*REVISTA CAATINGA — ISSN 0100-316X*
*UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO (UFERSA)*
*Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação*



# DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES DE HEMOGLOBINA EM OVINOS MESTIÇOS SANTA INÊS

*Rômulo Morais de Lacerda*
Médico Veterinário, Cajazeiras, PB

*Benito Soto-Blanco*
Prof. Adjunto, UFERSA, Departamento de Ciências Animais, CEP 59.625-900, Mossoró-RN, e-mail soto-blanco@ufersa.edu.br

**RESUMO –** O conhecimento das variantes de hemoglobina poderá auxiliar futuramente na seleção de animais, servindo como um marcador genético. O presente trabalho teve como objetivo determinar as variações de hemoglobinas em ovinos mestiços Santa Inês, bem como suas correlações com os parâmetros do eritrograma. Foram coletadas 49 amostras de sangue de ovinos mestiços Santa Inês considerados clinicamente sadios, do município de Mossoró, RN. Estas amostras foram utilizadas para a determinação do hematócrito, a contagem do número de hemácias, a dosagem da hemoglobina, o cálculo dos índices hematimétricos absolutos (volume corpuscular médio – VCM, hemoglobina corpuscular média - HCM, e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM) e a separação das hemoglobinas por eletroforese. A eletroforese das hemoglobinas revelou uma banda lenta caracterizada como hemoglobina A (HbAA), uma banda rápida caracterizada como hemoglobina B (HbBB) e duas bandas no heterozigoto para hemoglobinas A e B (HbAB). A variante HbAB foi a mais freqüentemente encontrada, mas todas as variantes observadas estavam em proporções significativas. A avaliação estatística para comparação entre os tipos de hemoglobina para cada parâmetro do eritrograma revelou diferença significante no HCM; os demais parâmetros não apresentaram diferença significante. Assim, as variações de hemoglobinas (HbAA, HbBB e HbAB) não influenciam no eritrograma dos ovinos.
**Palavras-chave**: Variante de hemoglobina, polimorfismo de hemoglobina, eritrograma, ovinos

# DETERMINATION OF HEMOGLOBIN TYPES IN SANTA INES CROSSBREED SHEEP

**ABSTRACT –** The knowledge of hemoglobin types may help in near future the selection of animals, serving as a genetic marker. The present work aimed to determine the types of hemoglobin in Santa Ines crossbreed sheep, and verify whether it has correlation with the erythron. It were collected 49 blood samples from different healthy Santa Ines crossbreed sheep, from Mossoró city, RN, Brazil. These samples were used for determination of packed cell volume, red blood cells counts, hemoglobin concentration, hematimetric indices (mean corpuscular volume – MCV, mean corpuscular hemoglobin – MCH, and mean corpuscular hemoglobin concentration - MCHC), and electrophoretic separation of hemoglobin. The electrophoresis revealed a slow band characterized as hemoglobin A (HbAA), a fast band characterized as hemoglobin B (HbBB) and both bands in the heterozygous hemoglobin A and B (HbAB). The type HbAB was the most frequently found, but all found types were present at representative amounts. The statistical analysis for comparison between the hemoglobin parameters and each parameter of the erythron revealed significant difference only for MCH; the other measurement were not statistically different. Thus, the hemoglobin types (HbAA, HbBB e HbAB) did not influence the erythron of sheep.
**Key Words**: Hemoglobin type, hemoglobin polymorphism erythron, sheep

## INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína conjugada com peso molecular da ordem de 68.000 Daltons, composta por uma proteína simples, a globina, e quatro núcleos prostéticos do tipo porfirina, o heme. A produção da hemoglobina ocorre no interior dos eritroblastos da medula óssea (NAOUM, 1997). No entanto, muitas patologias resultam em síntese química anormal de hemoglobina, com capacidade de ligação ao oxigênio diminuída. Além das hemoglobinopatias, há muitas toxinas comuns, incluindo monóxido de carbono e nitratos, que causam alterações potencialmente letais por agirem na capacidade da hemoglobina de ligar-se ao oxigênio. As alterações que envolvem as globinas devem-se a modificações em genes responsáveis pela seqüência e estrutura das cadeias polipeptídicas, bem como aos genes reguladores da síntese destas cadeias. Hemoglobinas variantes apresentam estrutura química diferente da hemoglobina normal correspondente, resultante de mutações em uma ou mais bases nitrogenadas, ocasionando a troca

de aminoácidos nas globinas alfa, beta, delta ou gama (NAOUM, 1997; BONINI DOMINGOS *et al*., 2003).

A realização da eletroforese de hemoglobinas permite a identificação das diferentes frações normais e patológicas da hemoglobina. É um método importante para investigar a presença das hemoglobinas anormais, como a hemoglobina S e C, e nas talassemias, que podem cursar com aumento da HbA2 e com a presença da HbH. Permite também a quantificação das frações normais da hemoglobina como A, A2 e Fetal. As frações podem ser quantificadas por densitometria. A eletroforese é realizada em pH alcalino e pode ser realizada, de forma complementar, também em pH ácido para melhor identificação de algumas hemoglobinopatias, já que outras frações anormais podem migrar na mesma posição das hemoglobinas S e C como as HbD e HbE (NAOUM, 1997; LEONELI *et al*., 2000; ZAMARO *et al*., 2002; BANDEIRA *et al*., 2003).

O estudo do polimorfismo da hemoglobina possui significância para a determinação de variantes presentes na população avaliada, bem como para o diagnóstico de variantes patológicas (NAOUM, 1997; ALVES *et al*., 2003). Além disto, alguns estudos em animais têm verificado correlação direta entre o tipo de hemoglobina com resistência ao parasitismo por nematódeos gastrintestinais (ALTAIF & DARGIE, 1978; PRESTON & ALLONBY, 1979; BUVANENDRAN *et al*., 1981), intensidade da resposta imune (CUPERLOVIC *et al*., 1978) e parâmetros produtivos como eficiência reprodutiva e produção de lã e leite (DALLY *et al*., 1980). Além disto, a determinação da variante de hemoglobina pode ser um dos parâmetros genéticos empregados em estudos de identificação de indivíduos e de parentesco (SMITH, 1996). Neste sentido, futuramente estas variantes poderiam ser utilizadas como um dos parâmetros auxiliares para a seleção de novos animais, servindo como um dos marcadores genéticos ligados a aspectos de interesse produtivo. No entanto, ainda não foi comprovado se a determinação da variante de hemoglobina realmente pode servir como um marcador genético eficaz. É necessária, portanto, a identificação das variantes de hemoglobina existentes no rebanho, para que se possa determinar qual o tamanho da população a ser empregada de forma satisfatória nestes estudos. No Brasil há poucos dados sobre a diversidade de hemoglobina no rebanho ovino.

O presente trabalho tem por objetivo determinar as variantes de hemoglobinas que ocorrem em ovinos mestiços Santa Inês criados na região do Município de Mossoró, Rio Grande do Norte, bem como suas correlações com os parâmetros do eritrograma.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 49 amostras de sangue de ovinos mestiços Santa Inês considerados clinicamente sadios, do Município de Mossoró-RN. As amostras de sangue foram colhidas por meio de punção da veia jugular, em frascos com anticoagulante (EDTA), utilizando-se agulhas para coleta a vácuo calibre 25 x 8. As amostras foram levadas imediatamente após a coleta ao laboratório, onde foram realizados os seguintes exames: determinação do hematócrito, contagem do número de hemácias, dosagem da hemoglobina, cálculo dos índices hematimétricos absolutos (volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média - HCM, concentração hemoglobínica corpuscular média - CHCM) e separação das hemoglobinas por eletroforese.

A separação eletroforética das hemoglobinas foi realizada com o auxílio de sistema para eletroforese (Sistema para Eletroforese SE-250, Celm), utilizando o kit específico para eletroforese de hemoglobina em meio alcalino não denaturante (CelmGel Hemoglobina Alcalina, Celm). Após a corrida, o gel foi seco e corado com Pouceau, e o excesso do corante removido em solução de ácido acético a 5%. Os géis foram digitalizados e as bandas foram identificadas utilizando-se programa específico (DensitScan®).

Os resultados estão apresentados na forma de média seguida pelo respectivo desvio-padrão. As médias dos valores obtidos nos animais, agrupados segundo o tipo de hemoglobina, foram comparadas utilizando a análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas pareadas de Dunn. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliação de correlação entre os diferentes parâmetros do eritrograma. O nível de significância estatística foi estabelecido como $p<0,05$. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *software* Sigma Stat versão 1.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese das proteínas revelou uma banda lenta caracterizada como hemoglobina A

(HbAA), uma banda rápida caracterizada como hemoglobina B (HbBB) e duas bandas caracterizadas como heterozigoto para hemoglobinas A e B (HbAB) (Figura 1). Os mesmos tipos de hemoglobina também foram

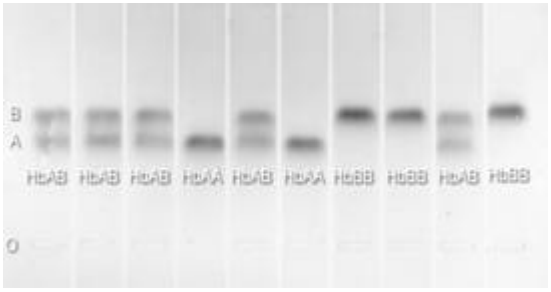



Figura 1. Gel de eletroforese em meio alcalino para separação das variantes de hemoglobina de ovinos mestiços Santa Inês, mostrando as bandas das hemoglobinas A e B, a origem da corrida (O) e os fenótipos homozigotos para hemoglobina A (HbAA) e para B (HbBB) e heterozigoto (HbAB).

encontrados em diferentes raças de ovinos (MOSTAGHNI, 1978; SOTOMAIOR & THOMAZ-SOCCOL, 1998). Estas mesmas variantes também podem ser encontradas em bovinos (DI VITO *et al*., 2002) e caprinos (HUISMAN *et al*., 1969). No entanto, ainda há duvidas se estas variantes de hemoglobina apresentam ou não diferenças funcionais para o transporte de oxigênio. Neste sentido, Dodgson & Holland (1983) encontraram diferenças na capacidade de dissociação do oxigênio entre as variantes HbA e HbB. Por outro lado, Di Vito *et al*. (2002) não encontraram diferenças na afinidade das HbAA, HbBB e HbAB pelo oxigênio.

Das 49 amostras de sangue analisadas, 10 (20,4%) apresentaram HbAA, 14 (28,6%) apresentaram HbBB e 25 (51%) apresentaram HbAB. Entretanto, estas freqüências foram bastante diferentes daqueles encontrados em ovelhas mestiças Suffolk, sendo a maioria (80,1%) do tipo HbBB, 17,02% do tipo HbAB e apenas 2,84% eram HbAA (SOTOMAIOR & THOMAZ-SOCCOL, 1998). Em ovinos das raças iranianas Baloochi e Kordi, foram encontradas apenas HbAA e HbAB, não sendo verificada a presença da HbBB; a HbAA foi a mais freqüente em ambas as raças (MOHRI *et al*., 2005). Por outro lado, há raças de ovinos que apresentam HbBB e HbAB, mas não HbAA (MOSTAGHNI, 1978). Estas diferenças nas freqüências das variantes de hemoglobina estão claramente associadas às diferenças raciais.

Os valores do eritrograma dos ovinos avaliados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 1. Assim, pode-se verificar que houve correlação entre os valores de eritrócitos com os demais parâmetros, entre hemoglobina com hematócrito e entre os três índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM). Estes resultados são similares aos obtidos anteriormente em ovinos de outras raças (MOHRI *et al*., 2005), confirmando a relação entre os parâmetros do eritrograma.

Tabela 1. Avaliação da correlação entre hemoglobina (HB – em mg/dl), hematócrito (HT – em %), número de eritrócitos (HE – em células/mm$^3$), volume corpuscular médio (VCM – em fl), hemoglobina corpuscular média (HCM – em pg) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM – em g/dl) de ovelhas mestiças Santa Inês. São apresentados o coeficiente de correlação (r) e o respectivo valor de P (teste de correlação de Pearson).

| | HT | HE | VCM | HCM | CHCM |
|---|---|---|---|---|---|
| HB | 0,824 | 0,408 | 0,197 | 0,257 | -0,216 |
| | <0,0001 | 0,0036 | 0,174 | 0,075 | 0,137 |
| HT | | 0,471 | 0,236 | 0,068 | -0,280 |
| | | 0,0006 | 0,103 | 0,644 | 0,051 |
| HE | | | -0,715 | -0,745 | 0,704 |
| | | | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 |
| VCM | | | | 0,921 | -0,961 |
| | | | | <0,0001 | <0,0001 |
| HCM | | | | | -0,865 |
| | | | | | <0,0001 |

Os parâmetros do eritrograma para cada variante de hemoglobina estão apresentados na Tabela 2. A avaliação estatística para comparação entre os tipos de hemoglobina para cada freqüentemente encontrada. No entanto, o tipo de variante de hemoglobina não influenciou o eritrograma dos ovinos.

Tabela 2 - Níveis séricos de hemoglobina (HB – em mg/dl), hematócrito (HT – em %), número de eritrócitos (HE – em células/mm$^3$), volume corpuscular médio (VCM – em fl), hemoglobina corpuscular média (HCM – em pg) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM – em g/dl) de ovinos mestiços Santa Inês separados em grupos seguindo o tipo de hemoglobina. Os dados estão apresentados em media e desvio-padrão.

| Tipo | n | HB | HT | HE | VCM | HCM | CHCM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HbAA | 10 | 10,7±1,66 | 30,8±5,85 | 9,2±2,86 | 34,8±5,13 | 12,2±2,09[a] | 29,4±4,88 |
| HbAB | 25 | 10,9±1,39 | 31,3±4,45 | 9,5±2,17 | 34,2±8,42 | 11,9±3,05[a] | 30,7±6,80 |
| HbBB | 14 | 10,1±1,71 | 30,2±5,15 | 10,3±1,29 | 29,7±5,32 | 9,9±1,66[b] | 34,7±6,11 |

n: número de animais
[a,b]: letras diferentes indicam médias com diferença significante ($p<0,05$), ANOVA seguida pelo teste de Dunn.

parâmetro do eritrograma revelou diferença significante no HCM, entre os animais com HbBB e os com HAA e HbAB; nos demais parâmetros não foram observadas diferenças significantes. Estes dados corroboram com aqueles obtidos por Mohri *et al*. (2005), que não encontraram diferenças no hematócrito, quantidade de hemoglobina e número de eritrócitos em ovinos HbAA e HbAB. Assim, como o HCM não possui importância para a interpretação hematológica em medicina veterinária (FIGHERA, 2001), podemos afirmar que o tipo de hemoglobina nos ovinos não possui influência significante no eritrograma destes animais.

Alguns autores verificaram uma associação entre a ocorrência HbAA e resistência a parasitas gastrintestinais (ALTAIF & DARGIE, 1978; PRESTON & ALLONBY, 1979; BUVANENDRAN *et al*., 1981). No entanto, outros autores não encontraram correlação entre a parasitose gastrintestinal e o tipo de hemoblobina (YAZWINSKI *et al*., 1980; KASSAI *et al*., 1990; SOTOMAIOR & THOMAZ-SOCCOL, 1998). Assim, são necessários trabalhos de pesquisa procurando comprovar a ocorrência ou não desta associação, pois em caso positivo poderá ser utilizado como parâmetro para seleção de ovinos com maior resistência a parasitoses.

## CONCLUSÕES

Os ovinos mestiços Santa Inês estudados apresentaram três tipos de hemoglobinas, caracterizadas como HbAA, HbBB e HbAB, sendo a variante HbAB foi a mais

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Erinaldo Freire Amorim pelo auxílio técnico dado ao trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAIF, K.I.; DARGIE, J.D. Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on response of sheep to reinfection with *Haemonchus contortus.* **Parasitology**, London, v.77, p.177-187, 1978.

ALVES, R.T.; MATTOS, L.C.; FERRARI, F.; BONINI-DOMINGUES, C.R. Avaliação do polimorfismo de grupos sangüíneos e fenótipo de hemoglobinas em um grupo de universitários de São José do Rio Preto, SP. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.25, n.1, 65-71, 2003.

BANDEIRA, F.M.G.C.; LEAL, M.C.; SOUZA, R.R.; FURTADO, V.C.; GOMES, Y.M. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. **Revista Brasileira de Saúde Maternal e Infantil**, Recife, v.3, n.3, p.265-270, 2003.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; SILVEIRA, E.L.V., VIANA-BARACIOLI, L.M.S.; CANALI, A.A. Caracterização de hemoglobina N – Baltimore em doador de sangue de São José do Rio Preto, SP. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p.41-44, 2003.

BUVANENDRAN, V; SOORIYAMOORTHY, T.; OGUNSUSI, R.A.; ADU, I.F. Haemoglobin polymorphism and resistance to helminths in red Sokoto goats. **Tropical Animal Health and Production**, Boston, v.13, p.217-221, 1981.

CUPERLOVIC, K.; ALTAIF, K.I.; DARGIE, J.D. Genetic resistance to helminths: a possible relationship between haemoglobin type and the immune response of sheep to non-parasitic antigens. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.25, p.125-126, 1978.

DALLY, M.R.; HOHENBOKEN, W.; THOMAS, D.L.; CRAIG, A.M. Relationships between hemoglobin type and reproduction, lamb, wool and milk production and health-related traits in crossbred ewes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.50, p.418-427, 1980.

DI VITO, A.; SCHWANTES, A.R.; SCHWANTES, M.L.B. Functional properties of the three hemoglobin phenotypes of Nelore cattle. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p.135-138, 2002.

DODGSON, S.J.; HOLLAND, R.A. The reaction kinetics of four sheep haemoglobins with identical alpha-chains. **Respiratory Physiology**, Amsterdam, v.53, p.31-45, 1983.

FIGHERA, R. A. **Anemia em Medicina Veterinária.** Santa Maria: Editora Pallotti, 2001. 214p.

HUISMAN, T.H.J.; LEWIS, J.P.; BLUNT, H.M.; ADAMS, H.R.; MILLER, A.; DOZY, A.M.; BOYD, E.M. Hemoglobin C in newborn sheep and goats: a possible explanation for its function and biosynthesis. **Pediatric Research**, Basel, v.3, p.189-198, 1969.

KASSAI, T.; FÉSÜS, L.; HENDRIKX, W.M.L.; TAKÁTS, Cs.; FOK, É.; REDL, P.; TAKÁCS, E.; NILSSON, R.; van LEEUWEN, M.A.W.; JANSEN, J.; BERNADINA, W.E.; FRANKENA, K. Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental *Haemonchus contortus* infection in Merino lambs? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.37, p.61-77, 1990.

LEONELI, G.G.; IMPERIAL, R.E.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.22, n.3, p.396-403, 2000.

MOHRI, M.; JANNATABADI, A.A.; ASLANI, M.R.. Studies on haemoglobin polymorphism of two breeds of Iranian sheep and its relationship to concentrations of iron, copper, haemoglobin and RBC number. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.29, p.305-312, 2005.

MOSTAGHNI, K. Studies on haemoglobin variants and some blood minerals of different breeds of Iranian sheep. **Journal of Veterinary Medicine A**, Berlin, v.25, p.647-651, 1978.

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.

PRESTON, J.M.; ALLONBY, E.W. The influence of haemoglobin phenotype on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.26, p.140-144, 1979.

SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais.** São Paulo: Manole, 1996. 1738p.

SOTOMAIOR, C.S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Estudo do tipo de hemoglobina como auxiliar na seleção de ovinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.3, n.1, p.51-55, 1998.

YAZWINSKI, T.A.; GOODE, L.; MONCOL, D.J.; MORGAN, G.W.; LINNERUD, A.C. *Haemonchus contortus* resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.51, n.2, p.279-284, 1980.

ZAMARO, P.J.A.; CANALLI, A.A.; SILVA JÚNIOR, W.J.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.38, n.4, p.261-266, 2002.