

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EXIGÊNCIAS DE FERRO PARA REPRODUTORAS PESADAS

Anelise dos Santos Klein

Porto Alegre

2014/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EXIGÊNCIAS DE FERRO PARA REPRODUTORAS PESADAS

Autor: Anelise dos Santos Klein

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção da Graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Sergio Luiz Vieira
Coorientadora: Catarina Stefanello

Porto Alegre

2014/1

AGRADECIMENTOS

O ser humano não foi criado para viver só, se cheguei até aqui foi porque tive várias pessoas pelo caminho que me apoiaram.

Quero agradecer a minha família pela educação que me deram. Obrigado mãe por cuidar com tanto carinho dos meus cadernos de criança, por encapar meus livros, por ser por tantas vezes dura comigo para que eu desse o meu melhor em tudo. Tu pode não ter diploma, mas é professora me ensinou a “ser gente” como tu mesma diz. Obrigada pai por todos os churrascos de domingo, pelas caronas até os tantos estágios e plantões, pelos sacrifícios financeiros e por me ensinar desde criança a amar os animais. A minha irmã por torcer por mim, mesmo sem demonstrar muito, e por me dar uma fonte de amor inesgotável, minha sobrinha Isabelli. Minhas queridas Meg e Lola por seu amor incondicional.

Aos mestres, orientadores que fizeram de suas exigências desafios que certamente me ajudarão a enfrentar a vida fora dos muros da universidade.

Sou grata aos amigos que encontrei em meio a esse caminho pelo seu poder de amenizar os dias duros de provas e atividades. Com certeza terei muita história para contar de todos os dias e noites passados no DAFV.

“Está escrito nos livros que somos feitos de argila e sonho. Lentamente a sucessão dos anos submete a argila assim como o vento faz curvar a árvore que plantaste, mas força alguma pode dobrar o sonho.”

(Liberato Viera da Cunha)

RESUMO

A produção de carne de frangos representa uma importante fonte de proteína para a alimentação humana. Para tornar esta produção mais competitiva e eficiente, diversos avanços nas áreas de genética, sanidade e nutrição objetivam, entre outros fatores, a maior eficácia na produção de ovos férteis pelas matrizes reprodutoras pesadas. As exigências de microminerais para matrizes de frangos de corte ainda necessitam maiores estudos para sua adequada determinação. Neste contexto, o ferro é um mineral essencial ao organismo das aves por participar de vários processos metabólicos, principalmente o transporte de oxigênio e as reações de oxirredução. Sua disponibilidade nos ingredientes vegetais que compõem a dieta é restrita por estar na forma quelatada e complexado ao fitato, o que dificulta sua absorção. Na formulação de dietas vegetais, a suplementação de ferro é feita através da adição de sulfato ferroso ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), entretanto estudos recentes fazem referência à utilização de minerais orgânicos, considerados fontes de Fe de elevada biodisponibilidade. Assim, uma das formas mais usuais para a determinação da concentração de ferro no organismo e células animais é através de exames hematológicos. No entanto, a colheita de sangue para hemograma não é um procedimento usual na avicultura, pois as células sanguíneas das aves divergem das células de mamíferos em vários aspectos, o que dificulta a inserção das amostras dentro da rotina laboratorial veterinária. Dessa forma, nota-se a importância do conhecimento do perfil hematológico das aves, o qual pode auxiliar na determinação de uma suplementação mineral adequada as necessidades das aves, visto que o aumento do ferro disponível pode acarretar maior produtividade de matrizes reprodutoras pesadas, pois pode permitir um aumento da expressão das características genéticas selecionadas nos programas de melhoramento animal.

Palavras chave: matrizes pesadas, ferro, hematologia, minerais orgânicos.

ABSTRACT

The production of chicken meat represents an important source of protein for human consumption. To make this production each day more competitive and efficient, many advances in genetics, health and nutrition aims to, among other factors, the increased efficiency in the production of fertile eggs for broiler breeders hens. The requirements of micro minerals for those animals still need further studies for its proper determination. Iron is an essential mineral for the body by participate in various metabolic processes, especially in oxygen transport and redox reactions. Its availability in vegetable ingredients that make up the diet is restricted by in chelated form and complexed to phytate hindering its absorption. Usually supplementation iron dietary is made through the addition of ferrous sulphate ($Fe_2(SO_4)_3$), however, more recent studies indicate sources of Fe with higher bioavailability as organic minerals. One of the most usual ways to determine the amount of iron in an organism is through haematological exams. The blood sampling for hemogram is not a usual procedure in poultry, because the blood cells of birds differ of the mammalian cells in several aspects, hindering the insertion of samples within the veterinary laboratory routine. Knowledge of haematological profile of birds can help formulate a mineral supplementation appropriate to their needs. The increase in available iron can result in gains in productivity of matrices, because it allows increased expression of the selected genetic traits in the programs of animal improvement.

Keywords: broiler breeders, iron, hematology, organic minerals.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	FERRO	09
2.1	O papel do ferro no metabolismo	09
2.2	Absorção do ferro no metabolismo	09
2.3	Homeostase do ferro	10
2.3.1	Regulação do ferro intracelular	10
2.3.2	Regulação do ferro sistêmico	11
2.4	Armazenamento do ferro	12
2.5	Transporte do ferro	13
2.6	Fontes de ferro	14
2.6.1	Minerais orgânicos	14
2.6.2	Uso da farinha de carne e ossos em reprodutoras	15
2.7	Efeitos da suplementação de ferro no desempenho das matrizes pesadas.	16
3	AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM AVES	16
3.1	Colheita de sangue em aves	16
3.2	Processamento das amostras	18
3.3	Métodos de contagens celulares	18
3.3.1	Contagem manual	19
3.4	Morfologia dos eritrócitos de aves	20
3.5	Interpretação do hemograma	21
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

O ferro (Fe) é um mineral essencial ao organismo animal, pois é um elemento essencial em diversos processos metabólicos. O ferro dietético pode ser classificado em duas formas distintas: Fe heme e Fe não heme (inorgânico). Entretanto, as dietas para reprodutoras de frangos de corte são geralmente suplementadas com o ferro na forma não heme, que possui uma menor biodisponibilidade. A inclusão de produtos de origem animal, principalmente farinha de carne e ossos, na formulação das dietas é a forma de incorporar o ferro heme na alimentação das matrizes, enquanto o ferro não heme é fornecido, principalmente, por ingredientes vegetais e suplementos minerais. Apesar de essa ser uma fonte de ferro de maior valor biológico, a possível contaminação das farinhas de origem animal, em especial com *Salmonella*, coloca em dúvida os benefícios de sua utilização.

Estudos envolvendo exigências nutricionais de ferro para matrizes pesadas são escassos, devido à complexidade de sua função e também pela sua presença nos ingredientes das rações para aves e seu baixo custo de suplementação. A existência de poucos trabalhos envolvendo pesquisas de determinação dos níveis de ferro nas dietas tem prejudicado o entendimento e causado confusão entre as recomendações presentes nas tabelas de composição de alimentos. Por isso, a correta determinação das exigências nutricionais torna-se cada vez mais fundamental.

Adicionalmente, o correto monitoramento da quantidade de ferro presente no organismo pode ser uma ferramenta útil para determinação das reais exigências das matrizes. Neste contexto, as análises hematológicas em aves possuem como principal peculiaridade o fato das células sanguíneas diferirem em diversos aspectos das células de mamíferos e estas diferenças dificultam o processamento das amostras e a sua inserção na rotina laboratorial veterinária.

Devido à seleção genética de linhagens avícolas com uma produção de ovos maior é esperado que ocorra um aumento na demanda de ferro nas dietas de matrizes. O aumento da disponibilidade desse mineral pode afetar positivamente o ciclo produtivo, o conteúdo de ferro nos diferentes componentes do ovo e também no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, o presente estudo visa reunir dados que demonstram os efeitos da presença de ferro de diferentes fontes e níveis de suplementação em dietas para matrizes reprodutoras pesadas, levando em consideração os aspectos de importância econômica e científica envolvidos na

melhoria dos resultados de desempenho produtivo. Também serão descritas diferentes técnicas hematológicas de mensuração de ferro no organismo das aves.

2. FERRO

2.1 O papel do ferro no metabolismo

Ferro é um mineral vital para a homeostase celular, estando envolvido em diversos processos metabólicos. Sua principal função é a participação na composição das moléculas de hemoglobina e mioglobina, responsáveis pelo transporte de oxigênio nos organismos (LEESON & SUMMERS, 2001). Além dessa função, o ferro é importante na síntese de DNA e participa como cofator enzimático. Este mineral está presente em diversos ingredientes utilizados na formulação de rações, podendo apresentar-se na forma heme em ingredientes de origem animal, ou aparecendo em dois estados oxidativos em ingredientes de origem vegetal e mineral: férrico (Fe^{+3}) ou ferroso (Fe^{+2}).

No organismo, o Fe encontra-se associado a compostos que evitam ou diminuem a ação do ferro em reações oxidativas danosas ao organismo, pois o excesso de ferro catalisa reações geradoras de radicais livres, como a conversão de peróxido de hidrogênio no radical hidroxilo. Estes compostos são: proteínas de transporte de Fe (transferrinas), proteínas de armazenamento de Fe (ferritina e hemossiderina), compostos heme (hemoglobina, mioglobina, citocromo, catalase) e metaloenzimas (fosfatase) (GROTTO, 2010). A importância do conhecimento sobre a forma em que o elemento está presente implica na sua capacidade de absorção e biodisponibilidade, uma vez que a absorção do Fe^{+3} é muito pequena (CONRAD et al., 2000).

2.2 Absorção do ferro

O ferro presente no organismo das aves pode ser obtido através de duas formas: ingestão na dieta ou reciclagem através dos macrófagos pela degradação de hemácias envelhecidas. O ferro oriundo da dieta pode ser dividido em dois subgrupos, caracterizados pela sua absorção: ferro hemínico e ferro não-hemínico. O ferro hemínico, também denominado orgânico ou heme, é originário da mioglobina e hemoglobina, proveniente de fontes animais como, por exemplo, farinha de carne e possui maior capacidade absorptiva. Ferro não-

hemínico: ou inorgânico, presente na forma Fe^{+2} ou Fe^{+3} , é encontrado em fontes vegetais e possui menor capacidade absorptiva.

Poucos estudos foram conduzidos para determinar a disponibilidade das fontes orgânicas de Ferro para animais. Em um estudo conduzido por Spears et al. (1992), os autores concluíram que através da determinação de hemoglobina sanguínea que o ferro orgânico mostrou níveis mais elevados de biodisponibilidade em relação ao ferro inorgânico. Segundo Reddy et al. (1992), as formas inorgânicas dos minerais quelados, devido a sua maior capacidade de absorção, trazem benefícios aos animais como: maior taxa de crescimento, maior ganho de peso, maior produção de ovos, melhora na qualidade da carne e dos ovos, redução na taxa de mortalidade e redução dos efeitos do estresse. Um experimento conduzido por Paik (2001) com poedeiras demonstrou que a quantidade de ferro na gema dos ovos de poedeiras aumentou quando sua dieta foi suplementada com o complexo ferro-metionina e este comparado à suplementação com Fe na forma inorgânica. De acordo com Vieira (2008), os resultados obtidos através da suplementação com ferro orgânico possuem pouca consistência na detecção dos seus benefícios no desempenho animal.

2.3 Homeostase do ferro

Um sincronismo entre a absorção, utilização e estoque de ferro é essencial para a manutenção do equilíbrio deste metal no organismo. A homeostase do ferro é regulada por dois mecanismos principais: regulação intracelular, de acordo com a quantidade de ferro que a célula dispõe e regulação sistêmica, em que a hepcidina tem papel importante.

2.3.1 Regulação do ferro intracelular

Na regulação intracelular do ferro, participam as proteínas reguladores do ferro (IRP) 1 e 2, as quais verificam as concentrações de ferro intracelular. Os RNA mensageiros responsáveis por codificar as proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, como a transferrina e a ferritina, possuem elementos reguladores do ferro (IRE), que são regiões não codificadoras na extremidades 3' ou 5' em forma de alça, os quais as IRP se ligam e controlam a expressão pós-transcricional desse genes. Na presença de ferro a IRP 1 age como uma aconitase que interconverte citrato e isocitrato, ficando inativa; na ausência de ferro, fica com grande afinidade com os IREs. A IRP 2, com o excesso de ferro, não liga-se com as IREs. Através da ligação do IRP com o IRE localizado na extremidade 3' ocorre a inibição da

degradação do RNAm, aumentando a síntese proteica. A ligação da IRP com os IREs da extremidade 5' inibe a tradução do RNAm, diminuindo a síntese proteica. Quando ocorrem baixas concentrações intracelulares de ferro, as IRP são ativadas e ligam-se aos IREs, diminuindo a síntese de ferritina, pois liga-se a extremidade 5', aumentando a síntese de receptor de transferrina (TFR), que se liga à extremidade 3' e diminui a síntese do heme, ligando-se a extremidade 5'. Em altas concentrações, o IRP fica inativado, sintetizando ferritina, diminuindo a produção de transferrinas e sintetizando grupos heme (FAIRBANKS & BEUTLER, 2001; NAIRZ, 2006).

2.3.2 Regulação do ferro sistêmico

A excreção do ferro do organismo, geralmente, ocorre pelas secreções corpóreas ou descamação dos epitélios intestinais e epidérmicos, não existindo no organismo um mecanismo específico para eliminação do ferro sistêmico. Sendo assim, o equilíbrio do ferro necessita de uma intercomunicação entre as regiões de captação, consumo e depósito desse mineral. Essa comunicação é feita pela hepcidina (HPN), um hormônio peptídico circulante no organismo, codificada pelo gene HAMP e sintetizada pelo fígado. Este hormônio gerencia a utilização e o armazenamento do ferro com a sua aquisição, sendo um regulador negativo do metabolismo do ferro e que funciona como um inibidor da ferroportina, impedindo que o ferro absorvido pelo enterócito seja transferido para o sangue. A ferroportina (FPN), canal exportador de ferro das células, é o receptor da hepcidina, e a interação entre a hepcidina e a ferroportina administra os níveis de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos. O complexo hepcidina-ferroportina é internalizado nos domínios da membrana basolateral dos macrófagos e enterócitos. Ocorre, então, a internalização da ferroportina e sua degradação. Desse modo, o ferro não é externalizado, levando ao aumento dos níveis de ferro no citosol, o qual será estocado como ferritina, com a subsequente redução da absorção de ferro pelo intestino, devido ao excesso de ferro intracelular, que inibe a síntese de DMT-1. Como consequência ocorre o acúmulo de ferro nos hepatócitos e macrófagos. A redução da passagem do ferro para o plasma resulta na baixa saturação da transferrina e menos ferro é liberado para o desenvolvimento do eritroblasto.

As moléculas HFE, hemojuvelina e receptor de transferrina tipo 2 (TfR2) e proteína morfogenética do osso (BMPs) regulam a expressão da HPC de acordo com os níveis de ferro circulantes. Havendo aumento dos níveis de ferro elas estimulam a síntese de HPC pelo fígado, que vai inibir a absorção do ferro intestinal e a liberação do ferro dos macrófagos e

enterócitos, restabelecendo o equilíbrio do ferro. A HJV é um cofator das BMPs, que detectam a quantidade intracelular do ferro. O HFE é o cofator de Tfr2, que detecta o conteúdo de ferro circulante no organismo. O estado inflamatório também regula a homeostase do ferro, em que IL-6 age diretamente nos hepatócitos estimulando a produção de hepcidina (GANZ, 2005; GANZ, 2006).

2.4 Armazenamento do ferro

Apenas uma pequena parte do ferro está presente no plasma, ligado à transferrina (cerca de 0,1% do ferro total). Após a internalização do complexo ferro-transferrina, o ferro liberado fica disponível para o *pool* intracelular, sendo utilizado para necessidades metabólicas ou incorporado a proteínas responsáveis pelo armazenamento do ferro: a ferritina e a hemossiderina. A importância do armazenamento do ferro é o de promover uma reserva interna e proteger o organismo dos efeitos tóxicos do ferro livre.

O mineral Fe está presente em muitas enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons (citocromos), pela ativação do oxigênio (oxidases e oxigenases) e pelo transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina). O sistema citocromo consiste em uma série de reações nas quais oxidações ocorrem com a produção de adenosina trifosfato (ATP) e formação de água. O Fe participa de atividades como oxidação, redução e transporte de elétrons, ativando sítios de enzimas óxido redutoras e proteínas ligadas ao oxigênio (WILLIAMS et al., 1976).

O Fe também está presente no organismo animal em formas complexas ligado a proteínas (transferrina e ferritina), hemo componentes (hemoglobina ou mioglobina), hemo enzimas (citocromo mitocondrial e microsomal) além de outras enzimas como catalase e peroxidase (McDOWELL, 1992). A hemoglobina atua ligando-se ao oxigênio, sendo também chamada nesta forma de oxihemoglobina, depois, libera este oxigênio para os tecidos, ligando-se então ao dióxido de carbono (carboxihemoglobina) nos vasos venosos, que por sua vez, libera este dióxido de carbono nos pulmões, trocando-o uma vez mais por oxigênio (BOTHWELL et al., 1979). A hemoglobina está presente nos eritrócitos e é responsável por 90% do total proteico destas células (DAVIS et al., 1987).

A ferritina é uma proteína globular localizada essencialmente no fígado, sendo a mais importante proteína de reserva de ferro. Ela é encontrada em todas as células, especialmente, naquelas envolvidas na síntese de compostos férricos e no metabolismo e na reserva do ferro. Quando livre, sem estar combinada com o íon ferro, é denominada apoferritina. A função primária da ferritina é acumular o ferro intracelular protegendo a célula de seus efeitos tóxicos

constituindo uma reserva de ferro rapidamente mobilizável. A maior parte da ferritina no organismo encontra-se no fígado e nas células do sistema retículo endotelial do fígado, baço e medula óssea, quantidades menores encontram-se no coração, no pâncreas e nos rins. Pequenas, mas significativas quantidades de ferritina encontram-se no soro.

2.5 Transporte do ferro

O ferro dietético absorvido pelo intestino ou do ferro do produto da degradação de hemácias, se destina, em sua grande maioria, à medula óssea, o qual se liga ao grupo heme, passando a fazer parte da molécula da hemoglobina; outra parte fica estocada sob forma de ferritina e uma parte do ferro continua ligada à transferrina. A transferrina é uma proteína responsável pelo transporte do ferro do seu sítio de absorção no nível intestinal ou nos sítios de catabolismo da hemoglobina para os precursores de células vermelhas na medula óssea ou para os sítios de estocagem de ferro no sistema reticulo-endotelial na medula óssea, no fígado e no baço. A transferrina apresenta dois sítios homólogos com grande afinidade pelo Fe^{+3} , tendo capacidade de se ligar a até dois íons férrico. Parte do ferro ligado à transferrina é absorvido por células do sistema reticulo-endotelial, principalmente do fígado e do baço, onde fica estocado.

Ao chegar à célula alvo, o complexo ferro-transferrina liga-se um receptor específico presente na superfície da maioria das células, denominado TFR (Transferrin Receptor). O complexo formado pela transferrina, seu receptor é internalizado e, dentro do endossoma, ocorre a redução do pH, através de uma bomba de prótons, facilitando a liberação do ferro da transferrina. O ferro, liberado pela transferrina no endossoma na forma Fe^{+3} , atravessa a membrana da vesícula, por meio da proteína DMT-1, alcançando o citoplasma. Entretanto, o DMT-1 possui grande afinidade pelo Fe^{+2} , necessitando de uma ferrireductase para reduzir o Fe^{+3} . Esse processo ocorre principalmente nos eritroblastos, pois a maior parte da captação do ferro da transferrina é feita pelas células precursoras eritrocitárias as quais apresentam vários receptores da transferrina. A importância dessas células está relacionada a formação da molécula da hemoglobina através da incorporação do ferro ao anel de protoporfirina, formando o grupo heme em conjunto com as cadeias de globina. O Fe heme é sintetizado, especificamente, nas mitocôndrias dos eritroblastos e nelas ocorre, também, a síntese dos *clusters* Fe-S, os quais previnem o acúmulo do ferro no citosol da célula (BOWMAN et al., 1989).

2.6 Fontes de Ferro

2.6.1 Minerais orgânicos

Leeson & Summers (1997) definiram minerais orgânicos como sendo uma mistura de elementos minerais que são ligados a um tipo de carreador sendo que este pode ser um aminoácido ou polissacarídeo, os quais possuem a capacidade de ligar-se ao metal através de ligações covalentes por grupos amino ou oxigênio, formando assim uma estrutura cíclica.

O quelato é um complexo metálico que possui um átomo mineral no centro da molécula e um ligante ao seu redor. Quando este ligante possui mais de um átomo doador o complexo se torna um anel heterocíclico denominado anel quelato. Para ser considerado como um agente quelante, o composto orgânico deve conter um mínimo de dois grupos funcionais (oxigênio, nitrogênio, amino ou hidroxil), sendo que cada um desses deve possuir a capacidade de doar o seu par de elétrons para ser combinado com o íon metálico via ligação covalente, podendo o ligante então formar o anel quelato.

Devido a essa complexidade esses minerais possuem preços mais elevados que os minerais inorgânicos, no entanto, a partir desse investimento espera-se que ocorra uma melhora no desempenho e na absorção quando comparados com os minerais inorgânicos (VIEIRA, 2008).

A melhora da utilização do mineral dependerá basicamente da melhor capacidade de absorção pelo organismo. Segundo Kratzer & Vohra (1986), a capacidade do ligante sequestrar o mineral ou sua maior capacidade de competir com outros ligantes no trato gastrointestinal formando complexos insolúveis com o mineral são os mecanismos responsáveis pela melhor utilização dos minerais orgânicos.

A principal fonte de microminerais suplementada nas rações é a inorgânica, porém, as fontes orgânicas têm surgido recentemente no mercado devido a um crescente interesse em estudar fatores que aumentam a absorção e a biodisponibilidade mineral (VIEIRA, 2008). A maioria dos minerais orgânicos é classificada como complexos, quelatos ou proteínatos. A Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 1997), que define as normas e os padrões dos alimentos destinados à produção animal, conceitua os minerais orgânicos como íons metálicos ligados quimicamente a uma molécula orgânica, formando estruturas com características únicas de estabilidade e de alta biodisponibilidade mineral, existindo a seguinte classificação entre os compostos:

a) Complexo metal-aminoácido: produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um ou mais aminoácidos. Ex: Complexo ferro aminoácido (Fe-aminoácido).

b) Complexo metal-aminoácido específico: produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico, formando ligações covalentes coordenadas.

c) Proteinato metálico: produto resultante da quelação de um sal solúvel com aminoácidos e/ou proteínas parcialmente hidrolisadas, formando uma estrutura em anel aberta.

d) Complexo metal-polissacarídeo: produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com uma solução de polissacarídeos, formando um complexo metálico específico.

e) Quelato metal-aminoácido: produto resultante da reação de um íon metálico obtido de um sal metálico solúvel com aminoácidos na relação de um mol de metal para um a três moles de aminoácidos, formando ligações covalentes coordenadas. São resultantes da reação de um sal metálico solúvel com aminoácidos a uma taxa molar de 1:1 até 1:3. O peso molecular médio do aminoácido hidrolisado deve ser aproximadamente 150 e o peso molecular resultante não deve exceder 800.

2.6.2 Uso da farinha de carne e ossos em reprodutoras

Devido ao seu elevado valor biológico a farinha de carne e ossos é um ingrediente muito utilizado na formulação de rações, por seu alto valor nutritivo em proteínas, gordura, minerais importantes como cálcio e fósforo e vitamina B12. A inclusão dessa farinha nas dietas das aves influencia diretamente a biodisponibilidade de ferro, pois nesse ingrediente o mineral encontra-se na forma heme possuindo maior capacidade absorptiva. Uma das grandes limitações de seu uso nas rações é de origem sanitária. Apesar de atualmente haver um maior controle no processo de fabricação dos produtos de origem animal, ainda existe uma grande preocupação com a possibilidade de contaminação vertical por *Salmonella*, além da preocupação após o surgimento da Encefalopatia Espongiforme Transmissível, apesar de não haver relatos da ocorrência dessa enfermidade em aves.

2.7 Efeitos da suplementação de ferro no desempenho das matrizes pesadas

Um ovo de galinha de tamanho médio tem cerca de 1,5 mg de Fe em sua composição (CAO et al., 1996). A fosvitina é uma proteína presente no ovo que fornece minerais para o embrião durante a incubação (GREENGARD et al., 1964). O total de Fe nos ovos pode variar dependendo da sua forma molecular e da sua concentração na alimentação (NABER, 1979; STADELMAN & PRATT, 1989).

A suplementação recomendada de Fe para matrizes de frangos de corte variam de 40 a 70 mg/kg. (LEESON & SUMMERS, 2007). Park et al. (2004) demonstraram em seu estudo que o conteúdo Fe de ovos aumentou 5 e 18% pela adição de sulfato de Fe ou Fe-metionina, respectivamente. Através da suplementação com 120 mg/kg de Fe, níveis muito mais elevados do que o usualmente recomendado, Skrivan et al. (2005) revelaram um aumento da concentração de Fe na gema de ovo de 6,3%. A produção de ovos e o teor de Fe na gema e no albúmen de matrizes alimentadas com dietas sem suplementação de Fe são reduzidos, indicando um estado de deficiência nestes animais. Um aumento da produção de ovos foi encontrado em matrizes pesadas, alimentadas com dietas suplementadas com 60 mg/kg de sulfato de ferro ou Fe ligado a aminoácidos (BESS et al., 2012). A produção de ovos, o conteúdo de Fe nos componentes dos ovos e desenvolvimento embrionário podem se beneficiar de fontes mais disponíveis de Fe em dietas de matrizes.

3. AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AVES

3.1 Colheita de sangue em aves

A adequada colheita da amostra constitui um passo fundamental na avaliação hematológica. Um fator importante a ser avaliado, quando da colheita, é o volume a ser coletado, pois em aves há uma limitação, dependendo principalmente do peso e do estado de saúde da ave. Para a maioria das espécies é considerado seguro extrair até 10% do volume de sanguíneo corporal, o que equivale aproximadamente a 1% do peso corporal (CAMPBELL & ELLIS, 2007). No caso de colheitas seriadas em mamíferos, a literatura recomenda a redução do volume para 0,5% do peso corporal (CLARK et al., 2009), entretanto em aves se observa uma rápida recuperação do volume de hemácias após perdas de sangue. Segundo Capitelli &

Crosta (2013) isso se deve principalmente ao fato de a vida média dos eritrócitos das aves ser mais curta que dos mamíferos tornando a regeneração mais rápida.

Durante a contenção da ave para a colheita é importante observar a respiração do animal, pois como as aves não possuem diafragma a contenção exagerada na região das costelas pode levar a asfixia devido obstrução dos sacos aéreos (RITCHIE et al., 1994). Adicionalmente, a contenção é um importante fator de estresse, o que pode levar a alteração nos parâmetros hematológicos, para reduzir esse fator devem-se adotar medidas como menor tempo de contenção possível e a minimização dos estímulos visuais e acústicos. Os principais locais de colheita sanguínea em aves são: a veia jugular direita, a veia ulnar (ou da asa) e a metatarsiana medial. A veia jugular direita é a escolha preferencial na maioria dos casos. Considerando as duas jugulares, a direita é mais superficial e, portanto de mais fácil acesso, mas é muito móvel, sendo necessário estabilizá-la. Trata-se de um vaso de calibroso, sendo mais difícil que ocorra coagulação na hora da extração; por outro lado o maior calibre aumenta também a probabilidade de ocasionar hematomas. A veia da asa é facilmente visível na zona medial do cotovelo, mas necessita uma boa imobilização, pois animais excitados tentam movimentar as asas dificultando o procedimento. Já a veia metatarsiana medial cruza a junção tarso-metatarsica e apresenta como principal vantagem o fato de estar envolta por estruturas musculares o que diminui a formação de hematomas (CAMPBELL, 1994).

Para Clark et al. (2009) não é aconselhável fazer garrote para evidenciar o vaso no momento da colheita, esse procedimento pode acarretar em maiores riscos de formação de hematomas. Para melhor visualização da veia aconselha-se a utilização de álcool sobre a pele sempre em quantidades mínimas necessárias, pois o excesso pode provocar hemólise. Devido à reduzida quantidade de tecido conjuntivo que possuem as aves são mais suscetíveis a hematomas que os mamíferos. Após a coleta sanguínea deve-se retirar a agulha e aplicar pressão no local da punção para reduzir o extravasamento de sangue. No caso de punção jugular esse cuidado também deve ser tomado, pois há a possibilidade de vazamento nos sacos aéreos claviculares.

Durante a colheita de sangue deve-se exercer o grau mínimo de pressão negativa sobre o êmbolo da seringa, pois se a pressão for muito forte produzirá uma amostra hemolisada e pode colapsar a veia. Para evitar a hemólise da amostra também é recomendada a desacoplação da agulha no momento da transferência do sangue para o tubo com anticoagulante. O anticoagulante mais indicado para análise hematológica em aves é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por ser o que menos provoca alterações na amostra (CAPITELLI & CROSTA, 2013).

O processo de coagulação nas aves ocorre predominantemente pela via extrínseca, ao contrário dos mamíferos onde predomina a via intrínseca (DONELEY, 2010), isso faz com que o sangue das aves coagule mais rapidamente. No caso de confecção de esfregaços em lâminas, o procedimento sugerido é, uma vez obtido o sangue, fazer dois esfregaços com gotas sem anticoagulante e rapidamente colocar o restante no tubo com EDTA (CAMPBELL & ELLIS, 2007). Diversas técnicas são descritas para a confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo, o objetivo geral da técnica é conseguir uma extensão de sangue conformada por uma monocapa uniforme de células evitando, na medida do possível, a marginação dos tipos celulares em função do tamanho. A técnica mais habitualmente utilizada para isto, consiste em colocar uma gota de sangue na porção do primeiro terço de uma lâmina que vai ser espalhada com ajuda de outra lâmina. O esfregaço deverá ser imediatamente secado ao ar ambiente (CLARCK et al., 2009).

3.2 Processamento das amostras

O tempo entre a colheita da amostra e o processamento deve sempre ser o menor possível. Para estabelecer o tempo máximo para esse procedimento inicialmente extrapolou-se os tempos descritos na literatura médica humana, que ressalta como principal fator para conservação da amostra o uso da refrigeração. Porém, recentemente estudos específicos de medicina veterinária relataram diferentes sensibilidades ao armazenamento em função da espécie. Nos equinos, demonstrou-se que os valores hematológicos eram mais estáveis em amostras conservadas à temperatura ambiente (20 a 25°C) do que naquelas mantidas em refrigeração (4°C). Em aves, vários estudos realizados em frangos e perus, comparando o efeito do armazenamento a diferentes temperaturas e por diferentes períodos, demonstraram que amostras sob refrigeração (4°C) começavam a apresentar alterações após 30h de armazenamento. Isso diminuía para 12h na temperatura de 29°C, e para 9h a 37°C. (AKAM et al., 2008; HADZIMUSIC et al., 2010).

3.3 Métodos de contagens celulares

A principal diferença na composição celular sanguínea entre aves e mamíferos é que as aves apresentam os eritrócitos e os trombócitos nucleados, este fato pode interferir nas contagens automatizadas rotineiramente utilizadas para mamíferos. O principal leucócito nas aves é o heterófilo, que nos mamíferos equivale ao neutrófilo. Essas diferenças fazem com

que as contagens automáticas de rotina realizadas em mamíferos não sejam aplicáveis nas aves, sendo então indicadas as técnicas manuais (CAPITELLI & CROSTA, 2013).

3.3.1 Contagem manual

A contagem manual das células sanguíneas é a mais comumente utilizada para aves. Utiliza-se para a leitura um hemocítmetro (câmara de Neubauer) onde é colocada a amostra diluída de sangue. Após o preenchimento da câmara deve-se aguardar 5 minutos, tempo necessário para que as células se acomodem na superfície da grade antes da leitura. Devido ao fato de as espécies aviárias possuírem células sanguíneas nucleadas, muitas vezes as técnicas diluem e coram, simultaneamente, as amostras a fim de permitir que os diferentes tipos celulares sejam mais facilmente diferenciados e contados. Para obtenção do número de eritrócitos na amostra utiliza-se a diluição na proporção 1:200. Os cálculos para eritrócitos são feitos contabilizando todas as células em cinco dos pequenos quadrantes do quadrado central da câmara e multiplicando o número obtido por 10.000, obtendo assim o total de eritrócitos por microlitro de sangue.

No caso de lâminas de esfregaço sanguíneo para ser possível realizar a contagem diferencial de leucócitos e avaliar a morfologia celular é preciso corar o esfregaço. Existem várias opções de corantes a maioria variações da coloração Romanowsky, como: Wright, Giemsa, Wright-Giemsa, Wright-Leishman ou May-Grunwald e suas combinações. Dentre os anteriores a coloração de Wright tem sido o padrão em hematologia aviária (CAMPBELL, 1994).

Os principais dados do hemograma que darão indicação a respeito da quantidade de ferro no organismo são o hematócrito e a concentração de hemoglobina. O hematócrito, expressa a proporção de volume da parte corpuscular no total do sangue. Para a realização da técnica utiliza-se um tubo de microhematócrito, centrifugado a 12.000xg durante 5 min. A hemoglobina é determinada após lise das células através de um reagente lisante e centrifugação para a retirada dos núcleos livres dos eritrócitos lisados evitando superestimação da contagem. A amostra passa então por análise espectrofotométrica com o método da cianometahemoglobina a 540 nm.

A partir dos valores de eritrócito, hematócrito e hemoglobina são calculados os índices eritrocitários, que fornecem informações complementares da linhagem eritrocitária. O volume corpuscular médio (VCM) representa o tamanho dos eritrócitos, a hemoglobina corpuscular média (CHM) e a concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) expressam a

quantidade de hemoglobina por eritrócito. Os cálculos destes índices estão apresentados a seguir (CAMPBELL, 1994; CLARCK, et al., 2009):

- $VCM \text{ (fL)} = (Htc \times 10) / RBC$
- $HCM \text{ (pg)} = (\text{Hemoglobina} \times 10) / RBC$
- $CHCM \text{ (\%)} = (\text{Hemoglobina} \times 100) / PCV$

3.4 Morfologia dos eritrócitos de aves

Os eritrócitos das aves são nucleados diferentemente dos mamíferos. Quando observados no microscópio óptico colorados com corante tipo Romanowsky, visualizam-se como células elípticas com o núcleo também elíptico e em posição central. O citoplasma fica corado de rosa e o núcleo aparece com uma coloração arroxeada. Em comparação com outras espécies os eritrócitos maduros de aves são maiores que os da maioria dos mamíferos, mas menores que os dos répteis e os anfíbios (MITCHELL & JOHNS, 2008).

A eritropoiese nas aves é mais intensa que nos mamíferos, pois o tempo de vida dos eritrócitos aviários é mais curto. O controle da eritropoiese no organismo é feito através dos níveis de eritropoetina (diferente da dos mamíferos) produzida no rim, sob estímulos de oxigênio sanguíneo e níveis de estrógenos e andrógenos. Através da observação de uma lâmina de esfregaço sanguíneo, é possível observar diferentes estágios de maturação dos eritrócitos. As células mais jovens apresentam um contorno mais esférico, com o citoplasma mais basófilo, núcleo arredondado e com cromatina pouco compactada. À medida que amadurecem, as células tornam-se mais elípticas, ocorre um aumento da densidade nuclear e o citoplasma fica mais vermelho (CARDOSO, 2003; CAPITELLI & CROSTA, 2013). De acordo com a sua maturidade, os eritrócitos são classificados em: pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, reticulócito e eritrócito maduro.

3.5 Interpretação do hemograma

Os valores normais de hematócrito em aves estão entre 35% a 55%. Valores mais baixos são considerados indicadores de anemia, sendo de 25% a 35% considerado anemia moderada e abaixo de 20% anemia severa. Outro achado em hemogramas de aves com deficiência de ferro é a hipocromasia que caracteriza-se pela palidez do citoplasma do eritrócito. Além da deficiência dietética, essa observação feita em hemogramas também pode estar relacionada a outros fatores como a perda de sangue ou a inflamação. A perda aguda de

sangue ou a deficiência nutricional de ferro pode causar hipocromasia e anemia não regenerativa decorrente da deficiência absoluta de ferro. Esse quadro também é observado na intoxicação por chumbo ou zinco. A deficiência de ferro pode não ser dietética, mas relacionada a alguma inflamação no organismo da ave. Devido à inflamação ocorre uma redistribuição das reservas de ferro, resultando na diminuição do ferro disponível para a eritropoiese levando a uma deficiência funcional de ferro. (MITCHELL & JOHNS, 2008).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de uma dieta suplementada com níveis adequados de ferro pode trazer benefícios para as matrizes pesadas. As fontes orgânicas de ferro por possuírem uma maior capacidade de absorção podem representar uma alternativa à suplementação usualmente utilizada.

Os testes hematológicos para mensurar a quantidade de ferro presente no organismo da ave podem ser uma ferramenta útil para as pesquisas que visam estabelecer parâmetros mais fidedignos dos níveis necessários de suplementação de ferro.

São necessários mais estudos na área utilizando diferentes fontes e níveis de suplementação, além de avaliações das progênes resultantes das matrizes suplementadas com ferro.

REFERÊNCIAS

AKAM, C. J. A.; IHEDIOHA, J. I.; IDIKA, I. K.; OGAMBA, G. N. Changes in the haematological values of avian blood samples stored at varying temperatures for a period of up to 72 hours. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 17, p. 73-79, 2008.

BOWMAN, B. H.; YANG, F. M.; ADRIAN, G. S.(1989). Transferrin: evolution and genetic regulation of expression. **Advances in Genetics**, v. 25, p. 1-38, 1989.

CAMPBELL, T. W.; ELLIS, C. K. **Avian and exotic animal hematology and cytology**. 3. ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2007.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, San Antonio , v. 16, p. 71-120, 2013.

CARDOSO, A. L. S. P. Estudos dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, p. 419-424, 2003.

CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2009.

CLARK, P.; RAIDAL, S. R. Haematological indicators of inflammation exhibited by australian falconiformes. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 18, p. 1-6, 2009.

CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G. et al. Separate pathways for cellular uptake of ferrous and ferric iron. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v.279, p.767 – 774, 2000.

DONELEY, B. **Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds**. London: Manson Publishing, 2010.

FAIRNANKS, V. G.; BEUTLER, E. Iron metabolism. **Williams-Hematology**, Nova Iork, v. 6,p. 295-304, 2001.

GANZ, T. Heparin- a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice and Research Clinical Haematology**, Londres, v. 18, p. 82-171, 2005.

GANZ, T. ; NEMETH, E. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 290, p. 199-203, 2006.

GROTTO, Helena Z. W.. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, supl. 2, 2010 .

HADZIMUSIC, N.; KATICA, M.; MUHAREMOVIC, Z.; MUSANOVIC, J. Effect of temperature storage on hematological parameters of avian turkey blood. **International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health**, Nova York, v. 2, p. 158-166, 2010.

KRATZER, F. H.; VOHRA, P. Chelates in Nutrition. **Research in veterinary science**, Boca Raton, v. 67, p. 223-228, 1986.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. Feeding programs for broiler breeders. **Commercial poultry nutrition**, Guelph: Univ. Books, p. 255-297, 1997.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. Minerals, in: Lesson, S., Summers, J. D. Scott's Nutrition of the Chicken. **University Books**, Guelph, 2001 p. 331-428.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, San Antonio, v. 11, p. 501-522, 2008.

NABER, E. C. The effect of nutrition on the composition of eggs. **Poultry Science**, Champaign v.58, p.518-528, 1979.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: From anemia to hemochromatosis. **Wien Klin Wochenschr**, Viena, v. 118, p. 62-442, 2006.

PAIK, I. Application of chelated minerals in animal production. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 14, p. 191-198, 2001.

REDDY, A. B.; DWIVED J. N.; ASHMEAD, A. D. Mineral chelation generates profit. **Misset-World Poultry**, Doetinchem, v. 8, p. 13-15, 1992.

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

SPEARS, J. W. et al. Efficacy of iron methionine as a source for iron for nursing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, supl. 1, 1992.

STADELMAN, W. J., PRATT, D. E. Factors influencing composition of the hen's egg. **World's Poultry Science Journal**, Wallington, v.45, p.247-266, 1989.

VIEIRA, S. L. Chelated minerals for poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 10, p. 73-79, 2008.