

COMPARACIÓN DE LOS VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN PINGÜINOS *Spheniscus humboldti* (Sphenisciformes: Spheniscidae) SILVESTRES Y EN CAUTIVERIO

Hematological and Blood Biochemical Values in Wild and Captive Penguin Humboldt *Spheniscus humboldti* (Sphenisciformes: Spheniscidae)

Lucila Moreno-Salas¹, Loreto Nilsson-Saéz², Felipe Corvalán², Karen Ardiles-Villegas²,
Victoria Merino-Muñoz², Armando Islas-Letelier² y Daniel González-Acuña^{2*}

¹Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. ²Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile. *danigorz@udec.cl

RESUMEN

El pingüino de Humboldt es una especie endémica de la corriente de Humboldt, considerada una de las especies de pingüinos más amenazadas del planeta. Con el objetivo de comparar los valores hematológicos y bioquímicos de *Spheniscus humboldti* silvestres y cautivos, se extrajo muestras de sangre de 21 individuos mantenidos en zoológicos y 21 individuos silvestres. Se determinó el hematocrito (Ht), número de leucocitos (NL), el conteo diferencial de leucocitos (heterófilos, linfocitos, monocitos y basófilos) y sólidos totales (ST) del hemograma. Se determinaron los siguientes valores bioquímicos sanguíneos: alanina aminotransferasa (ALT), gamma glutamil transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FA), creatina cinasa (CK) y ácido úrico. Se obtuvieron valores significativamente más altos en pingüinos cautivos que silvestres de NL, linfocitos, FA, GGT, LDH (P<0,05), en cambio el número de eosinófilos y el peso corporal fueron menores que en las aves silvestres.

Palabras clave: Bioquímica sanguínea, hematología, pingüino de Humboldt, salud.

ABSTRACT

To compare hematologic and biochemical values of captive and wild Humboldt penguin, blood samples were obtained from 21 captive, and 21 wild Humboldt penguins. The hemato-

logical values studied were: packed cell volume (PCV), solids (TS), white blood cell (WBC) count, heterophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes and basophils. The following biochemical values were determined: alanine amino transferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), creatinkinase (CK) and uric acid. The values of WBC, lymphocytes, enzymes in ALP, GGT, LDH (P<0.05) were significantly higher in captive than wild birds and the eosinophils count and the body weight of birds were higher in wild birds.

Key words: Humboldt penguins, hematology, biochemistry, health.

INTRODUCCIÓN

El pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*, Meyen, 1834) se distribuye a lo largo de las costas de Perú y Chile [26], abarcando 4.500 km de costa, desde Isla Foca (5°12' S) en Perú hasta las islas Penihuil en Chile (42°73' S) [27]. Característico de la corriente de Humboldt [18], el pingüino de Humboldt se encuentra clasificado como vulnerable [13], debido a que sus poblaciones se han reducido considerablemente [6], atribuyéndose principalmente esta disminución a la degradación del hábitat, disturbios humanos, sobrepesca de anchoveta (*Engraulis spp.*) y enmallamiento en redes de pesca [6, 22].

Los análisis hematológicos son considerados unas de las técnicas más sencillas y menos invasivas para evaluar el estado general de salud de aves en poblaciones silvestres y en cautiverio [1, 4]. Sin embargo, cuando se utilizan estos valores como método diagnóstico se debe considerar que, las

aves en cautiverio desarrollan una forma de vida distinta a las aves de vida silvestre [5], realizando una menor actividad física, además, de encontrarse frecuentemente sometidos a estrés debido al mayor contacto con humanos. Por otro lado, los pingüinos silvestres presentan algunos factores que pueden incidir en los resultados hematológicos y bioquímicos, como la frecuente presencia de parásitos, tanto externos como internos [9, 10]. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue comparar los valores hematológicos y bioquímicos de *S. humboldti* silvestres y en cautiverio, esperando encontrar diferencias entre ellos, lo que podría resultar relevante conocer al momento de realizar o evaluar tratamientos en poblaciones, tanto cautivas como silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de 21 ejemplares de pingüino de Humboldt en cautiverio, provenientes de cuatro zoológicos de Chile: Metropolitano de Santiago (n=12; Región Metropolitana; 33°26'16"S 70°39'01"W), Buin (n=5; Región Metropolitana; 33°45'55"S 70°44'32"W) y Quilpue (n=4; Región de Valparaíso; 33°02' 49"S 71°26'38"W), entre noviembre 2007 y abril 2008. De los ejemplares cautivos, siete presentaban ceguera, desconociéndose la causa de ésta. Las muestras de pingüinos de Humboldt silvestres fueron obtenidas de 21 individuos adultos, aparentemente sanos, capturados manualmente en la Reserva Nacional Pan de Azúcar (Región de Atacama; 26°08'59"S 70°39'02"W) en julio 2008. Las capturas se realizaron con la asistencia de guardaparques de la Corporación Nacional Forestal (CONAF) y la autorización del Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA, resolución N° 2984). Las aves se clasificaron en juveniles o adultos de acuerdo a la descripción realizada por Jaramillo [14]. No fue posible diferenciar el sexo de los individuos, debido a que no poseen dimorfismo sexual evidente. El peso de las aves fue registrado con una balanza digital portátil (\pm 1g) (sBoss, M50, Chile).

Las muestras de sangre se obtuvieron con jeringa (23G, 22 mm, Nitro®, Japón) de la vena metatarsal medial (3 mL) y fueron cuidadosamente transferidas a tubos Vacutainer® con heparina de litio (1 mL; Becton, Dickinson & Co. EUA), previa obtención de una gota de sangre para frotis que se realizó en un portaobjeto secado al aire libre, que posteriormente fue fijado con alcohol metílico absoluto por 3 minutos (min) y tinción Giemsa (1/10 v/v) por 30 min. La sangre fue transportada, siguiendo la correspondiente cadena de frío, en una caja refrigerada (4°C), luego de 20 horas las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Chile. Una vez en el laboratorio se procedió a realizar los análisis hematológicos y la sangre restante fue centrifugada a 2500 g por 10 min (Centrifuge DSC 200A-2, Already Interprise Inc., Taiwan, China), para la obtención de plasma. Todos los análisis se realizaron inmediatamente después de obtenido el plasma.

Se determinó el hematocrito (Ht) por centrifugación (Digital micro centrifuge, HS CODE: 993199, Already Enterprise INC, Taiwan, China) en tubos de microhematocrito por 5 min. a 12800 g [3]. Los sólidos totales (ST; g/L) se determinaron por refractometría (Golberg TS Meter Clinical Refractometer, Reichert Analytical Instrument, New York, EUA). El conteo total de leucocitos ($\times 10^9/L$) se determinó manualmente en un hemocitómetro utilizando como diluyente la solución descrita por Rees & Ecker modificado [16]. La fórmula leucocitaria diferencial se determinó mediante la observación de 200 leucocitos en un frotis teñido con Giemsa y se observó al microscopio (Zeiss Primo Star, Carl Zeiss Inc, Oberkochen 73447, Alemania) con el objetivo de inmersión (1000x). La identificación de parásitos sanguíneos se realizó mediante la observación de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa [20].

Para determinar la actividad plasmática de aspartato amino transferasa (AST; U/L), creatina cinasa (CK; U/L), Fosfatasa alcalina (FA, U/L), alanina aminotransferasa (ALT; U/L), gamma glutamiltransferasa (GGT; U/L) y lactato deshidrogenasa (LDH; U/L) se utilizaron reactivos comerciales (Human Diagnostic Worldwide, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración plasmática de ácido úrico (mmol/L) se determinó utilizando un kit comercial (Urea Acid liquicolor test, Human Diagnostic Worldwide, Alemania). Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro (Micro Lab 200 Vital Scientific, Países Bajos). Para todos los análisis se realizaron dos repeticiones por ave.

Con los valores obtenidos se calculó la media aritmética y desviación estándar para los grupos que se estudiaron. La normalidad y homocedasticidad de los datos fue revisado utilizando la prueba de Shapiro-Wilks y de Levene, respectivamente [23]. Se utilizó la prueba de t student para la determinación de diferencias en los valores estudiados y condición de vida del ave [23]. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa JMP9 (SAS Institute, Cary, North Carolina 27513, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se muestran los valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos obtenidos de pingüinos de Humboldt cautivos (zoológicos) y procedentes de ambiente silvestre (Parque Nacional Pan de Azúcar). Se observó que los pingüinos cautivos tienen valores más altos en el conteo total de leucocitos (ts, $P < 0,05$), número de linfocitos (ts, $P < 0,05$) y en las enzimas FA, GGT, LDH (ts, $P < 0,05$). Por otro lado, el número de eosinófilos fue más elevado en pingüinos silvestres (ts, $P < 0,05$) que en cautiverio. De los 21 pingüinos de Humboldt cautivos, 11 correspondieron a adultos y diez a juveniles, entre los cuales no se encontró diferencia estadística significativa (ts, $P > 0,05$) al comparar los valores hematológicos y bioquímicos seleccionados. Siete de estos pingüinos presentaron ceguera, sin embargo los valores hematológico y bioquímicos fueron similares a los ejemplares que no presentaban esta condición en cautiverio (ts, $P > 0,05$). Con respecto al

TABLA I
PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS VALORES
HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS ESTUDIADOS
EN *S. HUMBOLDTI* CAUTIVOS Y SILVESTRES

	Cautivos (n = 21)	Silvestres (n = 21)
	promedio ± DE	promedio ± DE
Valores hematológicos		
Ht (%)	46 ± 8,5	43 ± 9,1
Leucocitos (X10 ⁹ /L) ^{**a}	12,50 ± 4,20	8,36 ± 1,58
Heterófilos (X10 ⁹ /L) ^a	6,7 ± 3,5	5,6 ± 1,2
Linfocitos (X10 ⁹ /L) ^{**a}	4,7 ± 2,2	1,8 ± 0,8
Monocitos (X10 ⁹ /L) ^a	0,68 ± 0,73	0,32 ± 0,29
Eosinófilos (X10 ⁹ /L) ^{**a}	0,28 ± 0,22	0,47 ± 0,26
Basófilos (X10 ⁹ /L) ^a	0,01 ± 0,03	0,005 ± 0,016
Valores bioquímicos		
Sólidos totales (g/L) ^a	58 ± 10	55 ± 9
AST (U/L) ^b	145 ± 76	178 ± 92
CK (U/L) ^b	59 ± 79	47 ± 31
FA (U/L) ^{*b}	113 ± 82	37 ± 15
GGT (U/L) ^{*b}	13 ± 10	3 ± 2
ALT (U/L) ^b	138 ± 32	137 ± 33
LDH (U/L) ^{*b}	732 ± 434	285 ± 172
Ac. úrico (mmol/L) ^a	0,44 ± 0,21	0,43 ± 0,12

* ts, P<0,05. ^ase midió concentración plasmática. ^bActividad enzimática en plasma.

peso, los pingüinos silvestres presentaron mayor peso (4600 g) que los pingüinos en cautiverio (3500 g) (ts, P<0,05). No se encontraron hemoparásitos en el total de los frotis sanguíneos examinados.

Todos los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los intervalos de referencia publicados para *S. humboldti*, tanto silvestres como en cautiverio [21, 25, 26]. Sin embargo, las diferencias encontradas entre aves cautivas y silvestres, podrían estar influenciadas por diversos factores [19]. A pesar de observarse esta diferencia, los valores registrados se encuentran dentro de los intervalos de referencia descritos para esta especie por Villouta y col. [25] en aves en cautiverio y Smith y col. [21] para pingüinos silvestres. Sin embargo, Wallace y col. [27] estudiando pingüinos de Humboldt silvestres (n=51) presentaron intervalos de leucocitos mucho más amplios (intervalo= 13,45 – 47,26 10⁹/L) que lo hallado en este estudio para ambos grupos de aves, aunque el mencionado autor, no entrega datos del estado de salud de los pingüinos analizados.

En el conteo diferencial de leucocitos, los linfocitos tuvieron valores mayores en aves en cautiverio que en silvestres, sin embargo, éstos se encuentran dentro de los valores registrados en la literatura [26] (3,39 – 20,32 10⁹/L). En un estudio realizado en pingüinos papúa (*Pygoscelis papua*) y pingüinos saltarrocas (*Eudyptes chrysocome*) de las Islas Malvinas, se

obtuvo un mayor número de linfocitos en pingüinos silvestres que en los cautivos [11]. Por esto, existe la posibilidad que las aves cautivas hayan estado expuestas recientemente a diferentes antígenos, lo que originó la diferencia.

Los valores reportados para eosinófilos en aves en cautiverio fueron menores que en aves silvestres, sin embargo se encuentran dentro de los límites normales registrados para esta especie [25, 26]. La eosinofilia en aves puede estar asociada a parasitosis, automutilación, traumas severos, lesiones en piel y síndromes de hipersensibilidad, no obstante es un hallazgo inconsistente [7]. Wallace y col. [26] al comparar pingüinos de Humboldt de vida silvestre con aves cautivas precedentes del zoológico de la ciudad de Milwaukee, EUA, sólo encontraron diferencias estadísticas en el número de eosinófilos entre ambos grupos, presentándose los mayores valores en los pingüinos de vida silvestre, semejante a lo observado en el presente estudio. Esta diferencia se puede explicar debido a que, los pingüinos cautivos son desparasitados periódicamente como parte del protocolo de manejos de estas aves.

La actividad plasmática de las enzimas, fue más alta en las aves silvestres (P<0,05). En el estudio de Wallace y col. [26], en pingüinos de Humboldt silvestres sanos, al igual que en International Species Information Systems [24], en pingüinos de Humboldt en cautiverio, la media de FA fue superior a la obtenida en los pingüinos silvestres del presente estudio. Según Lumeij [15] en aves, el aumento en la actividad de la enzima FA está predominantemente asociado con un incremento de la actividad osteoblástica, hiperparatiroidismo nutricional secundario, raquitismo, osteomielitis por reparación de fractura, y en periodo pre ovulatorio. En *E. chrysocome* se encontró que, en periodo de muda la actividad de FA era superior a la obtenida en aves en periodo de reposo [8]. Los mayores valores de FA corresponden a siete aves provenientes de zoológico con valores mayores a 100 U/L, de las cuales cuatro corresponden a aves juveniles, con lo cual se podría suponer que esta diferencia se deba a la presencia de aves en desarrollo, a diferencia de las aves silvestres que eran todas adultas. Sin embargo, 15 de las aves en cautiverio mostraron valores de FA mayores al valor máximo determinado en las aves silvestres, lo que podría asociarse a algún tipo de traumatismo óseo de las aves cautivas por las instalaciones distintas al medio silvestre en el que viven las aves de Pan de Azúcar. También se puede asociar a la administración de complejos vitamínicos en las aves cautivas, ya que un exceso de vitamina A produce en los huesos una actividad osteoblástica reducida y mayor actividad de la FA sanguínea y ósea [2]. Sin embargo, Penguin Taxon Advisory group [5] menciona que, los pingüinos posiblemente por ser aves piscívoras, presentan una alta tolerancia a la vitamina A, debido a las elevadas concentraciones que presentan en su dieta natural.

La actividad de la enzima GGT, también presentó valores mayores en los pingüinos de zoológico. Los valores presentados por International Species Information Systems [24] en pingüinos de Humboldt en cautiverio, fueron menores a los

obtenidos por el presente estudio en aves cautivas, pero mayores a los obtenidos por las aves de vida libre. Según Hochleithner [12], valores elevados en GGT se encuentran asociados a enfermedad hepática, aunque también se han reportado incrementos cuando existe alteración a nivel renal. De las aves estudiadas con mayores valores de GGT, una presentaba otras enzimas hepáticas con valores elevados, esta ave juvenil ciega, con peso corporal sobre el promedio, cuyo conteo de leucocitos totales estaba elevado, sin presentar otros antecedentes clínicos. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede suponer que esta ave podría estar comenzando un cuadro de alteración hepática.

La actividad de la enzima LDH se determinó que, al igual que las enzimas anteriores, se observó más elevada en los pingüinos cautivos. Los valores de LDH en International Species Information Systems [24] son menores a los obtenidos para las aves cautivas del presente estudio. Según Lumeij [15], la enzima LDH en aves es indicadora de daño hepático, debido a que en condiciones normales esta enzima presenta baja actividad y una vida media plasmática muy corta, sugiriendo daño hepático cuando al ser evaluada junto con la CK se observan elevaciones persistentes de la LDH sin elevaciones de la CK. El aumento en la actividad de la LDH no se puede asociar a daño muscular en otros tejidos, ya que no se realizó electroforesis.

Al comparar la actividad de la enzima AST de pingüinos de Humboldt silvestres y cautivos no se observa diferencias significativas. El valor medio de International Species Information Systems [24] en pingüinos de Humboldt en cautiverio (n=107) es menor que el registrado en el presente estudio. En el estudio de Wallace y col. [26] en pingüinos de Humboldt silvestres, la media para la enzima AST fue mayor que en ambos grupos del presente estudio, sin embargo se encuentra dentro de los intervalos registrados. Por el contrario, en el estudio de Villouta y col. [25] en pingüinos de Humboldt sanos con tres días post captura, la media para la AST fue más baja que en ambos grupos de este estudio, sin embargo, este valor aumentó hacia las 15 semanas de cautiverio, superando los valores del presente estudio en la misma especie de pingüino. Este autor menciona al respecto, que considerando los diferentes orígenes de esta enzima y el estatus sanitario de las aves que estudió, los valores observados podrían afectarse por un incremento en la actividad muscular más que por una alteración hepática. Esto último parece contradictorio, ya que estas aves al estar en cautiverio realizan menor actividad muscular de lo realizado en vida silvestre.

Entre pingüinos de Humboldt silvestres y mantenidos en cautiverio hubo una gran diferencia en cuanto al peso corporal, siendo la media para aves silvestres mucho mayor que en la de aves en cautiverio. Se puede suponer que esto se deba a la poca actividad física de las aves en cautiverio lo que llevaría a una disminución de la masa muscular. Estudios realizados con pingüinos de vida silvestre de Pan de Azúcar [17] determi-

naron una media de 4200 g de peso; en la Isla Cachagua se obtuvo un peso promedio similar en adultos de 4313 ± 385 g [26], este mayor peso podría ser consecuencia de la gran cantidad de horas que pasan en el mar (25 h como promedio una vez que se sumergen, con un intervalo de 12 a 51 horas nadando).

En los últimos años se han encontrado en las costas del norte de Chile muchos pingüinos de Humboldt juveniles en muy mal estado y con signos de desnutrición, los cuales han resultado ser ciegos. Gran parte de las aves de esta especie presentes en los zoológicos de Chile presentan este problema, del cual se desconoce la causa. Como este hecho es el antecedente más uniforme detectado en algunos de los pingüinos analizados, fue utilizado como un parámetro de comparación, frente al cual no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas entre estos dos grupos de pingüinos.

CONCLUSIONES

Las diferencias obtenidas entre pingüinos silvestres y en cautiverio son menores, encontrándose dentro de los intervalos de referencia establecidos para esta especie. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticas en el conteo de leucocitos, número total de linfocitos, número total de eosinófilos y la actividad enzimática de FA, GGT, LDH. Además, se encontraron diferencias en el peso atribuido principalmente a las diferencias en el modo de vida de las aves en cautiverio y silvestres.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARTACHO, P.; SOTO-GAMBOA, M.; VERDUGO, C.; NESPOLO, R. Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of an endangered black-necked swan population. **Comp. Biochem. Physiol. A**. 147:1060-1066. 2007.
- [2] AUSTIC, R.; SCOTT, M. Nutritional diseases In: Calnek, K.; Barnes, J.; Beard, C; Reid, W. Yoder, H. (Eds). **Enfermedades de las aves**. El Manual Moderno. 9th Ed. México D.F. México. 1147 pp. 1995.
- [3] CAMPBELL, T. Hematology. In: Ritchie, B., Harrison, G., Harrison, L. (Eds). **Avian medicine: principles and application**. Wingers Publishing. Florida, USA. Pp 176-198. 1994.
- [4] COOPER, J.E. Minimally invasive health monitoring of wildlife. **Anim. Welfare**. 7:35-44. 1998.
- [5] CRISSEY, S.; SLIFKA, K.; MCGILL, P. Diet and nutrition. **Penguin husbandry manual**. Penguin Taxon Advisory Group (Ed). AZA American Zoo and Aquarium Association. Pp 65-77. 2005.

- [6] ELLIS, S.; CROXALL, J.P.; COOPER, J. Penguin conservation assessment and management plan. Report. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Appl Valley, Minn., USA. 154 pp. 1998.
- [7] FUDGE, A.M.; JOSEPH, V. Disorders of avian leukocytes. In: Fudge, A.M. (Ed.). **Laboratory medicine, avian and exotic pets**. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA. Pp 19–27. 2000.
- [8] GHEBREMESKEL, K.; WILLIAMS, G.; KEYMER, I.F.; HORSLEY, D.; GARDNER, D.A. Plasma Chemistry of rockhopper (*Eudyptes creztatus*), magellanic (*Spheniscus magellanicus*) and gentoo (*Pygoscelis papua*) wild penguins in relation to moult. **Camp. Biochem. Physiol.** 92:43-47. 1989.
- [9] GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MORENO, L.; GUGLIELMONE, A. First report of *Ornithodoros spheniscus* (Acari: Ixoidae: Argasidae) from the Humboldt penguin in Chile. **Syst. Appl. Acarol.** 13:120-122. 2008a.
- [10] GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; KINSELLA, J.; LARA, J.; VALENZUELA-DELLAROSSA, G. Parásitos gastrointestinales en pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) y pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en las costas del centro y sur de Chile. **Parasitol. Latinoam.** 63:58-63. 2008b.
- [11] HAWKEY, C.M.; HORSLEY, D.T.; KEYMER, I.F. Hematology of wild penguins (Sphenisciformes) in the Falkland Islands. **Avian Pathol.** 18:495-502. 1989.
- [12] HOCHLEITHNEIR, M. Biochemistries. In: Ritchie, B.; Harrison, G.; Harrison, L. (Eds) **Avian medicine: principles and application**. Wingers Publishing. Florida, USA. Pp 223-245. 1994.
- [13] INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). Red List of Threatened Species. 2011. Version 2011.2. On line: www.iucnredlist.org. 01/23/2012.
- [14] JARAMILLO, A. Lámina 14: Pingüinos. In: Jaramillo, A. (Ed.). **Aves de Chile: incluye la península Antártica, las islas Malvinas y Georgia del Sur**. Lynx ediciones. Barcelona, España. Pp 54-55. 2005.
- [15] LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: Kaneko, J.; Harvey, J.; Bruss, M. (Eds). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th Ed. Academic Press. California, USA. Pp 839-872. 1997.
- [16] LUCAS, A.M.; JAMROZ, C. Technics for avian blood. In: Lucas, A.M.; Jamroz, C. (Eds). **Atlas of avian hematology**. United States Department of Agriculture, Washington, USA. Pp 222-232. 1961.
- [17] LUNA-JORQUERA, G.; CULIK, B.M. Diving behaviour of Humboldt Penguins *Spheniscus humboldti* in northern Chile. **Mar. Ornithol.** 27:67-76. 1999.
- [18] MARTÍNEZ, D.; GONZÁLEZ, G. Orden: Sphenisciformes. In: Martínez, D.; González, G. (Eds). **Las Aves de Chile, Nueva guía de campo**. Ediciones del Naturalista. Santiago, Chile. Pp 45-48. 2005.
- [19] MAXWELL, M.H. Avian blood leukocyte response to stress. **World Poult. Sci. J.** 49:34–43. 1993.
- [20] MERINO, S.; POTTI, J.; FARGALLO, J. A. Blood parasites of some passerine birds from central Spain. **J. Wildl. Dis.** 33:638-641. 1997.
- [21] SMITH, K.M.; KARESH, W.B.; MAJLUF, P.; PAREDES, R.; ZAVALAGA, C.; REUL, A.H.; STETTER, M.; BRASELTON, W.E.; PUCHE, H.; COOK, R.A. Health evaluation of free-ranging penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. **Avian Dis.** 52:130-135. 2008.
- [22] SIMEONE, A.; BERNAL, M.; MEZA, J. Incidental mortality of Humboldt penguins *Spheniscus humboldti* in gill nets, central Chile. **Mar. Ornithol.** 27:157-161. 1999.
- [23] SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Estimación y contraste de hipótesis. In: Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. (Eds). **Introducción a la bioestadística**. Editorial Reverte, Barcelona, España. Pp 90-129. 2002
- [24] TEARE, A. Reference ranges for physiological values in captive wildlife. International species information systems. **International Species Inventory System**. Apple Valley. Minnesota, USA. 1 cd-rom. 2002.
- [25] VILLOUTA, G.; HARGREAVES, R.; RIVEROS, V. Haematological and clinical biochemistry findings in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). **Avian Pathol.** 26:851-858. 1997.
- [26] WALLACE, R.S.; TEARE, J.; DIEBOLD, E.; MICHAELS, M.; WILLIS, M. Hematology and plasma chemistry values in free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. **Zoo. Biol.** 14:311-316. 1995.
- [27] WILLIAMS, T.D. Genus *Spheniscus*. In: Williams, T.D. (Ed). **The Penguins, Spheniscidae**. Oxford University Press, Oxford. Pp 245-246. 1995.