos de cálcio ionizado em caturras (*Nymphicus hollandicus*), uma das espécies de aves mais escolhidas como animal de companhia em todo o mundo. A compreensão do impacto do manejo nas aves é essencial, uma vez que permite determinar as necessidades específicas desta espécie e desenvolver métodos que permitam reduzir as consequências da hipocalcemia na população de caturras.

Com os resultados deste trabalho pretende-se obter informação relevante para diferentes intervenientes na prática da clínica veterinária de animais exóticos, sejam médicos veterinários, criadores ou tutores, no que diz respeito à exposição solar a que estas aves estão sujeitas bem como em relação à sua alimentação, podendo assim melhorar as técnicas de manejo de caturras.

Estes resultados podem também ser úteis para definir um intervalo de referência para o cálcio ionizado, preenchendo assim uma lacuna que existe na medicina de aves e providenciando um parâmetro de elevado valor diagnóstico.

Não foi, até à data, explorada a relação entre a radiação UVB e os valores séricos de cálcio ionizado, nem tão pouco definido um intervalo de referência para esse parâmetro na espécie em estudo. A alimentação, exposição a radiação UVB e a suplementação de cálcio e Vitamina D3 na dieta foram, no entanto, extensamente estudadas em aves de produção. Contudo, são escassos os estudos noutras espécies, nomeadamente em psitacídeos em que o foco tem sido, até à data, apenas no papagaio cinzento.

3. Material e métodos

O projeto teve lugar em Portugal, na zona norte e zona centro, entre Outubro de 2018 e Setembro de 2019. Neste período foram aplicados questionários escritos, durante o momento da consulta/visita ao domicílio (no caso de criadores/coleccionadores), através da clínica veterinária de exóticos EXOTICVETS[®], com a finalidade de caracterizar o manejo a que a ave era submetida relativamente à exposição solar, de modo a classificar as aves, consoante habitassem um espaço interior sem acesso a luz solar direta ou exterior com acesso a luz solar direta.

As amostras sanguíneas foram colhidas na clínica ou hospital veterinário durante o momento da consulta ou através de criadores, em colheitas ao domicílio. Foram selecionados 60 indivíduos da espécie *Nymphicus hollandicus*, 30 machos e 30 fêmeas de plumagem completa, com uma dieta à base de mistura de sementes, que não apresentaram sinais clínicos compatíveis com patologias associadas ao cálcio, nomeadamente fraturas, astenia ou quadros neurológicos.

A presença de 1 ou mais sinais clínicos conduziu à eliminação do animal em estudo. Foram também excluídas do estudo fêmeas em fase reprodutiva.

Não foi realizada nenhuma colheita de sangue para o propósito exclusivo do estudo, tendo sido apenas aproveitada uma quantidade em cada colheita com consentimento dos proprietários.

As colheitas foram realizadas por punção da veia jugular e foram recolhidos 0,2 ml de sangue para um tubo pediátrico de Lítio Heparina para medição laboratorial de cálcio ionizado.

Cada amostra foi armazenada a baixas temperaturas e processada logo após a colheita pelo laboratório DNAtch em Lisboa e no Porto, utilizando a técnica de potenciometria com eletrodo seletivo de iões (ISE) na máquina Cobas[®] 9180 *Electrolyte Analyser* da Roche.

Os 60 animais em estudo foram divididos equitativamente em dois grupos, de acordo com a exposição solar da qual beneficiavam. Os grupos foram denominados indoor e outdoor. Foram considerados ‘indoor’ todos os animais não expostos a luz solar direta e ‘outdoor’ todos os animais expostos a luz solar direta (sem interferência de vidro, acrílico ou qualquer outro material). Foi também feita uma divisão por género, sendo que o grupo indoor englobava 16 machos e 14 fêmeas, e o grupo outdoor integrava 14 machos e 16 fêmeas.

Os dados foram armazenados no programa informático Microsoft[®] EXCEL, e foram analisados estatisticamente através dos programas de estatística IBM SPSS[®] e MEDCALC[®].

Os intervalos de referência para o cálcio ionizado na espécie *Nymphicus hollandicus* foram determinados segundo as ‘guidelines’ da Sociedade Americana de patologia clínica veterinária (ASVCP, do inglês “American Society for Veterinary Clinical Pathology”).

3.1. Análise estatística

Para efeitos de análise estatística foram utilizados os *softwares* IBM SPSS® e MEDCALC®.

Para realização da análise inferencial relativamente aos intervalos de confiança de cada grupo e para o total da amostra, e tendo em consideração o cumprimento dos critérios necessários para a realização de testes paramétricos (Marôco, 2018), nomeadamente o tamanho de cada amostra foram realizados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk (Tabela 10) e Kolmogorov-Smirnov (Tabela 16).

De seguida, foi utilizado o teste paramétrico t-Student (Tabela 11 e Tabela 17) para uma amostra, que testa se existe uma diferença significativa entre a média populacional observada e a média estimada obtida a partir de uma amostra aleatória (Marôco, 2018). Desta forma, pretendeu-se confirmar que qualquer diferença obtida se deve apenas ao acaso, e que a amostra em questão é estatisticamente relevante.

Para a comparação de [iCa] (mmol/L) entre grupos, foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes, que testa se as médias de duas populações são ou não significativamente diferentes (Tabela 12, Tabela 13 e Tabela 14).

Para determinação do intervalo de referência para o parâmetro laboratorial cálcio ionizado em Caturras, foi utilizado, seguindo as ‘guidelines’ ASVCP, o método robusto.

Realizou-se a partição da amostra e utilizou-se para determinação de intervalos de referência para os grupos Indoor e Outdoor, seguindo as guidelines ASVCP o método paramétrico.

Foi calculado o grau de imprecisão para cada intervalo de referência obtido, seguindo as normas da ASVCP (amplitude IC / amplitude IR < 0,2).

4. Resultados

Da amostra total inicial (n=60) animais, foram eliminados 7 valores extremos (Indoor=3 e Outdoor=4) relativamente a [iCa] (mmol/L). Desta forma, a análise dos resultados de [iCa] (mmol/L) será relativa a um total de (n=53 animais). Relativamente ao sexo, depois de retirados os valores extremos, a amostra será relativa a (n=26) machos, sendo (n=14) Indoor e (n=12) Outdoor, e (n=27) fêmeas, sendo (n=13) Indoor e (n=14) Outdoor.

Na análise descritiva da variável [iCa] (mmol/L) (Tabela 9), no contexto Indoor, os animais apresentaram um mínimo de 1,34 (mmol/L), máximo 1,57 (mmol/L), média 1,47 (mmol/L) e desvio-padrão 0,06; no contexto Outdoor, os animais apresentaram um mínimo de 1,34 (mmol/L), máximo 1,77 (mmol/L), média 1,51 (mmol/L) e desvio-padrão 0,10.

Tabela 9: Distribuição de [iCa] (mmol/L), por grupo.

[iCa] (mmol/L)		Indoor (n=27)		Outdoor (n=26)	
		Estatística	Erro padrão	Estatística	Erro padrão
Média		1,47	0,01	1,51	0,02
95% Intervalo de confiança	Limite inferior	1,44		1,47	
	Limite superior	1,49		1,55	
Mediana		1,47		1,51	
Variância		0,00		0,01	
Desvio Padrão		0,06		0,1	
Mínimo		1,34		1,34	
Máximo		1,57		1,77	
Amplitude		0,23		0,43	
Amplitude interquartil		0,09		0,12	
Assimetria		-0,39	0,45	0,8	0,46
Curtose		-0,29	0,87	1,08	0,89

Para realização da análise inferencial relativamente aos intervalos de confiança de cada grupo, e tendo em consideração o cumprimento dos critérios necessários para a realização de testes paramétricos, nomeadamente o tamanho reduzido de cada amostra e a significância do teste da normalidade de Shapiro-Wilk (Tabela 10), cuja Hipótese Nula (H0) é que os dados estão normalmente distribuídos, e dado que o resultado do p-value foi ($p > 0,05$) para a variável em estudo [iCa] (mmol/L), aceita-se a Hipótese Nula (H0) e assume-se que as duas amostras têm uma distribuição normal.

De forma a melhorar a precisão do Intervalo de Confiança, para se considerar que a variável [iCa] (mmol/L), em cada amostra, tem uma distribuição normal, foi considerada uma significância $p > 0,200$ para o teste de Shapiro-Wilk.

Tabela 10: Teste de normalidade.

		Shapiro-Wilk			Sig.
		Sig.	Estatística	gl	
[iCa] (mmol/L)	Indoor	,200*	0,958	27	0,329
	Outdoor	,200*	0,956	26	0,317

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

Foi utilizado o teste paramétrico t-Student (Tabela 11) para uma amostra, que testa se existe uma diferença significativa entre a média populacional observada e a média estimada obtida a partir de uma amostra aleatória.

O Intervalo de confiança para a média sugere um intervalo de confiança para uma média da população, utilizando uma distribuição normal. O intervalo de confiança inclui 95% das possíveis médias de amostras da população.

Desta forma, e tendo em consideração o valor de significância do teste-t para a amostra Indoor ($p=0,000$), a média na amostra observada foi 1,47 (mmol/L), podemos afirmar com 95% de confiança que a média na população está no intervalo entre 1,44 (mmol/L) e 1,49 (mmol/L); e para a amostra Outdoor ($p=0,000$), a média na amostra observada foi 1,51 (mmol/L), podemos afirmar com 95% de confiança que a média na população está no intervalo entre 1,47 (mmol/L) e 1,55 (mmol/L).

Tabela 11: Teste de uma amostra.

Teste de uma amostra							
Grupo		Valor de Teste = 0		Sig. (bilateral)	Diferença média	95% Intervalo de Confiança da Dif.	
		t	gl			Inferior	Superior
Indoor	[iCa] (mmol/L)	120,408	26	0,000	1,47	1,44	1,49
Outdoor	[iCa] (mmol/L)	79,328	25	0,000	1,51	1,47	1,55

Da comparação de [iCa] (mmol/L) entre os grupos (Indoor e Outdoor), foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes, que testa se as médias de duas populações são ou não significativamente diferentes (Tabela 12), cujos resultados indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p=0,036$) entre os grupos, onde a média foi superior no contexto Outdoor.

Tabela 12: Comparação de [iCa] (mmol/L) entre os grupos (Indoor e Outdoor).

	Indoor (n=27)		Outdoor (n=26)		dif.	<i>p</i>
	média	dp	média	dp		
[iCa] (mmol/L)	1,47	0,84	1,51	0,79	0,04	0,036

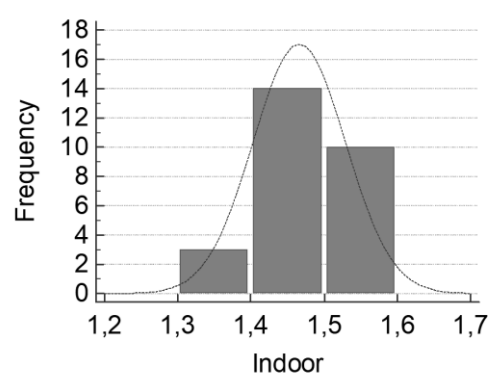


Gráfico 3: Histograma, animais *Indoor*.

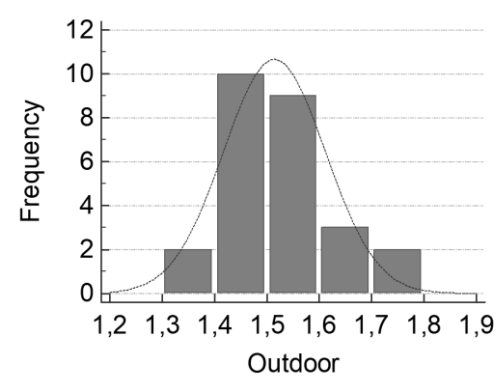


Gráfico 4: Histograma, animais *Outdoor*.

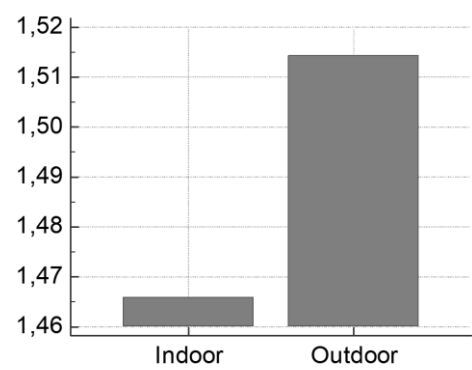


Gráfico 5: Gráfico de barras, comparativo das médias das populações indoor e outdoor.

Da comparação de [iCa] (mmol/L) entre os grupos (Indoor e Outdoor), por sexo, foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes, que testa se as médias de duas populações são ou não significativamente diferentes (Tabela 13), cujos resultados indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p=0,015$) no sexo masculino, onde a média foi superior no contexto Outdoor.

Tabela 13: Comparação de [iCa] (mmol/L) entre os grupos (Indoor e Outdoor), por sexo.

		Indoor (n=27)		Outdoor (n=26)		dif.	p
		média	dp	média	dp		
Masculino	[iCa] (mmol/L)	1,48	0,06	1,57	0,10	0,09	0,015
Feminino	[iCa] (mmol/L)	1,45	0,06	1,47	0,07	0,02	0,471

Da comparação de [iCa] (mmol/L) entre o sexo, por grupo (Indoor e Outdoor), foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes (Tabela 14) cujos resultados indicam a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p=0,009$) no contexto Outdoor, entre o sexo, onde a média foi superior no sexo masculino.

Tabela 14: Comparação de [iCa] (mmol/L) entre o sexo, por grupo (Indoor e Outdoor).

		Masculino		Feminino		dif.	p
		média	dp	média	dp		
Indoor (n=27)	[iCa] (mmol/L)	1,48	0,06	1,45	0,06	0,03	0,263
Outdoor (n=26)	[iCa] (mmol/L)	1,57	0,10	1,47	0,07	0,10	0,009

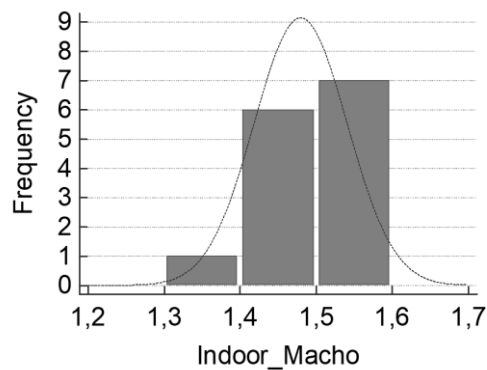


Gráfico 6: Histograma, animais *Indoor*, sexo masculino.

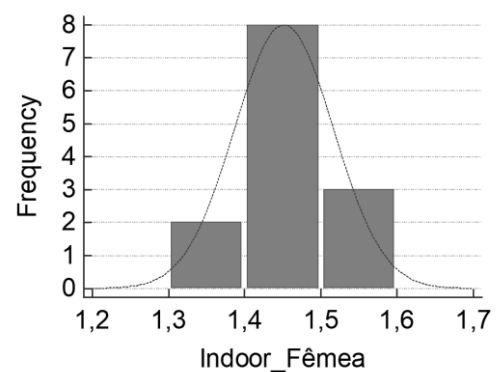


Gráfico 7: Histograma, animais *Indoor*, sexo feminino.

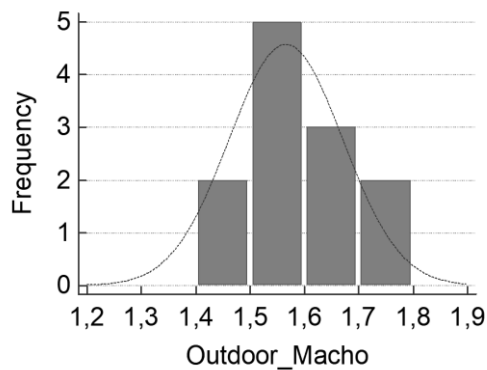


Gráfico 8: Histograma, animais *Outdoor*, sexo masculino.

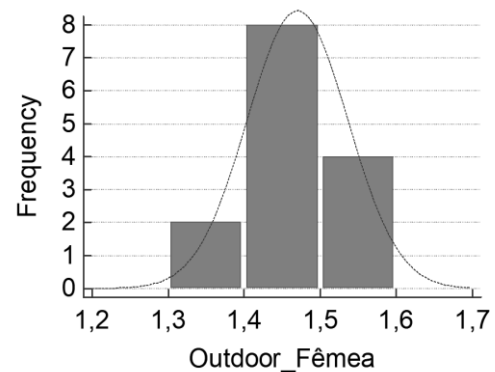


Gráfico 9: Histograma, animais *Outdoor*, sexo feminino.

Na tabela da análise descritiva da variável [iCa] (mmol/L) para o total da amostra (Tabela 15), os animais apresentaram um mínimo de 1,47 (mmol/L), máximo 1,51 (mmol/L), média 1,49 (mmol/L) e desvio-padrão 0,08.

Tabela 15: Distribuição de [iCa] (mmol/L) para o total da amostra (n=53).

[iCa] (mmol/L)		Total (n=53)	
		Estatística	Erro padrão
Média		1,49	0,01
95% Intervalo de confiança	Limite inferior	1,47	
	Limite superior	1,51	
Mediana		1,48	
Variância		0,01	
Desvio Padrão		0,09	
Mínimo		1,34	
Máximo		1,77	
Amplitude		0,43	
Amplitude interquartil		0,1	
Assimetria		0,82	0,33
Curtose		1,911	0,64

Para realização da análise inferencial relativamente ao intervalo de confiança do total do grupo, e tendo em consideração o cumprimento dos critérios necessários para a realização de testes paramétricos, nomeadamente o tamanho da amostra (>50) e a significância do teste da normalidade de Kolmogorov-Smirnov (Tabela 16), cuja Hipótese Nula (H0) é que os dados estão normalmente distribuídos, e dado que o resultado do p-value foi ($p > 0,05$) para a variável em estudo [iCa] (mmol/L), aceita-se a Hipótese Nula (H0) e assume-se que a amostra têm uma distribuição normal.

De forma a melhorar a precisão do Intervalo de Confiança, para se considerar que a variável [iCa] (mmol/L), em cada amostra, tem uma distribuição normal, foi considerada uma significância $p > 0,200$ para o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Tabela 16: Teste de normalidade para o total da amostra.

Kolmogorov-Smirnov ^a			
	Estatística	gl	Sig.
[iCa] (mmol/L)	,087	53	,200*

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Foi utilizado o teste paramétrico t-Student (Tabela 17) para uma amostra, que testa se existe uma diferença significativa entre a média populacional observada e a média estimada obtida a partir de uma amostra aleatória.

O Intervalo de confiança para a média sugere um intervalo de confiança para uma média da população, utilizando uma distribuição normal. O intervalo de confiança inclui 95% das possíveis médias de amostras da população.

Desta forma, e tendo em consideração o valor de significância do teste-t para uma amostra ($p=0,000$), a média na amostra observada foi 1,49 (mmol/L), podemos afirmar com 95% de confiança que a média na população está no intervalo entre 1,47 (mmol/L) e 1,51 (mmol/L).

Tabela 17: Teste de uma amostra ($n=53$).

Valor de Teste = 0						
			Sig.	Diferença	95% Intervalo de Confiança	
	t	gl	(bilateral)	média	Inferior	Superior
[iCa] (mmol/L)	128,252	52	,000	1,48962	1,4663	1,5129

Para determinação do intervalo de referência para [iCa] (mmol/L) foi utilizado, de acordo com o tamanho da amostra e seguindo as ‘guidelines’ da ASVCP, o método robusto (Tabela 18 e Tabela 21), e foi calculada a imprecisão do mesmo para os limites inferior e superior (Friedrichs *et al.*, 2012).

Tabela 18: Intervalo de referência de [iCa] (mmol/L) em *Nymphicus hollandicus*, para 95% da população, determinado seguindo as ‘guidelines’ da American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).

Método Robusto	
Limite inferior	1,3093
90% IC	1,2691 a 1,3541
Limite superior	1,6535
90% IC	1,6116 a 1,6910

Imprecisão (Limite inferior) = **0,25**

Imprecisão (Limite superior) = **0,23**

Uma vez que o rácio dos desvios padrão do grupos Indoor e Outdoor é superior a 1,5 (R=1,67) é recomendado realizar a partição da amostra (Lahti, Hyltoft Petersen, Boyd, Fraser, & Jørgensen, 2002).

Sendo que, devido à partição, o tamanho de cada amostra diminuiu e mantendo-se a gaussianidade, seguindo as 'guidelines' da ASVCP, o método utilizado para a determinação de um intervalo de referência para cada grupo (Tabela 19, Tabela 20 e Tabela 21), foi o método paramétrico (Friedrichs *et al.*, 2012).

Foi calculada a imprecisão de ambos os intervalos para os limites inferior e superior (Friedrichs *et al.*, 2012).

Tabela 19: Intervalo de referência de [iCa] (mmol/L) em *Nymphicus hollandicus*, para 95% da população 'indoor', determinado seguindo as guidelines da American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).

Método baseado numa distribuição normal	
Limite inferior	1,3419
90% IC	1,3068 a 1,3771
Limite superior	1,5899
90% IC	1,5548 a 1,6250

Imprecisão (Limite inferior) = **0,28**

Imprecisão (Limite superior) = **0,28**

Tabela 20: Intervalo de referência de [iCa] (mmol/L) em *Nymphicus hollandicus*, para 95% da população 'outdoor', determinado seguindo as guidelines da American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP).

Método baseado numa distribuição normal	
Limite inferior	1,3235
90% IC	1,2684 a 1,3786
Limite superior	1,7050
90% IC	1,6499 a 1,7601

Imprecisão (Limite inferior) = **0,29**

Imprecisão (Limite superior) = **0,29**

Tabela 21: Intervalos de referência para [iCa] (mmol/L) em *Nymphicus hollandicus*.

	Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>)		
	Geral	Animais Indoor	Animais Outdoor
Cálcio ionizado (mmol/L)	[1,31 – 1,65]	[1,34 – 1,59]	[1,32 – 1,71]

5. Discussão

As diferenças entre os valores séricos de cálcio ionizado entre os animais do grupo indoor e do grupo outdoor são significativas (Tabela 12), tendo os animais expostos a radiação solar direta apresentado valores de cálcio ionizado significativamente superiores (Gráfico 3, Gráfico 4 e Gráfico 5). Este resultado vai ao encontro do que o estudo pretendia demonstrar e está de acordo com a literatura existente para outras espécies (Stanford, 2005b).

Dentro do grupo indoor, os machos apresentaram valores mais altos do que as fêmeas. O mesmo foi verificado para o grupo outdoor (Tabela 13). É possível que estes resultados advenham do facto da colheita não ter sido realizada durante a época reprodutiva, em que seria espectável que as fêmeas apresentassem valores mais altos que os machos (Gráfico 6, Gráfico 7, Gráfico 8 e Gráfico 9).

Ambos os géneros apresentaram valores mais altos no contexto outdoor (Tabela 14), demonstrando que tanto machos como fêmeas beneficiam expressamente da exposição à radiação UVB.

Os resultados deste estudo vieram confirmar a importância da radiação UVB na absorção do cálcio, já estudada em aves de produção, mas escassamente caracterizada em aves de companhia, nomeadamente em psitacídeos e foi possível, pela primeira vez, a criação de um intervalo de referência geral de cálcio ionizado para a espécie *Nymphicus hollandicus*, bem como, pela sua utilidade clínica, outros dois intervalos para Caturras ‘indoor’ e ‘outdoor’, que podem ser utilizados por médicos veterinários em todo o mundo.

A ASVCP sugere a realização do cálculo (amplitude IC / amplitude IR < 0,2) para estimar a imprecisão dos intervalos de referência e, portanto, determinar se existe necessidade de aumentar a amostra. Este cálculo foi realizado para os três intervalos de referência obtidos, resultando em todos os casos num valor superior ao desejado (<0,2), sugerindo a necessidade da recolha de mais amostras.

Este estudo é um dos poucos a propor um intervalo de referência para o cálcio ionizado em aves, e o único a subdividir o intervalo para os diferentes tipos de manejo.

Teria sido interessante analisar em conjunto outros parâmetros laboratoriais como o colecalciferol, o cálcio total, a PTH e a albumina, bem como incluir outro grupo de animais alimentados à base de rações comerciais de qualidade, aumentando a amostra total e acrescentando valor ao intervalo de referência. Tal não foi possível devido ao pequeno volume das amostras de sangue e pelas limitações financeiras associadas a este estudo.

Muito do que se pensa sobre psitacídeos foi extrapolado ao longo dos anos a partir dos inúmeros estudos realizados em aves de produção que para além de serem muito afastadas filogeneticamente dos psitacídeos pertencendo a ordens diferentes, pelo seu propósito comercial têm naturalmente necessidades particulares. Por este motivo, estudos como este são importantes no sentido de adquirir conhecimento sobre estas aves, tendo em conta que cada espécie tem as suas particularidades, e no sentido de criar mais ferramentas de diagnóstico para uma área da Medicina Veterinária em crescimento.

6. Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos, podemos concluir que a exposição à radiação UVB tem uma influência importante na absorção de cálcio nas caturras. Esta prática parece ser essencial à manutenção da calcemia e, portanto, de extrema importância para a conservação da homeostase e da saúde geral.

Em termos de manejo, conclui-se que as aves ‘indoor’ devem beneficiar de períodos de exposição solar direta, numa varanda ou junto a uma janela aberta. Atualmente já se pratica o uso de lâmpadas UVB em aves de companhia, à semelhança do que acontece com os répteis. Esta pode ser também uma opção para alguns indivíduos.

Os resultados deste estudo foram satisfatórios e foram ao encontro dos objetivos e do que está descrito na literatura em outras espécies de aves. No entanto devido à sua pequena dimensão, o presente estudo abre portas para uma continuação, possivelmente no sentido na comparação de diferentes alimentações com e sem suplementação de cálcio e colecalciferol, na comparação com diferentes estações do ano e até mesmo em diferentes zonas do globo, e também na exploração de outros parâmetros relacionados com a regulação do cálcio.

Em relação aos intervalos de referência propostos, a continuação e melhoramento passa por replicar o estudo com mais indivíduos e comparar os valores obtidos.

7. Bibliografia

- Baggio, R. J., & Pita, M. C. G. (2013). The calcium and phosphorus importance in the nutrition of psittaciforms and passerine birds - a review. *PUBVET*, 7(19).
- Bar, A. (2008). Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(4), 477–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.006>
- Beck, M. M., & Hansen, K. K. (2004). Role of estrogen in avian osteoporosis. *Poultry Science*, 83(2), 200–206. <https://doi.org/10.1093/ps/83.2.200>
- Brue, R. N. (1994). Nutrition. In G. J. Harrison & B. W. Ritchie (Eds.), *Avian Medicine: Principles and application* (1st ed., pp. 63–95). WINGERS PUBLISHING, INC.
- Candlish, J. K., & Taylor, T. G. (1970). The response-time to the parathyroid hormone in the laying fowl. *Journal of Endocrinology*, 48(1), 143–144. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0480143>
- Castro, L. C. G. de. (2011). O sistema endocrinológico vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 55(8), 566–575. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000800010>
- Christopher G. Dacke, T. S. and C. V. G. (2015). The Role of Hormones in the Regulation of Bone Turnover and Eggshell Calcification. In C. G. Scanes (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology* (6th ed., pp. 549–575). Elsevier.
- Clark, N. B., & Sasayama, Y. (1981). The role of parathyroid hormone on renal excretion of calcium and phosphate in the Japanese quail. *General and Comparative Endocrinology*, 45(2), 234–241. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(81\)90108-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(81)90108-8)
- Clark, N., Braun, E., & Wideman RF. (1976). Parathyroid hormone and renal excretion of phosphate and calcium in normal starlings. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 231(4), 1152–1158. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.231.4.1152>
- Copp, D.H., Kline, L. . (1989). Calcitonin. In P. K. T. Pang & M. P. Schreibman (Eds.), *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications, Volume 3 Regulation of Calcium and Phosphate* (pp. 79–103). Academic Press.
- de Matos, R. (2008). Calcium Metabolism in Birds. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(1), 59–82. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2007.09.005>
- de Wit, M., Schoemaker, N. J., Kik, M. J. L., & Westerhof, I. (2003). Hypercalcemia in Two Amazon Parrots with Malignant Lymphoma. *Avian Diseases*, 47(1), 223–228.

- [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2003\)047\[0223:HITAPW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0223:HITAPW]2.0.CO;2)
- Diamond, T; Blackburn, M. (2007). Primary hyperparathyroidism and familial hyperparathyroid syndromes. *Australian Family Physician*, 36(12), 1029–1033.
- Doneley, B. (2016a). Clinical Anatomy and Physiology. In B. Doneley (Ed.), *Avian Medicine and Surgery in Practice* (2nd ed., pp. 34–35). CRC Press.
- Doneley, B. (2016b). Husbandry, Grooming and Nutrition. In B. Doneley (Ed.), *Avian Medicine and Surgery in Practice* (2nd ed.). CRC Press.
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>
- Graham, J. E. (2016). Hypocalcemia and Hypomagnesemia. In J. E. Graham (Ed.), *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Avian* (1st ed., pp. 147–149). Wiley-Blackwell.
- Harcourt-brown, N., & Chitty, J. (2005). BSAVA Manual of Psittacine Birds. In J. Chitty & N. H. Harcourt-Brown (Eds.), *BSAVA Manual of Psittacine Birds* (2nd ed.). BSAVA.
- Harcourt-Brown, N. H. (2009a). *Handbook of Avian Medicine* (2nd ed.; J. E. C. Thomas N. Tully, Gerry M. Dorrestein, Alan K. Jones, ed.). Saunders.
- Harcourt-Brown, N. H. (2009b). Psittacine birds. In J. E. C. Thomas N. Tully, Gerry M. Dorrestein, Alan K. Jones (Ed.), *Handbook of avian Medicine* (2nd ed., pp. 112–143). Saunders.
- Hawkins, M. G., Barron, H. W., Speer, B. L., Pollock, C., & Carpenter, J. (2012). Exotic Animal Formulary. In J. Carpenter & C. Marion (Eds.), *Exotic Animal Formulary* (4th ed.). Saunders.
- Howard, L. L., Kass, P. H., Lamberski, N., & Wack, R. F. (2004). Serum concentrations of ionized calcium, vitamin D3, and parathyroid hormone in captive thick-billed parrots (*Rhynchopsitta pachyrhyncha*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35(2), 147–153. <https://doi.org/10.1638/03-062>
- Hurwitz, S. (1989). Parathyroid hormone. In P. K. T. Pang & M. P. Schreibman (Eds.), *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications, Volume 3 Regulation of Calcium and Phosphate* (pp. 45–77). Academic Press.
- Johnston, M. S., & Ivey, E. S. (2002). Parathyroid and ultimobranchial glands: Calcium metabolism in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11(2), 84–93.

<https://doi.org/10.1053/saep.2002.122689>

- Lahti, A., Hyltoft Petersen, P., Boyd, J. C., Fraser, C. G., & Jørgensen, N. (2002). Objective criteria for partitioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clinical Chemistry*, 48(2), 338–352.
- Lasmoles, F., Jullienne, A., Desplan, C., Milhaud, G., & Moukhtar, M. S. (1985). Structure of chicken calcitonin predicted by partial nucleotide sequence of its precursor. *FEBS Letters*, 180(1), 113–116. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80242-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80242-8)
- Lumeij, J. T. (1994). Endocrinology. In G. J. Harrison & B. W. Ritchie (Eds.), *Avian Medicine: Principles and application* (1st ed., pp. 582–606). WINGERS PUBLISHING, INC.
- Macwhirter, P. (2009). Basic anatomy, physiology and nutrition. In J. E. C. Thomas N. Tully, Gerry M. Dorrestein, Alan K. Jones (Ed.), *Handbook of avian Medicine* (2nd ed., pp. 1–25). Saunders.
- Marôco, J. (2018). *Análise estatística com o SPSS statistics* (7th ed.; J. Marôco, ed.). Pêro Pinheiro.
- Massengale, O. N., & Nussmeier, M. (1935). The action of activated ergosterol in the chicken. *Journal of Biological Chemistry*, 108, 323–330.
- Norman, A. W. (1987). Studies on the Vitamin D Endocrine System in the Avian Bone Biology. *The Journal of Nutrition*, 117(4), 797–807. <https://doi.org/10.1093/jn/117.4.797>
- Orosz, S. E., Monks, D., & Matos, R. de. (2015). Clinical Endocrinology of the Protein Hormones. In B. L. Speer (Ed.), *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery* (1st ed., pp. 378–399). Saunders.
- Rae, M. (2000). Avian endocrine disorders. In A. M. Fudge (Ed.), *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets* (1st ed.). Saunders.
- Rosol, T. J., Chew, D. J., Nagode, L. A., & Capen, C. C. (1995). Pathophysiology of Calcium Metabolism. *Veterinary Clinical Pathology*, 24(2), 49–63. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1995.tb00937.x>
- Roudybush, T. E., & Grau, C. R. (1991). Cockatiel (*Nymphicus Hollandicus*) Nutrition. *The Journal of Nutrition*, 121(suppl_11), S206–S206. https://doi.org/10.1093/jn/121.suppl_11.S206
- Schaftenaar, W., & van Leeuwen, J. P. T. M. (2015). The influence of ultraviolet-B radiation on the growth of marabou stork (*Leptoptilos crumeniferus*) nestlings in relation to plasma calcium, phosphorus, and vitamin D3 concentrations. *Journal of Zoo and Wildlife*

- Medicine*, 46(4), 682–690. <https://doi.org/10.1638/2014-0031.1>
- Shaw, A. J., Whittaker, G., & Dacke, C. G. (1989). Kinetics of rapid ^{45}Ca uptake into chick skeleton in vivo : Effects of microwave fixation. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 74(6), 907–915. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1989.sp003361>
- Stanford, M. (2005a). Calcium Metabolism. In *Clinical avian medicine Volume I* (1st ed., Vol. 1, pp. 141–151). Spix Publishing.
- Stanford, M. (2005b). *Calcium metabolism in grey parrots : the effects of husbandry*. Royal College of Veterinary Surgeons.
- Stanford, M. (2007). Clinical pathology of hypocalcaemia in adult grey parrots (*Psittacus e erithacus*). *The Veterinary Record*, 161, 456–457.
- Swenson, J., & Bradley, G. A. (2013). Suspected Cholecalciferol Rodenticide Toxicosis in Avian Species at a Zoological Institution. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 27(2), 136–147. <https://doi.org/10.1647/2011-062>
- Tangredi, B. P., & Krook, L. P. (1999). Nutritional Secondary Hyperparathyroidism in Free-Living Fledgling American Crows (*Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30(1), 94–99.
- Tröndle, U., Steinmetz, H. W., Rüegg, S. R., Müller, A., & Liesegang, A. (2018). UV-light and dietary vitamin D and their effects on ionized calcium and 25-OH-D plasma concentrations in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1419–1428. <https://doi.org/10.1111/jpn.12941>
- Vellasco, C. R., Gomes, P. C., Donzele, J. L., Rostagno, H. S., Calderano, A. A., Mello, H. H. de C., & Pastore, S. M. (2016). Níveis de cálcio e relação cálcio: Fósforo em rações para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. *Ciência Animal Brasileira*, 17(2), 206–216. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i226916>
- Watson, M. K., & Mitchell, M. A. (2014). Vitamin D and Ultraviolet B Radiation Considerations for Exotic Pets. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23(4), 369–379. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.08.002>
- Woodhouse, S. J., & Rick, M. (2016). The effect of UVB radiation on serum vitamin D and ionized calcium in the african spoonbill (*Platalea alba*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(2), 447–456. <https://doi.org/10.1638/2014-0239.1>
- Yasuoka, T., Kawashima, M., Takahashi, T., Tatematsu, N., & Tanaka, K. (1998). Calcitonin Receptor Binding Properties in Bone and Kidney of the Chicken During the Oviposition Cycle. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(9), 1412–1419.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.9.1412>

Zhang, L., He, T., Li, M., Hu, J., & Piao, X. (2019). Effects of dietary calcium and phosphorus levels and supplementation of 25-hydroxycholecalciferol on performance and bone properties of broiler starters. *Archives of Animal Nutrition*, 73(6), 445–456. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1667192>