

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA ANEMIA FERROPRIVA NO
ELETROFORETOGRAMA DE HEMOGLOBINA DE
LEITÕES**

**Nathan da Rocha Neves Cruz
Médico Veterinário**

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA ANEMIA FERROPRIVA NO
ELETROFORETOGRAMA DE HEMOGLOBINA DE
LEITÕES**

Nathan da Rocha Neves Cruz

Orientador: Prof. Aureo Evangelista Santana

Coorientador: Prof. Luís Guilherme de Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

2016

Cruz, Nathan da Rocha Neves
C957i Influência da anemia ferropriva no eletroforeograma de hemoglobina de leitões / Nathan da Rocha Neves Cruz. -- Jaboticabal, 2016
x, 51 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Aureo Evangelista Santana
Coorientador: Luís Guilherme de Oliveira
Banca examinadora: Marcos Augusto Alves da Silva, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira
Bibliografia

1. Suínos. 2. Hematologia. 3. Hemoglobinopatias. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.155:636.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
nathancruzbr@gmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DA ANEMIA FERROPRIVA NO ELETROFORETOGRAMA DE HEMOGLOBINA DE LEITÕES

AUTOR: NATHAN DA ROCHA NEVES CRUZ
ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. MARCOS AUGUSTO ALVES DA SILVA
Universidade Estadual do Norte do Paraná / UENP - Bandeirante/PR

Profa. Dra. MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
Núcleo Hospitalar Veterinário / Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 29 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nathan da Rocha Neves Cruz, Rio de Janeiro, 10 de julho de 1988. Ensino Médio e Técnico Agrícola com habilitação em Zootecnia formado pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Uberaba – CEFET/Uberaba (Atual Instituto Federal do Triângulo Mineiro) (2003 – 2005) na cidade de Uberaba, Minas Gerais. Médico Veterinário graduado no Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba – UNIUBE (Jan/2006 – Jul/2011) em Uberaba, Minas Gerais. Na graduação teve bolsa de estudos do Programa de Ensino Médio da Universidade de Uberaba – UNIUBE (Jan/2006 a Jul/2007), posteriormente aluno bolsista do Programa Universidade Para Todos (PROUNI) do Ministério da Educação do Governo Federal Brasileiro, bolsa que possibilitou cursar gratuitamente todo Bacharel em Medicina Veterinária, Universidade de Uberaba – UNIUBE. Patologista Clínico Veterinário formado pelo Programa de Residência em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal com bolsa através do Programa de Aprimoramento Profissional – PAP (Mar/2012 – Mar/2014). Discente Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal sendo bolsista de Mestrado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (2014 – Atual). E selecionado como aluno de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal para o primeiro semestre de 2016.

*“Irmão, você não percebeu que você
É o único representante do seu sonho na face da Terra?
Se isso não fizer você correr, chapa, eu não sei o que vai?
Levanta e anda
Mas eu sei que vai
Que o sonho te traz, coisas que te faz
Prosseguir... Levanta e anda”.*

Emicida.

À minhas matrizes e companheiras de experimento Alfa, Beta, Gamma, Delta e a cada um dos seus “leitãozinhos”, não seria possível este trabalho sem a paciência e o empenho de vocês. Ao cachaço Otávio por toda sua doçura e bondade em me ensinar a ser um suinocultor e fazer o serviço de forma simples e rápida.

AGRADECIMENTOS

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”. Clarice Lispector.

Sim eu consegui chegar mais longe! Principalmente em uma época de dificuldades no âmbito da pesquisa, esse trabalho mostrou que podemos realmente fazer uma investigação científica latente e criativa com auxílio não somente financeiro (apertado), mas com a confiança das pessoas que você encontra na trajetória e dizem em atitudes, sim vá em frente, este caminho é o certo.

Prof. Áureo muito obrigado por essa proposta de pesquisa, um grande sinal de confiança e honra por continuar, o trabalho iniciado com sua dissertação de mestrado, realmente obrigado por compartilhar as memórias e experiência. Uma grande inspiração e bons primeiros passos em minha vida acadêmica. Pelo respeito, lições de cidadania, docência e muitos etc. Estar ao lado do senhor no doutorado é realmente como o senhor diz: ser e estar feliz!

Prof. Luís Guilherme agradeço pela confiança, paciência e motivação ao longo do experimento, com sua sala sempre aberta a novos receios, medos, acertos, erros, orçamentos apertados, um verdadeiro, *“brainstorming das problemáticas solucionáticas em caráter criativo”* nessa arte que é suinocultura, sua dedicação por esta ciência é o “verdadeiro estado da arte”. Espero que esta parceria esteja fechada por muitos longos anos.

Ao Prof. Joaquim pela confiança para aquisição das marrãs. Muito obrigado sem o aval do senhor, não haveria esta dissertação.

Ao Prof. Hauschild por me receber e apoiar a ideia desse projeto com alimentação na primeira fase, a abertura do setor de suinocultura e toda atenção com as consultas técnicas.

Ao Zé e o Seu Wilson pelos ensinamentos técnicos, vivência suínica, auxílio em meu projeto e mostrar com a experiência de vocês que ser suinocultor não é apenas criar, e sim ter amor, dedicação e afeto a cada manhã.

Seu Hélio e Lucas por toda a paciência dentro da fábrica de ração, realmente foi encantador processar o alimento que utilizei para minhas companheiras de trabalho. Pelo carrinho e pelas caronas!

Ao Prof. André Furugen (USP – Pirassununga) pela doação das amostras de sêmen, auxílio nas dúvidas reprodutivas, muito obrigado! Com toda a certeza, o senhor fez diferença no meu trabalho, obrigado pelas portas abertas e pelo frigobar!

Ao Gustavo Amorin e Diego pelo auxílio as minhas viagens a Pirassununga para viabilizar meu efetivo transporte de sêmen suíno. Bem como todo empenho do setor de transporte da FCAV/UNESP, vocês foram essenciais para minha boa taxa de prenhes.

Carlos, muito obrigado por suas mãos, sem elas não teria minhas amostras sanguíneas. E por me mostrar que minhas marrãs e eu somos uma família, e que meu estresse afetava diretamente a elas, com sua observação conseguir enxergar a tranquilidade.

Edson 600 pelas palavras de apoio, antes de chegar minhas marrãs, suas palavras estão guardadas.

A Karen Lourenço e Mariana da ENDOVET pelos convites e apoio durante meu Mestrado. Bem como todo corpo clínico e administrativo da ENDOVET.

Ao meu grande amigo Eugênio pelo apoio, ajuda no experimento e seus conselhos trakinas durante toda minha vida na UNESP. Lia obrigado pelos copos de coca-cola e as conversas sempre tão agradáveis e tranquilas. Chica obrigado pelo apoio e sempre a curiosidade por saber como andava o Projeto.

Ao setor de manutenção da FCAV/Unesp pela atenção e por todas os materiais dispostos. Também tenho que agradecer ao serviço de marcenaria. E a todos os setores administrativos da FCAV/Unesp que importunei durante meu experimento. Muito obrigado Bel (Secretária do DCCV) pela paciência e auxílios.

Prof.a. Cláudia Bonini (SJRP – UNESP) pela disponibilidade e atenção em todos os emails, muito obrigado, pelas portas abertas do Laboratório de Hemoglobinopatias. Nathália (SRJP – UNESP) por sua paciência e auxílio nas minhas eletroforeses. Aline (UFTM) tenho que lhe agradecer por me receber, pelos auxílios e dúvidas em minhas eletroforeses, foi fundamental seu apoio.

Claúdia, Paulo e Renata pela paciência no laboratório de Pesquisa do DCCV, também pelos conselhos e ajudas técnicas.

Mateus Yamazaki muito obrigado pelo apoio, paciência e por não me matar, muito obrigado meu amigo e companheiro de residência. Ana Panoso obrigada por lembrar que precisava me cuidar, pelo apoio e seu tenro sorriso. A Fernanda Martinato por auxiliar nas análises hematológicas. Ao corpo laboratorial do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (FCAV/UNESP) por toda paciência em relação ao meu experimento e minha pessoa (*uma verdadeira casa, sempre!*).

A esse Grupo de Pesquisa em Sanidade de Suínos que me enche de orgulho e cada dia mais cresce dentro de nossa Instituição. Obrigado pela paciência e perdão por eventuais falhas.

Ao Marcus Feliciano e Mariana pelo diagnóstico ultrassonográfico da gestação das marrãs. Fernando Japonês, Marina e Karla pelo apoio nos manejos dos leitões.

Cássia Molinaro, obrigado pela sua ajuda nas primeiras escritas do projeto, pela minha banca de qualificação do pré-projeto. Obrigado por sua confiança sempre. Suas lições estão guardadas comigo, e sempre quando tenho oportunidade de passar para alguém, faço, para tentar chegar ao patamar de sabedoria e disponibilidade ao outro que você sempre faz questão de ser.

Tchaina, japonesa, por tudo não é! Pela amizade, caronas, abraços, apoio, sem dúvida uma pessoa de *ordinária* presença durante meu mestrado. Espero realmente que caminhemos por muitos longos anos juntos!

Bah e Andressa pelo apoio.

Aline Mirrasga e toda sua família por toda ajuda no experimento, na minha vida, obrigado por fazer a diferença a cada dia.

Júlia e Lívia pela amizade e apoio.

A todas as pessoas do setor do Hospital Veterinário que deram apoio, palavras de motivação para realizar esse projeto.

“Em especial às pessoas que fizeram me deram auxílio durante o nascimento e manejo dos leitões. Tomo a liberdade de chamar de “*minha equipe*”: Ana Cláudia, Fausto Marinho, Juliana Paula, Patrícia Versutti e Thaís Baraldi obrigado pelo

esforço, paciência, conselhos e meus resultados que estão escritos aqui, vocês serão sempre o *sucesso* nessa minha jornada!”

Quero agradecer a pessoas que me apoiaram e ajudaram a estar aqui ao longo da minha vida – Aglays Martins (pelo auxílio e imensa amizade), Prof. Hugo Prata (Pelas oportunidades, amizade, conselhos e auxílio), Prof. Wanderson Biscola (Pelos ensinamentos, pelo conselho em vir para Unesp de Jabotical), Prof.a. Liliane Benatti (Pelo apoio irrestrito durante a faculdade e por fazer o sonho da ABCZ acontecer), ao Prof. Mestre Carlo (Por incentivar e dizer: “senta e leia o livro, Mestre”) Prof.a. Joely Bittar e Prof. Eustáquio Bittar (Pelas oportunidades, ensinamentos e por sempre acreditar em mim) e pelo meu grande amigo Prof Yudi Kanayama (Por todas as oportunidades, pelos empregos, pelas monitorias, pelos puxões de orelha, por simplesmente acreditar).

“Para estar ao lado das minhas marrãs, tive que abdicar da presença de pessoas muito queridas, Mãe, Vó, Irmã e Panda, obrigado pela paciência e desculpa pela minha ausência por tentar alcançar um sonho, uma realização que poucas pessoas têm oportunidade de viver tão plenamente.”

“Simplesmente esse trabalho simboliza uma boa fase, pré, ao vivo e pós.”

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS _____	1
1.1 Introdução _____	1
1.2 Revisão de Literatura _____	2
1.3 Referências _____	11
CAPÍTULO 2 - Influência da deficiência de ferro no eletroforetograma de hemoglobinas de leitões neonatos _____	1
Resumo _____	1
Abstract _____	1
Introdução _____	2
Materiais e métodos _____	4
Resultados e discussão _____	7
Conclusão _____	11
Fontes de aquisição _____	11
Comitê de ética e biossegurança _____	11
Referências _____	15
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	1
ANEXO _____	1
Normas de Publicação da Revista Ciência Rural _____	2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 05824/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da incidência de hemoglobinopatias em leitões com anemia ferropriva**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

RESUMO

A hemoglobina é uma proteína globular composta por fração protéica (cadeias de globina), fração heme onde ocorre a ligação do íon bivalente de ferro, sendo que, as globinas combinadas ajudam a tipificar as hemoglobina em Hb Adulta (Hb A), Fetal (Hb F) e Adulta 2 (Hb A2). Na deficiência de ferro, que pode culminar anemia por disfunção eritropoiética, prevalente em leitões e seres humanos, a hemoglobina pode ter alterações estruturais denominadas hemoglobinopatias. O estudo determinou a influência do ferro nos tipos de hemoglobina de leitões neonatos. Perante os resultados se verificou que hemoglobina do leitão tem corrida semelhante à humana, e nos animais que apresentaram anemia ferropriva não houve aparecimento do traçado Hb A2, que pode estar diminuída em casos de deficiência de ferro em seres humanos.

Palavras-chave: Suínos, hematologia, hemoglobinopatias

ABSTRACT

Hemoglobin is a globular protein consisting of the protein fraction (globin chains), heme fraction which is the binding of the bivalent iron ion, and the combined globin help classify the hemoglobin in Hb Adult (Hb A), Fetal (Hb F) and Adult 2 (Hb A₂). The iron deficiency can predispose anemia by erythropoietic dysfunction, prevalent in pigs and humans and the hemoglobin may have structural changes denominated hemoglobinopathies. The study determined the influence of iron to the types of hemoglobin neonate pigs. On the results was found that the pig hemoglobin is similar to human in electrophoresis. The piglets showed deficiency anemia there was appearance of line Hb A₂, which may be diminished in cases of iron deficiency in humans.

Key words: Swine, hematology, hemoglobinopathies

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

Como na criação de suínos, a deficiência de ferro é uma preocupação constante na saúde dos homens, principalmente na primeira fase de vida, de acordo com Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004) um terço da população humana é acometida pela privação de ferro, seja por falta ou má-alimentação, doença infecciosa ou síndromes metabólicas, sendo prevalente em crianças na primeira fase de vida e pernicioso em gestantes e lactentes.

Quando pousamos nossas vistas para diagnóstico e monitoração da anemia ferropriva em seres humanos, vemos o quanto à suinocultura pouco avançou, uma vez que, a prática de suplementação de ferro em leitões recém-nascidos tornou-se ordem efetiva com a descoberta do *ferro-dextran* em 1970 por MacDonald e Cols, o que solucionou em tese as perdas econômicas no início da criação industrial suinícola (SANTANA, 1982).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004) define que anemia é a diminuição da hemoglobina, uma vez que, esta molécula fornece ao ser humano a vital possibilidade de carrear o oxigênio ambiental para cada célula do corpo, e uma das principais causas da anemia em humano é a falta do ferro dentro desta molécula que fica propensa a radicais livres, desnaturação e até desbalanceamento de suas cadeias globinicas que culmina com diminuição da perfusão do oxigênio e retirada do dióxido de carbono dos tecidos.

Essa alteração na molécula de hemoglobina gerada pela falta do ferro pode ser definida como hemoglobinopatia do tipo estrutural, por haver uma

alteração da conformação molecular que é identificada através do eletroforetograma hemoglobínico.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento da molécula de hemoglobina através da eletroforese por agarose de leitões ferropênicos, visto que, o ferro tem na hemoglobina como seu principal estoque corpóreo, e a dele causa oxidação e perda de função dessa molécula.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular, tetramérica, cuja massa molecular relativa é de 64,5 kDa, sua função primordial é transportar oxigênio e dióxido de carbono, com o objetivo de realizar a hematose do organismo (WANG, 2006). Apresenta em sua composição uma fração protéica (cadeias de globina) e uma fração prostética representada pela protoporfirina 9, ligada ao íon bivalente de Ferro (Fe^{++}) (SHIRABI; HINSDALE, 2005), conforme esquematização da figura 1.

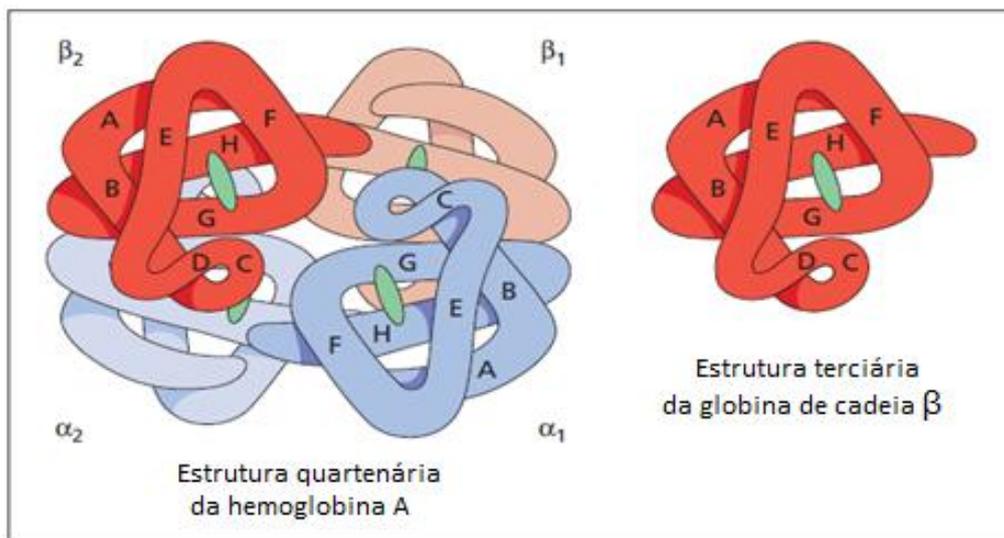


Figura 1. Representação gráfica da estrutura quaternária e terciária da molécula de hemoglobina. Fonte: BAIN (2006).

Durante os diferentes estádios de desenvolvimento eritroblástico, que tem lugar na medula óssea, as frações livres do grupo prostético (heme) são estruturadas no ambiente mitocondrial, enquanto que as cadeias globínicas são sintetizadas nos domínios polirribossômicos do retículo endoplasmático rugoso (HARVEY, 2012). A fração heme é formada a partir da junção de glicina e succinil-CoA (protoporfirina – 9) que, sob a ação da ferroquelatase, faculta a inserção do átomo de Ferro no interior do referido núcleo tetrapirrólico

(STOCKHAM, S. L; SCOTT, 2011). Os quatro grupos heme (núcleo tetrapirrólico) estão recobertos pelas cadeias globínicas, protegidos contra a desnaturação (Figura 2).

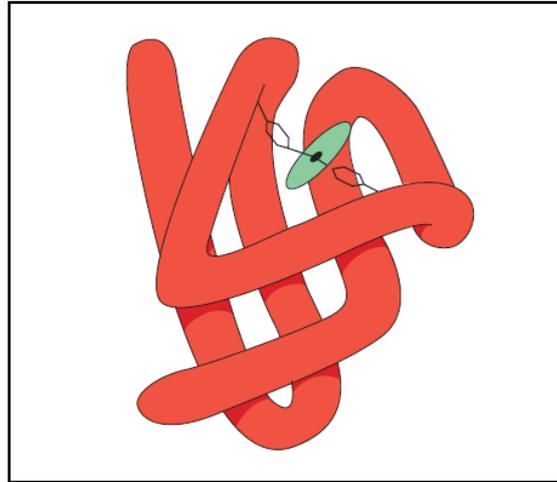


Figura 2. Representação gráfica da molécula de hemoglobina com o grupo heme (verde) dentro da fração globina (vermelho). Fonte: BAIN (2006).

As cadeias globínicas são compostas pelas frações globínicas sintetizadas por *loci* de genes ativos (α , β , e δ), que em seres humanos redundam na combinação dos cromossomos 16 e 11 (figura 3), culminando com a síntese de quatro tipos de cadeias (α – alfa, β – beta, γ – gama e δ – delta) (NAOUM, 1987; WANG, 2006).

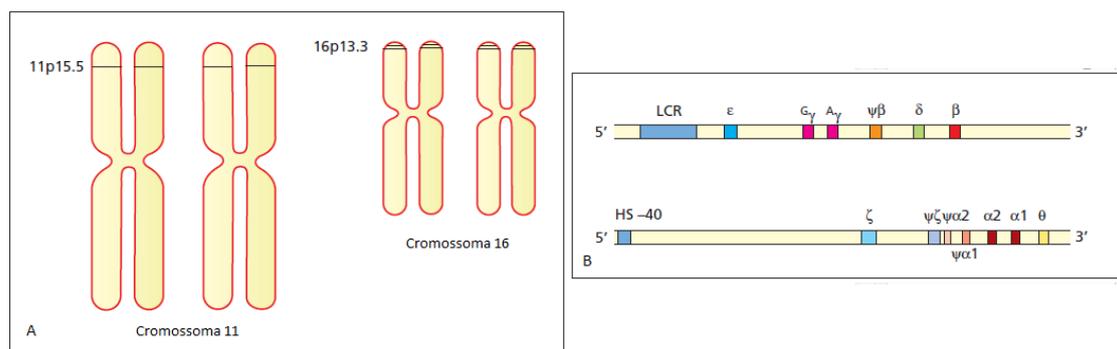


Figura 3. Representação gráfica dos (A) cromossomos 11 e 16 e dos (B) *loci* gênicos onde são sintetizadas as cadeias de globina da molécula de hemoglobina. Fonte: BAIN (2006).

A combinação das cadeias dentro do tetrâmero, duas a duas, permite a tipificação da molécula de hemoglobina em três classes: (1) embrionária, constituída por duas cadeias α -globinas e duas ϵ -globinas; (2) hemoglobina fetal, com duas cadeias α -globinas e duas γ -globinas (HbF); (3) da hemoglobina adulta, com duas cadeias α -globinas e duas β -globinas (HbA); e (4) hemoglobina adulta 2, com duas α -globinas e duas δ -globinas (BAIN, 2006). Os tipos hemoglobínicos têm concentrações diferentes durante o desenvolvimento do embrião até o nascimento, na figura 4 pode-se visualizar a correlação entre produção dos tipos hemoglobínicos em relação ao desenvolvimento do organismo em seres humanos, desde a fase embrionária após nascimento.

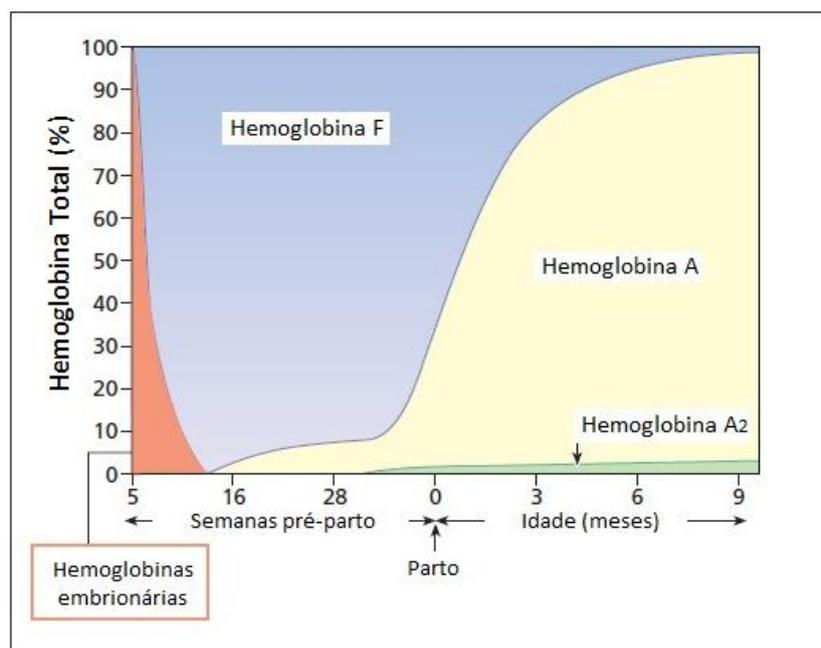


Figura 4. Correlação entre o aparecimento dos tipos hemoglobínicos em relação a desenvolvimento em seres humanos na fase fetal e após o nascimento. Fonte: BAIN (2006).

Em seres humanos, durante a vida fetal, a HbF predomina e, após o nascimento, são produzidas quantidades cada vez menores de HbF (na vida

adulta chega a 2,5%), que é substituída gradativamente pela HbA (95% em indivíduo adulto) (WILD; BAIN, 2007).

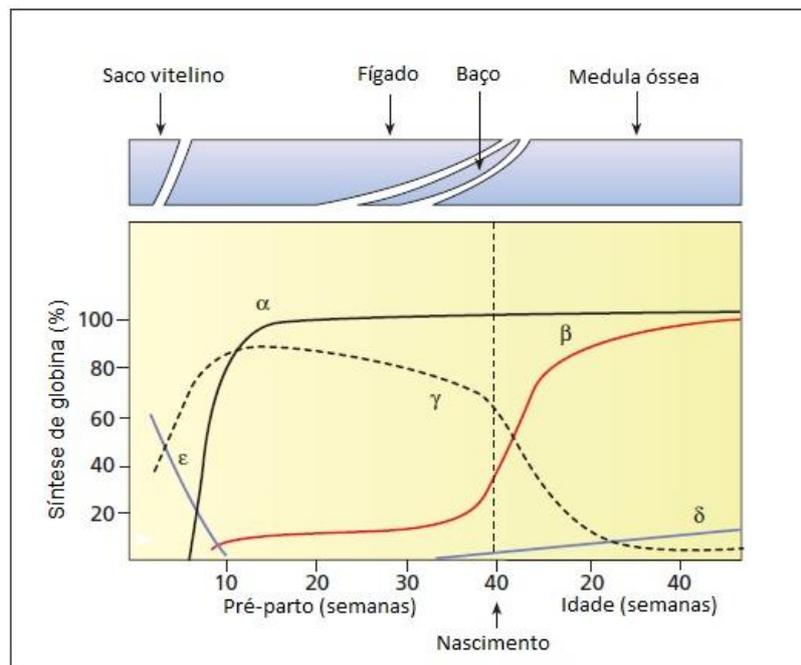


Figura 4. Representação dos sítios de síntese de globinas das diferentes em seres humanos na fase fetal e após nascimento. Fonte: BAIN (2006).

De acordo com Bain (2006), em humanos as globinas durante a fase embrionária (5ª semana) são produzidas por eritroblastos primitivos no saco vitelino, as cadeias α e ϵ , correspondentes das globinas embrionárias. No sexta semana de gestação, estas mesmas células começam sintetizar cadeias α , β e γ (PONKA, 1997). Na 10-12ª semana, a hemoglobina começa a ser sintetizada no fígado e baço, tendo como principais tipos hemoglobinícos produzidos fetal e adulta. Após o nascimento, a medula óssea se torna o principal sítio de síntese de hemoglobina, com os eritroblastos medulares responsável pela produção de hemoglobina A e tipos menores de hemoglobina (fetal e A2) (STEINBERG; ADAMS, 1991).

A hemoglobina fetal (HbF) é maior durante a vida intrauterina, tem afinidade pelo oxigênio mais alta que a Hb A devido a fraca afinidade para 2,3

GPD, característica que facilita a transferência de oxigênio entre a mãe e o feto, contudo, ela é menos eficiente no transporte do CO₂ (BUNN; FORGET, 1991). Durante primeiro ano de vida, a percentagem de hemoglobina F cai progressivamente (Figura 3 e 4), o percentual da Hb F no nascimento geralmente varia de 60 – 95%, e na puberdade 2,5% da hemoglobina total (NAOUM, 1987).

A hemoglobina adulta 2 (Hb A₂), cerca de 2 – 3% da hemoglobina total em adultos, possui menor percentual no nascimento (0,2 – 0,3%) e vai aumentando para níveis correspondentes a indivíduos adultos durante os primeiros 2 anos de vida no homem (SERJEANT et al, 1978). Possui propriedade funcional muito semelhante à Hb A, com cooperatividade e interação semelhantes com 2,3-DPG (difosfoglicerato), porém não inibe a polimerização de hemoglobinas S que são instáveis (KUNKEL; WALLENIUS, 1955). O 2,3-DPG é uma enzima responsável por reduzir a afinidade do oxigênio com a hemoglobina quando esta chega à tecidos com baixa tensão de oxigênio (KAENEKO, 2008).

Sua taxa reduzida de síntese, está associada a síntese mais lenta das cadeias δ presente nas suas globinas, em relação as cadeias β (Hb A) devido a particularidade da região promotora de transcrição do δ mRNA. Em humanos, a Hb A₂ pode estar reduzida por pela deficiência de ferro, seja ela absoluta ou funcional ou por uma alteração na formação de cadeias globinas do tipo δ . As taxas de Hb A₂ é aumentar quando há uma alteração na produção de cadeias do tipo β , que participam da formação da Hb A (STEINBERG; ADAMS, 1991).

Em cães, cavalos, cabras, gatos, ovelhas e porcos a hemoglobina embrionária é substituída pelos tipos adultos (Hb F e HbA) durante a vida fetal (BUNN, 1981). Kaneko (2008) afirma que há uma grande variabilidade nos tipos hemoglobínicos em animais adultos, em ovelhas, HbA e Hb B são atribuídas para diferenciar a cadeia globínica β (GARNER, LINGREL, 1988), contudo em cabras essa diferença está atribuída a diferença nas cadeias α (PIERAGOSTINI et al, 2005).

Além disso, há diferenças não genéticas que contribui para heterogeneidade das hemoglobinas, em gatos pode acontecer a n-acetilação das cadeias beta (TAKETA et al, 1972) formação de metahemoglobina em gatos com quadros tóxicos e glicolização da Hb devido ao aumento da glicose sérica, que ocorre em cães diabéticos (FIGHERA et al, 2002; HIGGINS et al, 1982; ELLIOTT et al, 1999). Em cães com doença renal crônica com aumento de ureia sérica por longos períodos pode predispor os animais a carbamilação da Hb (HEIENE et al, 2001).

A eletroforese é a método laboratorial mais utilizado para o estudo das hemoglobinas e para detecção e caracterização das variantes hemoglobinas, além da determinação das hemoglobinopatias que são alterações da molécula de hemoglobina, relacionadas com a sua biossíntese (talassemias) ou estrutura (variantes), e que podem culminar em vários graus de anemia ou alterações clínicas (WANG, 2006; BAIN, 2011).

Por meio desse método foram caracterizadas no homem 800 variantes, das quais 600 são causadoras de desarranjos moleculares que podem levar ao desenvolvimento de hemoglobinopatias (JABEEN et al. 2006), e com

descoberta da anemia falciforme correlacionada a hemoglobinopatia estrutural, a hemoglobina passou amplamente estudada (NAOUM, 1987).

Em seres humanos, 95% das hemoglobinopatias ocorrem por mudanças estruturais nas cadeias hemoglobínicas, que incluem substituição de aminoácidos ou falha de síntese (MIGNEAULT et al. 2004). Tais alterações da hemoglobina já foram reportadas em animais por Kaneko (2008), sendo a mais conhecida, a porfiria, relacionada a um defeito estrutural do componente prostético, que em bovinos leva à fotossensibilização devido à deficiência da uroporfirinogênio III sintase (KAHN, 2008).

A eletroforese é uma técnica versátil para estudar a hemoglobina, pois a partir de um lisado apenas das hemácias é possível determinar os tipos de hemoglobina usando papel de filtro, membrana de acetato de celulose, gel de amido, agar, agarose, citrato e poliacrilamina (BAIN, 2006), e pode ser utilizado em animais para determinação inicial dos tipos hemoglobínicos (KANEKO, 2008), assim como em seres humanos. No entanto, não há relatos da utilização clínica e rotineira da eletroforese de hemoglobina para diagnóstico de doenças associadas a molécula (WATSON e CANFIELD, 2008).

Neste senso, é bem conhecido o fato de que a deficiência de ferro em seres humanos, de incidência mundial associada à desnutrição e má-alimentação (CARVALHO; BACARAT; SGARBIERI, 2006), leva ao estado anêmico, bem como ao desbalanço dos tipos hemoglobínicos, com diminuição na percentagem de hemoglobina A2 (HbA2), e consequente aumento na produção de HbA como um processo de adaptação temporária (RAMALHO, 1986; EL-AGOUZA et al. 2002; BAIN, 2006), mediada, ao nível dos genes, entre os *loci* formadores de cadeias β e δ , com predileção para formação de

HbA ($\alpha_2\beta_2$) e inibição da biossíntese de HbA₂ (KERAMATI; MAYBODI, 2007). Dessa forma, a Hb A₂ poderia ser um hemoglobina marcadora da falta de ferro (EL-GOUZA et al, 2002).

A deficiência de Fe além de levar à anemia microcítica hipocrômica por retardar a maturação das células eritróides devido à falta do referido macroelemento na formação de novas moléculas de hemoglobina (WATSON; CANFIELD, 2008; GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Em suínos neonatos, tem sido observado que leitões mantidos em piso cimentado, com alimentação única e exclusivamente no leite materno e sem suplementação de ferro ou acesso à terra, desenvolvem anemia ferropriva e, conseqüentemente, elevadas taxas de mortalidade, especialmente no transcurso entre a segunda e terceira semana de vida (SANTANA, 1982). Alto desenvolvimento ponderal, baixo estoque de ferro endógeno e demanda excessiva para novas moléculas de hemoglobina são fatores para instalação da anemia ferropriva (BERTECHINI, 2006), porém ainda é desconhecido qual o comportamento dos tipos hemoglobínicos em leitões que tem deficiência de ferro e anemia ferropriva, assim como é conhecido em seres humanos (EL-AGOUZA et al, 2002; DENIC et al, 2013).

1.3 REFERÊNCIAS

ABCS, Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. Manual Brasileiro de Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Suínos. Brasília: ABCS – MAPA, 2011.

BAIN, B. J. **Haemoglobinopathy diagnosis**. 2. ed. Massachusettes: Blackwell Publishing, 2006.

BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. **Blood Reviews**, v. 25, p. 205-213, 2011.

BERTECHINI, A.G. Nutrição mineral de leitões. In: XII ABRAVES – Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em suínos. 2006. Curitiba/PR. **Anais...** Curitiba/PR: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em suínos.

BUNN , H. F. Evolution of mammalian hemoglobin function . **Blood**, v. 58, p. 189 – 197, 1981 .

BUNN, H. F.; FORGET, B. G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. W. B. Philadelphia: Saunders, 1986.

CARVALHO, M. C; BARACAT, E. C. E; SGARBIERI, V. C. Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13. n. 2. p. 54-63, Campinas, 2006.

COALHO, M. R. et al. **Anemia ferropriva em leitões recém-nascidos: sua influência sobre a produção de suínos**. Londrina: UEL, 2010.

DENIC, S. et al. Hemoglobin A2 Lowered by Iron Deficiency and α -Thalassemia: Should Screening Recommendation for β -Thalassemia Change?, **ISRN Hematology**, v. 2013, p. 1-5, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/8582594>.

EL-AGOUZA, I et al. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. **Clin. Lab. Haem**, v. 24, p. 285-289, 2002.

ELLIOTT , D. A; NELSON , R. W; FELDMAN , E. C; AND NEAL , L. A. Glycosylated hemoglobin concentrations in the blood of healthy dogs and dogs

with naturally developing diabetes mellitus, pancreatic β -cell neoplasia, hyperadrenocorticism, and anemia . **J . Am. Vet. Med. Assoc**, v. 211, p. 723 – 727, 1997.

FIGHEIRA, R. A.; SOUZA, T. A.; LANGORHR, I, BARROS, C. S. Intoxicação experimental por cebola, *Allium cepa* (Liliaceae) em gatos. **Pesq. Vet. Bras**, v. 22, n. 2, p. 79-84, 2002.

GARNER , K. J.; LINGREL, J. B. Structural organization of the beta-globin locus of B-haplotype sheep . **M ol. Biol. Evol.**, v. 5, p. 134 – 140, 1988 .

GONZÁLEZ, F. H. D; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

HARVEY, J. W. Microcyte anemias. cap. 34. p. 200-204. *In*: FELDMAN, B. F; ZINKL, J. G; JAIN, N. C. **Schalm's: Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2012.

HEIENE, R; VULLIET, P. R; WILLIAMS, R. L; COWGILL, L. D. Use of capillary electrophoresis to quantitate carbamylated hemoglobin concentrations in dogs with renal failure . **A m. J. Vet. Res.** v. 62 , 1302 – 1306, 2001 .

HIGGINS , P. J; GARUCK , R. L; BUNN , H. F. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability . **Diabetes**, v. 31, p. 743 – 748, 1982 .

KAHN, C. M. Doenças circulatórias. cap. 1. P. 20 – 30. *In*: _____. Manual Merck de veterinária. São Paulo: Roca, 2008.

KANEKO, J. J; Hemoglobin synthesis and destruction. cap. 23. p. 135-142. *In*: FELDMAN, B. F; ZINKL, J. G; JAIN, N. C. **Schalm's: Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2008.

KERAMATI, M. R; MAYBODI, N. T. The Effect of Iron Deficiency Anemia (IDA) on the HbA2 Level and Comparison of Hematologic Values Between IDA and Thalassemia Minor. **Int. J. Hem. Onc**, v. 17, p. 151-156, 2007.

KUNKEL, H. G.; WALLENIUS G. New hemoglobin in normal adult blood. **Science**, v. 122, n. 288, 1995.

MIGNEAULT, I. et al. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1367-1378, 2004.

NAOUM, P. C. **Diagnóstico das hemoglobinopatias**. São Paulo: Sarvier, 1987.

PONKA, P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. **Blood**, v. 89, p. 1–25, 1997.

RAMALHO, A. S. **As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1986.

SANTANA, A. E. **Estudo do quadro hemático de leitões alimentados com diferentes fontes de ferro**. Dissertação. Belo Horizonte: UFMG, 1982.

SERJEANT, B. E.; MASON, K.P.; SERJEANT, G. R. The development of haemoglobin A2 in normal Negro infants and in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 39, p. 259–263, 1978.

SHIHABI, Z. K; HINSDALE, M. E. Simplified hemoglobin chain detection by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, p. 581-585, 2005.

STEINBERG, M. H.; ADAMS, J. G. Haemoglobin A2: origin, evolution, and aftermath. **Blood** v. 78, p. 2165–2177, 1991.

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M .A. Eritrócitos. cap. 3. p. 90-185. *In: Fundamentos de patologia clínica veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TAKETA , F.; ATTERMEIER , M. H.; MAUK , A. G. Acetylated hemoglobins in feline blood . **J . Biol. Chem**, v. 247, p. 33 – 35, 1972.

WANG, J. et al. CE-based analysis of hemoglobin and this applications in clinical analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 3108-3124, 2006.

WATSON, A. D. J; CANFIELD, P. J. Nutritional Deficiency Anemias. cap. 32. p. 190-195. *In*: FELDMAN, B. F; ZINKL, J. G; JAIN, N. C. **Schalm's: Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2008.

WHO. Assessing the iron status of population. p. 5-7. 2. ed. Geneva: WHO, 2004. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596107/en/>.

WILD, B. J; BAIN, B. J. Investigação de hemoglobinas anormais e talassemias. cap. 12. p. 217-249. *In*: BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

**Capítulo em formato de artigo escrito conforme as normas da
Revista Ciência Rural – ISSN 1678-4596**

CAPÍTULO 2 – Influência da deficiência de ferro no eletroforetograma de hemoglobinas de leitões neonatos

RESUMO

A hemoglobina é uma proteína globular composta por fração protéica (cadeias de globina), fração heme onde ocorre a ligação do íon bivalente de ferro, sendo que, as globinas combinadas ajudam a tipificar as hemoglobina em Hb Adulta (Hb A), Fetal (Hb F) e Adulta 2 (Hb A2). Na deficiência de ferro, que pode culminar anemia por disfunção eritropoiética, prevalente em leitões e seres humanos, a hemoglobina pode ter alterações estruturais denominadas hemoglobinopatias. O estudo determinou a influência do ferro nos tipos de hemoglobina de leitões neonatos. Perante os resultados se verificou que hemoglobina do leitão tem corrida semelhante à humana, e nos animais que apresentaram anemia ferropriva não houve aparecimento do traçado Hb A2, que pode estar diminuída em casos de deficiência de ferro em seres humanos.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia, anemia ferropriva, HbA2

ABSTRACT

Hemoglobin is a globular protein consisting of the protein fraction (globin chains), heme fraction which is the binding of the bivalent iron ion, and the combined globin help classify the hemoglobin in Hb Adult (Hb A), Fetal (Hb F) and Adult 2 (Hb A2). The iron deficiency can predispose anemia by erythropoietic dysfunction, prevalent in pigs and humans and the hemoglobin may have structural changes denominated hemoglobinopathies. The study determined the influence of iron to the types of hemoglobin neonate pigs. On the results was found that the pig hemoglobin is similar to human in electrophoresis. The piglets showed deficiency anemia there was appearance of line Hb A2, which may be diminished in cases of iron deficiency in humans.

Key words: Hemoglobin, IDA, HbA2

INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular composta por fração protéica (cadeias de globina) e uma fração prostética representada pela protoporfirina-9 onde ocorre a ligação do íon bivalente de Ferro (Fe^{++}) (SHIRABI E HINSDALE, 2005). Em mamíferos adultos três tipos de hemoglobinas estão presentes: hemoglobina adulta – HbA (cadeias $\alpha_2\beta_2$) maior fração da hemoglobina total (> 95%) e duas frações menores hemoglobina adulta 2 – HbA2 (cadeias $\alpha_2\delta_2$), hemoglobina fetal – HbF (cadeias $\alpha_2\gamma_2$) que correspondem a concentração de 2,5% e <1%, respectivamente (BAIN, 2006). Durante a vida fetal, a HbF é predominante (>96%) e, após o nascimento, são produzidas quantidades cada vez menores de HbF, a qual vai sendo gradativamente substituída pela HbA (WILD& BAIN, 2007).

As hemoglobinopatias podem estar relacionadas com a sua biossíntese (talassemias) ou alterações estruturais da hemoglobina (variantes), e que podem culminar em vários graus de anemia ou alterações clínicas (BAIN, 2011). MIGNEAULT et al. (2004) reportam que 95% das hemoglobinopatias em seres humanos ocorrem por mudanças estruturais nas cadeias hemoglobínicas, as quais incluem substituição de aminoácidos ou falha de síntese das cadeias globínicas. Para as hemoglobinopatias estruturais que mais acontecem nos animais são a porfiria bovina, que é defeito estrutural do componente prostético devido à deficiência da uroporfirinogênio III sintase KANEKO et al. (2008); a acetilação das cadeias beta nos gatos (TAKETA et al, 1972) formação de metahemoglobina em gatos com quadros tóxicos (FIGHERA et al, 2002), glicolisação da Hb devido ao aumento da glicose sérica, que ocorre em cães diabéticos (HIGGINS et al, 1982; ELLIOTT et al, 1999), carbamilação por aumento de ureia sérica por muito tempo (HEIENE et al, 2001) são exemplos de alterações não genéticas que contribuem para heterogeneidade da Hb.

Quando falta o ferro na hemoglobina, esta pode ficar sujeita a oxidações, principalmente na fração heme onde o mineral se insere, com isso há uma diminuição ou interrupção na produção dos tipos hemoglobínicos (EL-AGOUZA et al. 2002), em seres humanos da região do oriente médio é comum a deficiência de ferro e a alta ocorrência de talassemias por causa de casamentos consanguíneos, sendo que a diminuição de ferro pode prejudicar no diagnóstico efetivo de alguns tipos de talassemias (hemoglobinopatia genética) por causar diminuição do tipo hemoglobínico Hb A2, no entanto, em algumas talassemias essa tipo pode estar diminuído (DENIC et al. 2013; GIAMBONA et al. 2009; MOSCA et al. 2008) sendo importante a diferenciação entre diminuição de A2 por falta de ferro ou talassemia.

A deficiência de ferro em leitões é prevalente em suínos criados em ambiente de cimento e que recebem ferro exclusivamente por leite materno (SANTANA, 1982) tendo uma taxa de mortalidade de até 60% da leitegada (MORES et al, 1998). ÖZDEMIR et al. (2013) afirmam que 8% do ferro ingerido é acumulado apenas primeiro trimestre de vida, sendo um elemento essencial para rápido crescimento e diferencial celular eritropoiético, além da formação de novas hemoglobinas. Em humanos, McLEAN et al. 2009 e Organização Mundial da Saúde – WHO (2004) a deficiência de ferro e anemia ferropriva é causa mais prevalente crianças na faixa de 0 até 5 anos, com apresentação clínica semelhante em leitões neonatos a qual inclui palidez, fraqueza, taquicardia, taquipnéia (LOYNACHAN et al. 2012) e diminuição do desenvolvimento cerebral e cognitivo e diminuição do desenvolvimento físico (ANTONIDES et al. 2015; RYTYCH et al. 2012; HAY, 2004).

Em recém-nascidos humanos acontece uma diminuição do valor sérico de ferro pelo alto requerimento de ferro até os 12 meses e com pico de (ÖZDEMIR et al. 2013; CARVALHO et al. 2006). Diversamente dos leitões, que possuem um pico de demanda

da segunda (D14) para terceira (D21) semana de vida, com progressão da diminuição de ferro sérico e estado anêmico (BHATTRAI et al. 2015; SANTANA, 1982). Dessa forma, até fase de creche a deficiência de ferro em leitões é a causa de anemia mais prevalente associada à disfunção eritropoética, tendo como causa uma tríade etiológica: rápido crescimento ponderal, baixos estoque de ferro e diminuição na ingestão de ferro (NUNES, 1997).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência da deficiência de ferro no traçado eletroforético de hemoglobínicas em leitões acompanhados desde nascimento até o dia da desmama (21º dia de idade).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o procedimento experimental foram inseminadas quatro fêmeas suínas, de linhagem comercial, nulíparas com idade 150 a 165 dias e peso de 90 a 100 Kg com atestado de hígidez obtido de exames clínicos e laboratoriais. Foram submetidas a protocolo de vacinação para tríplice suína (parvovirose, leptospirose e erisipela) com vacina comercial (FarrowSure[®]B Gold, Zoetis, São Paulo, SP) e desverminação com Ivermectina na dosagem de 100 mcg/Kg/dia, durante sete dias, por via oral, na ração.

As fêmeas gestantes (n=4) foram distribuídas em baias individuais com piso de cimento até o terceiro dia após o parto. No dia do nascimento (Dia 0) e após ingestão do colostro, os leitões foram distribuídos aleatoriamente entre cada matriz e não houve estimulação da parição. No terceiro dia vida dos leitões (D3), as marrãs e seus respectivos leitões foram aleatoriamente distribuídos em baias individuais com o seguinte piso: Piso de cimento (n=2) e Piso de terra batida (n=2).

Além da distribuição em relação ao tipo de piso, os grupos foram selecionados de forma aleatória para receber a suplementação de ferro, que consistiu na

administração de 200 mg de ferro dextrano por via intramuscular (Ferrodex, Fabiane Saúde Animal, São Paulo, Brasil) para cada leitão. Os leitões integrantes do Grupo sem suplementação de ferro receberam no volume equivalente, solução salina injetável estéril 0,85%, via intramuscular, constituindo o grupo placebo.

Após a definição do tipo de piso e suplementação de ferro, os quatros grupos experimentais ficaram com a seguinte condição e identificação: grupo do piso de cimento com suplementação de ferro dextrano injetável (α - alfa), grupo piso de terra com suplementação de ferro dextrano injetável (β - beta), grupo piso de terra com aplicação de solução salina 0,85% (γ - gamma) e grupo piso de cimento com aplicação de solução salina 0,85% (δ - delta). . Dessa fora, o delineamento experimental foi blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 2 X 2 considerando-se dois ambientes (cimento e terra) e a suplementação de ferro (suplementado ou não suplementado), e tendo os leitões de cada marrã como a repetição tratamento adotado (ambiente X suplementação) (quadro 1).

Quadro 1. Organização dos grupos experimentais de acordo com seus respectivos tratamentos.

Identificação (Marrã)	Ambiente	Administração de Ferro
α – Alfa	Cimento	2 mL ou 200 mg ferro/leitão / Dose única / I. M / 3° dia de idade
β – Beta	Terra	
γ – Gamma	Terra	2 mL de Solução Fisiológica 0,9% / Dose única / I. M / 3° dia de idade
δ – Delta	Cimento	

Os leitões foram submetidos às coletas sanguíneas e análises laboratoriais em quatro momentos, considerando nascimento como dia 0 (D0): D3 (Dia 3), D7 (Dia 7), D14 (Dia 14) e D21 (Dia 21). As coletas sanguíneas foram realizadas por venipunção jugular, com agulhas hipodérmicas e seringas e separadas dois tubos: com anticoagulante EDTA-K2 para análises eritrocitárias e eletroforese de hemoglobina e sem anticoagulante para determinação de ferro sérico.

Para realização do eritrograma foi utilizado o contador automático de células sanguíneas Micros ABC Vet-ICHOR (ABX Horiba, Montpellier, França) pré-ajustado para espécie suína e considerando-se os valores de referência eritrocitários reportados por THORN (2012) para comparação dos resultados deste estudo. E a determinação de níveis de ferro sérico foi utilizado kit comercial (Ferro sérico, Labtest Diagnóstica, Minas Gerais) que utiliza o método colorimétrico de Goodwin e determinação espectrofotométrica em aparelho semi-automático (Labquest Bioplus, Labtest Diagnóstica, MG).

Para o estudo dos tipos hemoglobínicos foi utilizada técnica de eletroforetograma em gel de agarose descrita por LEPP & BLUESTEIN (1978) e adaptada por NAOUM (1987). Para separação eletroforética foi utilizada solução de hemoglobina obtida através de técnica de hemólise proposta por LGHDG (2003). A partir de uma parte de sangue com anticoagulante submeteu-se a uma centrifugação de FCR de 800 G por 5 minutos. O plasma foi desprezado e a lavagem dos eritrócitos feita três vezes com solução salina 0,85%. Após lavagem, o sobrenadante foi desprezado e ao volume de eritrócitos lavados acrescentou igual volume de água destilada. Em seguida foi acrescentado igual volume de clorofórmio P.A e a solução foi agitada vigorosa e centrifugada novamente de 900 G por 15 minutos. Ao final, a solução sobrenadante era composta por hemoglobina livre.

A eletroforese de agarose utilizou como solução tampão de preparação para o gel e corrida o TRIS-EDTA-BORATO (TEB) em pH 8,6 (10,2g Tris hidroximetil aminometano, 0,6 g; Ácido etilenodiaminotetracético, 3,2 g; Ácido Bórico e Água destilada q.s.p 1000 mL). A agarose em concentração 1% foi aquecida por 1 minuto em micro-ondas para polimerização e foi colocada em cuba horizontal (FisherBiotech, FB-SB-1316, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Após solidificação do gel, o pente foi

removido para formação dos poços de amostras e o suporte de gel foi posicionado para o pólo negativo (catódo). O tampão de corrida e as amostras de solução de hemoglobinas foram adicionadas nos poços do gel. A corrida realizou-se a uma eletricidade de 100 volts por 70 minutos ou até a boa visualização da separação eletroforética. Ao fim da corrida corou-se o gel com coloração Azul de Coomassie (2,0 g de Azul de Coomassie, 50 mL de Ácido Acético Glacial e 950 mL Água destilada) (LEPP & BLUESTEIN, 1978). A leitura das corridas das amostras do experimento foi comparada com o traçado padrão hemoglobínico humano com doença falciforme, que possui traçado de hemoglobina AS (hemoglobina A e hemoglobina S) e foi submetido a mesma corrida descrita acima. Os resultados forma expressões de forma qualitativa com aparecimento do traçado em relação ao padrão e comparando com o *facsimile* da corrida de hemoglobina C, S, F e A descrito por LEPP & BLUESTEIN (1978) e BAIN (2006).

Todas as análises foram conduzidas no software estatístico R (versão 3.2.5, GNU Public License, 2007). Os resultados foram descritos como média e desvio-padrão após teste de normalidade que utilizou teste de Shapiro-Wilk, submetidos à estatística F e análise de variância utilizando o modelo estatístico de Tukey ($P < 0,05$) considerando a diferença significativa entre os grupos em medidas repetidas no tempo. Para avaliação da correlação da frequência dos tipos hemoglobínicos (variável categórica) com os níveis séricos de ferro (variável contínua) utilizou-se o Teste de Correlação de Spearman.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das variáveis eritrocitárias, ferro sérico e tipos hemoglobínicos podem ser visualizados na tabela 1 e 2. Durante o período experimental, o número de

leitões (parcelas) variou de 7 a 15 animais dependendo do momento condiciona ao procedimento venipunção das parcelas experimentais.

Em análise dos resultados de das variáveis eritrocitárias, no momento D3 não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa observada entre os grupos estudados no que diz respeito às variáveis hematológicas (Tabela 1) em relação a literatura (THORN, 2012). Porém no D3, as parcelas tiveram hemácias microcíticas normocrômicas, volume corpuscular médio – VCM (61.2 – 64 fL) em relação ao valor referencial (VCM: 70 – 81 fL), que segundo Harvey (2012) pode estar associado a persistência de eritrócitos microcíticos formados na fase fetal, e pode permanecer na circulação até o final da primeira semana de vida.

No momento D7, o grupo delta (δ) apresentou anemia (Hb: $5,6 \pm 0,9$ g/dL), classificada como microcítica (VCM: $48,9 \pm 1,3$ g/dL) normocrômico (CHCM: $30,7 \pm 1,2$ g/dL), sendo decréscimo da Hb significativa em relação aos outros grupos no momento D7, e com valor menor que seu valor no D3 (Hb: $7,9 \pm 0,7$ g/dL). Também no momento D7, o nível de ferro sérico do δ estavam diminuídos (113 ± 15 μ g/dL) em relação ao valor referencial (121 ± 33 μ g/dL). Neste mesmo período os grupos α e β tiveram aumento de ferro (215 e 197 μ g/dL, respectivamente), esses grupos receberam suplementação de ferro dextrano, e os níveis foram estatisticamente significativos em relação ao grupo com privação de ferro conforme encontrado por STARZYNSKI et al. (2013) e por WANG et al. (2014) que compararam os leitões com suplementação de ferro injetável daqueles não suplementados.

Nos momentos D14 e D21 os grupos alfa (α), beta (β) e gamma (γ) em relação ao grupo δ tiveram aumento dos parâmetros eritrocitários e permaneceram dentro do valor referencial, enquanto que o grupo δ se avigora o estado anêmico, corroborando com os resultados encontrados com BHATTRAJ et al. 2015, STARZYNSKI et al.

(2013) e SANTANA (1982). Associado aos valores de ferro sérico no mesmo período, podemos confirmar que em leitões a deficiência de ferro induz rapidamente ao estabelecimento da anemia (Grupo δ), já que o pico da demanda pelo ferro para síntese de novas células vermelhas é durante a segunda (D14), diferente de seres humanos que acontece por volta dos seis meses de idade (ÖZDEMIR et al, 2013).

Em leitões a deficiência de ferro induz rapidamente ao estabelecimento da anemia, visto que, há baixa transferência de ferro da mãe através da placenta e do leite, associado à baixa reserva de ferro ao nascimento pode interferir acelerar o aparecimento da doença (HARVEY, 2012), e aumento da fragilidade eritrocitária pela falta do mineral, já que sujeita a oxidação da hemoglobina ao meio externo, há uma diminuição do volume corpuscular (microcitose, diminuição do VCM), há um aumento da atividade catiônica dos canais na membrana eritrocitária e susceptibilidade a lise eritrocitária (KEMPE et al, 2006), acelerado processo de hemólise intravascular pela falta do ferro, o que pode justificar os valores altos de CHCM do grupo δ ($34,5 \pm 1,5$ %) (LANG et al, 2006).

Nos eletroforetogramas de hemoglobina dos leitões pode-se visualizar que migrações das bandas foram mais rápidas do que o padrão hemoglobínico humano (figura 1). Em todos os momentos houve o aparecimento da HbA e da HbF, assim como relatado em cães por HARVEY et al. (2012), e diferentemente encontrado em quelônios (ZAGO et al. 2010) onde a Hb migra mais devagar em relação a HbA humana.

O aparecimento da HbA2 que migra próximo a HbA e depois da HbF em seres humanos relata por BONINI-DOMINGOS (1993) aconteceu na eletroforese nos momentos em relações aos grupos em: D7 (β), D14 (α e β) e D21 (α). ASSADI et al. (2007) relatam a ausência dessa migração em hemolisados de esquilos. Nos momentos D3 (delta, gamma), D7 (alfa), D14 (gamma) e D21 (alfa) houve migrações inespecíficas

em relação ao padrão utilizado, migrações que ficaram ligeiramente acima da HbS e HbF, que foram identificadas como (Hemoglobina inespecífica – Hb?), os *lanes* da eletroforese de hemoglobina podem ser visualizado no figura 2. FERRAREZI (2006) também encontrou corridas inespecíficas para quelônios, no entanto, além de utilizar o gel de agarose e o de acetato de celulose como triagem hemoglobínica, esses tipos hemoglobínicos inespecíficos foram analisados com técnicas mais aprofundadas (p. ex. cromatografia líquida, eletroforese bidimensional e focalização isoelétrica).

Quanto a análise de correlação entre os níveis de ferro e o aparecimento da migração da HbA₂, não houve resultado positivo, apesar de acordo com EL-AGOUZA et al. (2002) a não migração estaria correlacionada com diminuição de ferro, predispõe a formação globinas do tipo β que compõe a HbA. BAIN (2006) elucida que a diminuição de Hb A₂ é induzida pela falta de ferro está relacionada a um bloqueio gênico dos *loci* (delta) em detrimento dos *loci* (beta) nos cromossomos 11 e 16, onde as globinas da Hb são sintetizadas, com esse processo há uma diminuição na produção de globinas para tipo A₂ para o tipo A, dessa forma, o organismo tenta contornar o processo carencial do ferro, que acarreta na diminuição da produção de hemoglobina total.

KERAMATI & MAYBODI (2007) através da eletroforese em acetato de celulose relatam que foi possível constatar elevação de HbA₂ para níveis normais em pacientes diagnosticados com anemia ferropriva, e tratados com suplementação férrica, e que deste tipo hemoglobínico pode corresponder a severidade da anemia ferropriva, ou seja, a HbA₂ pode ser um marcador carencial. FERRAZ & MURÃO (2007) argumentam que a migração de HbA₂ pode ser sobreposta pela migração da HbA, desta modo faz-se necessário a complementação da análise da hemoglobina com acetato de

celulose, assim como LEPP & BLUESTEIN (1978) afirmam que a eletroforese em gel de agarose é bom método para separação discreta de hemoglobinas do tipo C, F, S, A.

CONCLUSÃO

A migração das hemoglobinas dos leitões ocorre de forma similar o padrão de hemoglobina humana, não houve aparecimento do traçado de HbA2 nos leitões que apresentaram anemia ferropriva, no entanto não houve de correlação positiva entre os níveis de ferro com a ausência da HbA2 através da técnica de eletroforese em agarose.

FONTES DE AQUISIÇÃO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento aa bolsa de mestrado. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo Auxilio Financeiro a Pesquisa – AUPLEX através da Coordenação de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV / Unesp – Campus Jaboticabal pela aquisição das marrãs presente estudo.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA (obrigatório quando envolver animais e organismos geneticamente modificados)

O presente trabalho apoia-se nos seguintes certificados: Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV – UNESP/Jaboticabal) de acordo com o certificado n°. 05824/14 de 2 de abril de 2014, e Avaliação de Pré-Projeto do Programa de Pós-graduação de Medicina Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal, de acordo com processo n°. 044/2014 de 2 de setembro de 2014.

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração hemoglobina média (CHCM) de leitões neonatos nos dias 3, 7, 14 e 21 após o nascimento, sendo o tratamento α - alfa (piso de cimento com suplementação de ferro dextrano injetável), β - beta (piso de terra com suplementação de ferro dextrano injetável), γ - gamma (piso de terra com aplicação de solução salina 0,85%) e δ - delta (piso de cimento com aplicação de solução salina 0,85%).

Dia	Condição	n	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	CHCM (%)
Dia 3	α – Alfa	10	3,5 \pm 0,3	7,2 \pm 0,7	21,6 \pm 2,9	61,3 \pm 3,8	33,2 \pm 1,2
	β – Beta	9	3,9 \pm 0,5	7,6 \pm 1,1	24,9 \pm 3,2	64 \pm 0,9	30,6 \pm 0,9
	γ – Gamma	8	4,0 \pm 0,4	7,0 \pm 0,5	21,2 \pm 1,6	61,2 \pm 1,3	32,9 \pm 0,7
	δ – Delta	15	4,0 \pm 0,4	7,9 \pm 0,7	25,1 \pm 2,5	62,2 \pm 1,7	31,5 \pm 0,6
Dia 7	α – Alfa	9	4,8 \pm 0,2 a	10,5 \pm 0,4 a	31,62 \pm 1,2 a	66 \pm 2,4 a	33,1 \pm 0,7 a
	β – Beta	9	4,5 \pm 0,4 a	10,9 \pm 0,4 a	32,8 \pm 1,2 a	72,5 \pm 4,2 a	33,4 \pm 0,5 a
	γ – Gamma	7	4,3 \pm 0,5 a	10,4 \pm 0,9 a	31,9 \pm 2,7 a	73,9 \pm 4,6 a	32,6 \pm 0,7
	δ – Delta	12	3,9 \pm 0,5 b	5,6 \pm 0,9 b	19,0 \pm 2,2 b	48,9 \pm 1,3 b	30,7 \pm 1,2 b
Dia 14	α – Alfa	9	6,0 \pm 0,3 a	11,8 \pm 0,7 a	36,0 \pm 2,4 a	60 \pm 2,4 a	32,7 \pm 0,4 a
	β – Beta	9	5,7 \pm 0,3 a	12,0 \pm 0,6 a	37,6 \pm 1,9 a	66,3 \pm 2,6 b	32,0 \pm 0,3 a
	γ – Gamma	8	5,0 \pm 0,4 a	10,7 \pm 0,5 b	33,7 \pm 1,8 b	67,7 \pm 4,7 b	31,5 \pm 1,3 a
	δ – Delta	12	3,6 \pm 0,5 b	5,3 \pm 1,0 c	15,3 \pm 2,5 c	42,6 \pm 1,3 c	34,5 \pm 1,5 b
Dia 21	α – Alfa	10	6,2 \pm 0,4 a	12,2 \pm 0,7 a	38,8 \pm 1,9 a	62,2 \pm 2,9 a	31,3 \pm 0,5
	β – Beta	9	6,6 \pm 0,2 a	11,9 \pm 0,4 a	38,5 \pm 1,0 a	58,3 \pm 1,8 a	30,9 \pm 0,2
	γ – Gamma	9	6,6 \pm 0,3 a	12,9 \pm 0,6 a	41,6 \pm 2,3 b	63 \pm 1,8 a	30,9 \pm 0,4
	δ – Delta	12	4,3 \pm 0,8 a	5,40 \pm 1 b	17,1 \pm 3,2 c	40,2 \pm 2,0 b	31,6 \pm 1,2

ⁱ Valores obtidos através de analisador automático ABCVet Counter (ABX Horiba). Os resultados foram analisados de acordo com os valores referenciais eritrocitários de THORN (2012). ⁱⁱ Médias nas mesmas colunas com letras diferentes indicam diferença significativa através do teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro do momento. ⁱⁱⁱ Linha sombreada indica grupo submetido à deficiência de ferro (condição: ambiente de cimento e sem suplementação de ferro ao 3º dia).

Tabela 2 – Concentração ferro sérico e traçado hemoglobínico em eletroforese de agarose de leitões neonatos nos dias 3, 7, 14 e 21 após o nascimento, sendo o tratamento sendo o tratamento α - alfa (piso de cimento com suplementação de ferro dextrano injetável), β - beta (piso de terra com suplementação de ferro dextrano injetável), γ - gamma (piso de terra com aplicação de solução salina 0,85%) e δ - delta (piso de cimento com aplicação de solução salina 0,85%).

Momentos	Condição	n	Ferro ($\mu\text{g/dL}$)	Eletroforese Agarose^{II}
Dia 3	α – Alfa	10	137 \pm 12 a	HbF + HbA
	β – Beta	9	142 \pm 19 b	HbF + HbA
	γ – Gamma	8	132 \pm 13 a	HbF + HbA + Hb?
	δ – Delta	15	158 \pm 5 b	HbF + HbA + Hb?
Dia 7	α – Alfa	9	215 \pm 25 a	HbF + HbA + Hb?
	β – Beta	9	197 \pm 12 a	HbF + HbA + HbA ₂
	γ – Gamma	7	145 \pm 17 a	HbF + HbA
	δ – Delta	12	113 \pm 15 b	HbF + HbA
Dia 14	α – Alfa	9	198 \pm 22 a	HbA+ HbF + HbA ₂
	β – Beta	9	175 \pm 14 a	HbA+ HbF + HbA ₂
	γ – Gamma	8	142 \pm 4 a	HbA + HbF + Hb? + HbA ₂
	δ – Delta	12	87 \pm 16 a	HbA + HbF
Dia 21	α – Alfa	10	153 \pm 10 a	HbA+ HbF + HbS?+ HbA ₂
	β – Beta	9	163 \pm 21 a	HbA+ HbF
	γ – Gamma	9	139 \pm 18 a	HbA+ HbF
	δ – Delta	12	61 \pm 16 a	HbA+ HbF

^I Valores de ferro sérico obtidos através de analisador automático Labmaxx Plenno (Labtest Diagnóstica), considerando como valor referencial 121 \pm 33 $\mu\text{g/dL}$ (KANEKO et al. 2008). ^{II} Tipos hemoglobínicos obtidos através de eletroforetograma em agarose e expressos qualitativamente em relação corrida do padrão humano AS (traço falciforme). ^{III} Médias nas mesmas colunas com letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa através do teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro do momento. ^{IV} Linha sombreada indica grupo submetido à deficiência de ferro (condição: ambiente de cimento e sem suplementação de ferro ao 3º dia).

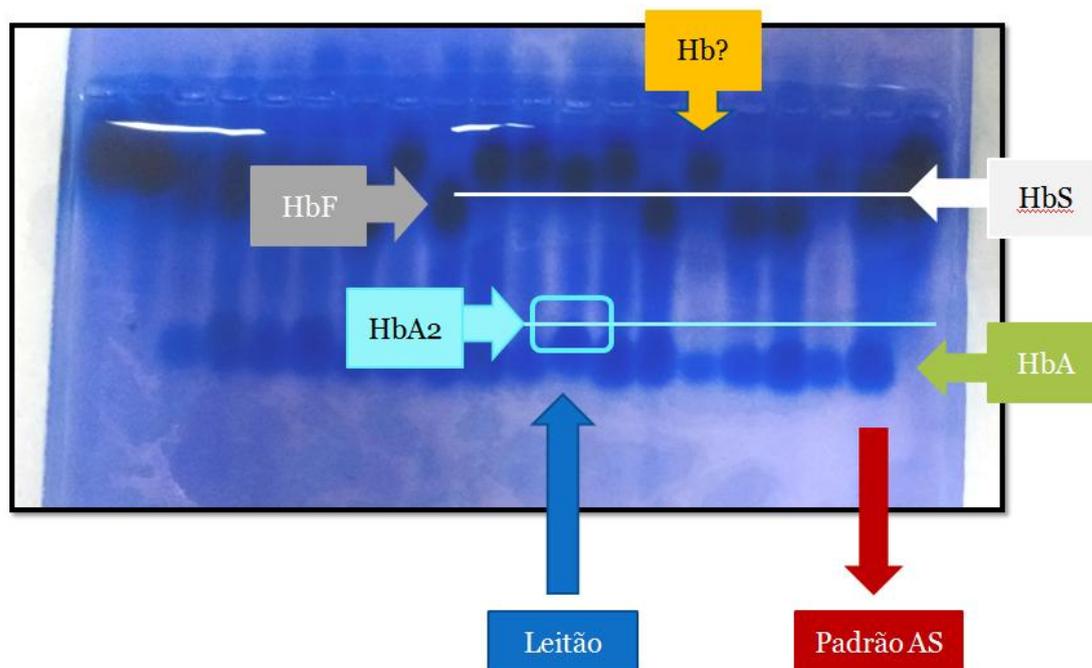


Figura 1. Esquematização da interpretação dos traçados (*lanes*) da eletroforese de hemoglobina. Hemoglobina Adulta (HbA), Hemoglobina S (HbS), Hemoglobina F (Hemoglobina Fetal) e Hemoglobina de traço inespecífico (Hb?). Padrão AS (Hemolisado de sangue humano, que tem tração para hemoglobina S (HbS) e hemoglobina A (HbA), humano com anemia falciforme), Leitão (Amostra de um dos animais do presente estudo). A Hb? é um subtipo hemoglobínico que corre acima do traçado de HbS, considerar o referencial indicada pela linha cinza.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, A. A. F. Causas de mortalidade de leitões neonatos em sistema intensivo de produção de suínos. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 41, n. 2, p.86-91, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95962004000200002&script=sci_arttext. Acesso em 13 jan. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962004000200002>.
- ANTONIDES, A. et al. Pre-weaning dietary iron deficiency impairs spatial learning and memory in the cognitive holeboard task in piglets. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, n. 291, p. 1-16, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2015.00291/abstract>. Acesso em 08 fev. 2016. DOI: [doi: 10.3389/fnbeh.2015.00291](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00291).
- ASADI, F. et al. Serum biochemistry and hematology values and hemoglobin electrophoresis in Persian squirrels (*Sciurus anomalus*). **Vet. Clin. Path**, v. 36, n. 2, p. 187-191, 2008. Acesso em 16 jan. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00207.x>
- BAIN, B. J. Haemoglobins and their structure and function. In: BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis. 2. ed. Massachusetts: Blackwell publishing, 2006. p. 1-5.
- BHATTARAI, S et al. Early indicators of iron deficiency in large piglets at weaning. **Journal of Swine Health and Production**, v. 23, 1, p. 10-17, 2015. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <http://www.aasv.org/shap/issues/v23n1/v23n1p10.html>.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinopatias no Brasil – Variabilidade genética e metodologia laboratorial. 231f. Tese. Sao Jose do Rio Preto: Instituto de Biociencias, Letras e Ciencias Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1993.
- CARVALHO et al. Anemia Ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo de ferro. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 13, p. 54-63, 2006. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <http://www.laboratoriomorales.com.br/infomed/anemias.pdf>.
- DENIC, S. et al. Hemoglobin A2 Lowered by Iron Deficiency and α -Thalassemia: Should Screening Recommendation for β -Thalassemia Change?, **ISRN Hematology**, v. 2013, p. 1-5, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/8582594>.
- EL-AGOUZA, I et al. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. **Clin. Lab. Haem.** 2002, 24, 285–289. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2257.2002.00464.x>.
- ELLIOTT, D. A; NELSON, R. W; FELDMAN, E. C; AND NEAL, L. A. Glycosylated hemoglobin concentrations in the blood of healthy dogs and dogs with naturally developing diabetes mellitus, pancreatic β -cell neoplasia, hyperadrenocorticism, and anemia. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v. 211, p. 723 – 727, 1997.
- FERRAZ, M. H; MURAO, M. Diagnostico laboratorial da doença falciforme em neonatos e apos o sexto mes de vida. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 29, p. 218-222, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.590/S1516-84842007000300005>.
- FIGHEIRA, R. A.; SOUZA, T. A.; LANGORHR, I, BARROS, C. S. Intoxicação experimental por cebola, *Allium cepa* (Liliaceae) em gatos. **Pesq. Vet. Bras**, v. 22, n. 2, p. 79-84, 2002.
- GIAMBONA, A. et al. The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1786–1796, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.06.026>

- GOODNOUGH, L. T. et al. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. **Blood**, v. 96, p. 823-833, 2000. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/96/3/823?sso-checked=true>>.
- HARVEY, J. W. Evaluation of hemostasis: coagulation and platelet disorders. cap. 7. p. 225. In: _____ . HARVEY, J W. **Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas**. ELSEVIER: St. Louis, 2012. p. 225.
- HAY, G. et al. Iron status in a group of Norwegian children aged 6-24 months. **Acta paediatr**, v. 93, p. 592-598, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2004.tb02983.x>.
- HEIENE, R; VULLIET, P. R; WILLIAMS, R. L; COWGILL, L. D. Use of capillary electrophoresis to quantitate carbamylated hemoglobin concentrations in dogs with renal failure . **A m. J. Vet. Res.** v. 62 , 1302 – 1306, 2001.
- HIGGINS , P. J; GARUCK , R. L; BUNN , H. F. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability . **Diabetes**, v. 31, p. 743 – 748, 1982.
- KADIKOYLU, G. et al. Platelet parameters in women with iron deficiency anemia. **J Natl Med Assoc**, v. 98, p. 398-402, 2006. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16573304>>.
- KEMPE, D. S. et al. Enhanced programmed cell death of iron deficient erythrocytes. **FASEB J**, v. 20, p. 368-370, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.05-4872fje>.
- KERAMATI, M. R; MAYBODI, N. T. The effect of iron deficiency anemia (IDA) on the HbA₂ level and comparison of hematologic values between IDA and thalassemia minor. **UHOD**, v. 17, 2007. p. 151-156. DOI: <http://dx.doi.org/11/2006.224860584>.
- LANG, F. et al. Mechanisms and significance of eryptosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, p. 1183-1192, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2006.8.1183>.
- LEEP, C. A; BLUESTEIN, B. I. Hemoglobin Electrophoresis at Alkaline pH on Agarose Gels. **Clin. Chem.** v. 24, n 6, p. 936-937, 1978.
- LEPP, C. A.; BLUESTEIN, B. I. Hemoglobin electrophoresis at alkaline pH on agarose gels. **Clin. Chem**, v. 24, n. 8, p. 936-937, 1978. Disponível em: <<http://www.clinchem.org/content/24/6/936.full.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2016.
- LHGDH, LABORATÓRIO DE HEMOGLOBINAS E GENÉTICAS DAS DOENÇAS HEMATOLÓGICAS. **Protocolos de metodologias laboratoriais clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias**. São José do Rio Preto: IBLCE / UNESP, 2003.
- LOO, M. BEGUIN, Y. The effect of recombinant human erythropoietin on platelet counts is strongly modulated by the adequacy of iron supply. **Blood**, v. 93, p. 3268-3293, 1999. DOI: [http://dx.doi.org/0006-4971/99/9310-0030\\$3.00/0](http://dx.doi.org/0006-4971/99/9310-0030$3.00/0)
- LOYNACHAN, A. T. Cardiovascular and hematopoietic systems. In: Zimmerman, J. J. **Disease of swine**. 10. ed. England: John Wiley & Sons, 2012. P. 196-197.
- McLean E. et al. **Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia**. Geneva: WHO, 2009. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43894/1/9789241596657_eng.pdf>. p. 10-15.
- MORES, N. et al. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: Sobestiansky, J. **Suinocultura intensiva : produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 147-148.
- MOSCA, A. et al. New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA₂ borderline subjects in the screening for beta-thalassemia. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 137-140, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.010>
- NAOUM, P. C. **Diagnóstico das hemoglobinopatias**. São Paulo: Sarvier, 1987.

- NUNES, R. C. et al. Uso do ferro dextrano e acesso controlado e livre à terra no desempenho e prevenção da anemia ferropriva dos leitões. **Anais Esc. Agron. e Vet.**, v. 27, p. 49-55, 1997.
- OZDEMIR, H. et al. Iron deficiency anemia in late-preterm infants. **The Turkish Journal of Pediatrics**, 2013, 55: 500-505. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.turkishjournalpediatrics.org/?fulltextId=1245&lang=eng>>.
- RYTYCH et al, Early Life Iron Deficiency Impairs Spatial Cognition in Neonatal Piglets. *The Journal of Nutrition Ingestive Behavior and Neurosciences*. DOI: <http://dx.doi.org/10.3945/jn.112.165522> 2012. P.2050-2056.
- SANTANA, A. E. **Estudo do quadro hemático de leitões alimentados com diferentes fontes de ferro**. Dissertação. Belo Horizonte: UFMG, 1982.
- SHIHABI, Z. K; HINSDALE, M. E. Simplified hemoglobin chain detection by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, p. 581-585, 2005. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15690430>>.
- STARZYNSKI et al. Iron supplementation in suckling piglets: how to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. **Plos one**, v. 8, p. 1-5, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064022
- SUBRAMANIAM, N. et al. Clinicohematological study of thrombocytosis in children. **ISRN Hematology**, v. 389257, p. 1-4, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/389257>.
- TAKETA , F.; ATTERMEIER , M. H.; MAUK , A. G. Acetylated hemoglobins in feline blood . **J . Biol. Chem**, v. 247, p. 33 – 35, 1972.
- THORN, C. E. Normal hematology of the pig. cap. 168. In: FELDMAN, B. F; ZINKL, J. G; JAIN, N. C. **Schalm's: Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2008. p. 1089-1095.
- VOUDOUKIS, E. et al. Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, p. 1212-1216, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e328363e354>.
- WANG, J. et al. Influence of organic iron complex on sow reproductive performance and iron status of nursing pigs. **Livestock Science**, v. 160, p. 89-86. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.024>.
- WHO. Assessing the iron status of population. p. 5-7. 2. ed. Geneva: WHO, 2004. Acesso em 16 jan. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596107/en/>.
- WILD, B. J; BAIN, B. J. Investigação de hemoglobinas anormais e talassemias. cap. 12. p. 217-249. In: BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ZAGO, C. E. S. Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanun*, Testudines) in the northwestern region of Sao Paulo State, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 9, 2, p. 721-726, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/vol9-2gmr731>.
- ZANDECKI, M., et al. Spurious counts and spurious results on hematology analyzers: a review. Part II. White blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. **Int J Lab Hematol**, v. 29, p. 21-41, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.0087.x>.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste ensaio, pode-se investigar o comportamento da molécula de hemoglobina, em leitões ferropênicos, através do uso da eletroforese em agarose. A migração das hemoglobinas dos leitões ocorre de forma similar quando analisamos a HbA humana, contudo não teve-se correlação positiva entre o aparecimento da deficiência de ferro com diminuição dos níveis de HbA₂ quando utilizado a eletroforese em agarose.

O presente estudo inspira os autores a estudar o comportamento da hemoglobina não apenas pela técnica da agarose, mas utilizando outras amplamente utilizadas no estudo de hemoglobinopatias humanas (acetato de celulose, poliacrilamida, focalização isoelétrica e cromatografia líquida).

Outro fato ponto do estudo foi a trombocitose nos leitões quanto apresentaram deficiência de ferro e na anemia ferropriva, que segundo as literaturas citadas pode estar relacionada com a ação da eritropoetina que é liberada pela estimulação do processo da hipóxia devido anemia. O processo dessa estimulação da eritropoetina no eixo megacariopoiético em suínos, ainda não é bem esclarecido.

O modelo de investigação utilizou-se de uma espécie animal que reproduz com fidedignidade o quadro fisiopatogênico da anemia ferropriva e, portanto, deverá contribuir para um melhor entendimento da hemoglobina na dimensão da prática médica veterinária, especialmente daquela consagrada aos suínos.

ANEXO

Normas de Publicação da Revista Ciência Rural

Normas



ISSN Eletrônico: 1678-4596

Português | English | Esp

Página inicial Artigos no prelo Artigos publicados Indexação Consultores
 Fale conosco Iniciar submissão Iniciar avaliação Normas Quem somos Taxas

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados preferencialmente em idioma Inglês. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR. **As despesas de tradução serão por conta dos autores.** Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

6. O preenchimento do campo "cover letter" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, exceto para artigos submetidos em português (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

10.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery.** Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros.** Manaus : INPA, 1979. 95p.

10.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid.** Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

10.3. Capítulo de livro sem autoria:

Normas

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Wiley, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

10.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

10.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

10.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

10.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

10.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

10.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Grifon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINÁRIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

11. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

12. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (com decisão de **Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa "Cross Check".



Ciência Rural
Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais
Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil
E-mail: cienciarural@mail.ufsm.br
Fone/Fax: (55) 32208698
Fax: (55) 32208695