

## AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO ÁCIDO SIÁLICO COMO BIOMARCADOR TUMORAL EM NOVILHAS CRIADAS EM PROPRIEDADE ENDÊMICA PARA HEMATÚRIA ENZOÓTICA DOS BOVINOS

MARCOS COELHO DE CARVALHO<sup>1</sup>, WILMAR SACHETIN MARÇAL<sup>2</sup>, MARA STIPP BALARIN<sup>3</sup>, MAIRA SALOMÃO FORTES<sup>4</sup>, NELSON PARIZOTTO JUNIOR<sup>4</sup>, MARIANA ITIMURA CAMARGO<sup>5</sup>

1 Mestre em Ciência Animal- UEL

2 –Professor do Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias- UEL

3 –Professora do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias - UEL

4 –Mestrandos do curso de Ciência Animal- UEL.

5 – Acadêmica de Medicina Veterinária- UEL

### RESUMO

A *Pteridium aquilinum* (samambaia) é um dos vegetais tóxicos mais preocupantes em vários países do mundo, frequentemente verificada como causadora de quadros de toxidez em bovinos. Por essa razão, a ciência busca, através das instituições de pesquisa, encontrar meios para o controle epidemiológico dessa intoxicação, visando diagnosticar precocemente a forma clínica da hematuria enzoótica dos bovinos. Estudos realizados demonstraram a alta correlação entre a produção excessiva de mucoproteína por células neoplásicas no interior da bexiga de bovinos com hematuria enzoótica e o ácido siálico, comprovando que esse ácido atua como biomarcador tumoral. Com base nessas comprovações, confrontou-se o nível de ácido siálico sérico de novilhas

da raça Nelore criadas em propriedade isenta de samambaia (grupo controle) com os níveis séricos obtidos em novilhas criadas em propriedades com alta infestação da planta (grupo experimental). A média dessa substância no soro sanguíneo do grupo controle apresentou-se muito próxima à média do grupo experimental ( $0,611 \pm 0,225$  e  $0,615 \pm 0,258$  g/L, respectivamente). O resultado obtido na presente pesquisa demonstrou que as diferenças entre as médias dos grupos não foram significativas. Portanto, o ácido siálico não se mostrou efetivo como biomarcador tumoral em novilhas com intoxicação pela ingestão contínua de samambaia.

PALAVRAS-CHAVE: ácido siálico; biomarcadores; bovinos; *Pteridium aquilinum*.

### ABSTRACT

## BIOCHEMICAL EVALUATION OF THE SIALIC ACID AS A TUMORAL MARKER IN HEIFERS RAISED IN AN ENDEMIC PROPERTY FOR BOVINE ENZOOTIC HEMATURIA

*Pteridium aquilinum* (bracken fern) is one of the most concerning toxic vegetables in many countries in the world. Therefore, science aims to find ways for the

epidemiological control of bovine intoxication with the purpose of making early diagnoses of Bovine Enzootic Hematuriae. Researches have shown a high correlation

between the excessive production of mucoprotein by animals with Bovine Enzootic Hematuriae and sialic acid, proving that this acid acts as an inflammatory biochemical marker associated to bladder tumor development. Based on this information, serum sialic acid levels of clinically healthy Nellore heifers (control group) were statistically compared to Nellore heifers raised in bracken fern endemic properties (experimental group). The average level of serum sialic acid of the

control groups was not different from the sialic acid level of the affected group ( $0.611 \pm 0.225$  g/L and  $0.615 \pm 0.258$  g/L, respectively). Results obtained in the present study demonstrate no differences of the sialic acid average levels between the groups. Therefore, measurement of sialic acid serum levels was not effective as a neoplastic biochemical marker in Nellore heifers continuously fed with bracken fern.

**KEYWORDS:** biochemical marker; bovine; *Pteridium aquilinum*; sialic acid.

## INTRODUÇÃO

A *Pteridium aquilinum*, popularmente conhecida por samambaia, é um dos vegetais tóxicos mais preocupantes em vários países do mundo, incluindo o Brasil. No Paraná é uma das plantas tóxicas que causa grandes prejuízos à pecuária bovina, ocorrendo em 105 municípios (MARÇAL et al., 2001), dos 399 existentes (FERREIRA, 1996). Embora em algumas fazendas as pastagens sejam renovadas, ainda assim a samambaia persiste, em proporções que variam de, no mínimo, brotos quase imperceptíveis a estruturas herbáceas bem desenvolvidas (MARÇAL et al., 2001).

OLIVEIRA et al. (1998), em pesquisa requisitada por pecuaristas da região nordeste do Paraná, verificaram pela anamnese, nos municípios de Santo Antônio da Platina, Ibaiti e Arapotí, que o problema de intoxicação pela planta era mais frequente nos animais de primeira cria ou em vacas na faixa etária de quatro a cinco anos. Os bovinos apresentavam urina com coloração avermelhada, emagrecimento progressivo e prostração, com quadro clínico irreversível, culminando em alguns óbitos.

Nesse aspecto, a ciência busca, cada vez mais, encontrar meios para controle epidemiológico, já que, em algumas localidades do Paraná, existe a predileção da planta por solos pobres e ácidos ou crescimento sem controle devido à topografia íngreme. Muitos pecuaristas utilizam essas áreas com pastagem para cria e recria de bovinos, levando as instituições de pesquisa a buscar meios para o diagnóstico precoce, sobretudo da Hematúria Enzootica dos Bovinos (HEB); nesse processo, os biomarcadores tumorais podem ser um importante instrumento de diagnóstico.

Nos últimos anos, pesquisas com o ácido siálico como biomarcador tumoral têm merecido

destaque científico. Localizados nas posições terminais de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídios) da superfície e da membrana celular, o ácido siálico está intimamente envolvido em processos biológicos fundamentais à manutenção da vida, mas em funções diferentes daquelas normalmente atribuídas a carboidratos, como armazenadores de energia (glicogênio e amido, por exemplo) ou como componentes de blocos estruturais (quitina e celulose). O envolvimento do ácido siálico inclui processos biológicos como, por exemplo, as funções de mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus, entre outras (WILSON & VON ITZSTEIN, 2003; SEARS & WONG, 1999).

GOTTSCHALK (1951) isolou pela primeira vez o ácido siálico mais abundante nos eucariontes, o ácido N-acetilneuramínico. Cerca de 50 tipos de ácido siálico ocorrem na natureza, diferindo entre si por variações de grau de substituição e oxidação no esqueleto carbônico, e tendo como molécula precursora a N-acetil-D-manosamina ou simplesmente NanaNac (ANGATA & VARKI, 2002).

Na enfermidade HEB, as células tumorais produzem em sua superfície quantidade razoável de mucina (glicoproteínas), presente também no interior da bexiga na forma de muco. Pesquisa conduzida por SINGH et al. (1980) demonstrou a correlação entre a produção excessiva de mucoproteína nos animais com HEB e o ácido siálico, comprovando que ele pode ser considerado um biomarcador para bovinos no processo neoplásico no tumor de bexiga.

MAKIMURA & USUI (1990) destacaram a inter-relação entre o ácido siálico e o aumento de neutrófilos em bovinos acometidos por doenças inflamatórias. MANOHAR et al. (1993) comprovaram, em elevada significância ( $P < 0,01$ ), a

correlação entre o ácido siálico e o carcinoma etmoidal em bovinos, provando que o ácido siálico é um carboidrato envolvido nos processos inflamatórios e no desenvolvimento tumoral.

Ensaio conduzido por CITIL et al. (2004) e GUNES et al. (2004) comprovaram, respectivamente, o aumento sérico do ácido siálico como um marcador inflamatório em bovinos com reticuloperitonite traumática e o alto nível do mesmo em lesões oculares em bezerros com ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

Determinar as concentrações séricas do ácido siálico em novilhas em pastagens infestadas pela planta *Pteridium aquilinum* e compará-las com os níveis normais de ácido siálico em novilhas sadias é a fase preliminar de uma pesquisa com biomarcadores, auxiliando na rapidez e efetividade do diagnóstico precoce da Hematúria Enzoótica dos Bovinos (HEB).

## MATERIAL E MÉTODOS

Como procedimento de pesquisa, para testar o ácido siálico como um provável biomarcador tumoral, avaliaram-se dois grupos distintos de fêmeas da raça Nelore. O grupo 1 (controle) era composto de 19 novilhas clinicamente sadias e o grupo 2 (experimental) constituído de 29 novilhas nascidas em propriedade rural com pastagens infestadas com a planta *Pteridium aquilinum* (samambaia) e endêmica para hematúria enzoótica dos bovinos, sendo que, na data da coleta de sangue, verificou-se hematúria em duas fêmeas estudadas.

A fazenda do grupo 2 (experimental) localiza-se no município de São Jerônimo da Serra – Paraná, com altitude de 920 metros, Latitude de 23°44'06" S Longitude de 50°40'48" W (FERREIRA, 1996, p. 632). Essa região registra há décadas elevadas prevalências de casos clínicos de HEB e, segundo relato dos funcionários da fazenda pesquisada, anualmente surgem na propriedade cerca de 30 a 40 novos casos de HEB e dois a três casos de carcinoma epidermóides do trato digestivo superior (CETDS), mas nunca se registrou caso de diátese hemorrágica. Na data de realização do experimento, o rebanho total era de 608 animais, em uma área total de 1769 hectares; porém, somente 920 hectares estavam sendo utilizados como área de pastagem. Aproximadamente 90% dos pastos são constituídos de *Brachiaria brizanta*, entremeados de samambaia.

O terreno é acidentado e íngreme, o que favorece o desenvolvimento da *Pteridium aquilinum*, dificultando o seu controle e a tecnificação do solo. Os animais eram suplementados no inverno com protéicos a base de uréia e no verão recebiam sal mineral.

A outra propriedade, à qual pertencia o grupo 1 (controle), é uma estação experimental da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), localizada no município de Londrina, estado do Paraná, com altitude de 576 metros, Latitude de 23°23'30"S Longitude de 51°11'30"W (FERREIRA, 1996, p. 405). A área total da propriedade é de 3686 hectares, sendo 2070 hectares de pastagem. A pastagem predominante é *Panicum maximum* cultivar Colômbia; porém, foram formadas novas áreas com *Panicum maximum* cultivares Tanzânia e Mombaça, além de *Brachiaria brizantha*. Ainda existem pastos antigos com grande participação do *Paspalum notatum* (grama batatais).

A fazenda detinha, no período do experimento, um rebanho de 5576 cabeças, sendo que 2115 eram matrizes. O controle sanitário da propriedade é rigoroso, por ser uma instituição voltada à pesquisa; portanto, os animais são vacinados anualmente contra Febre Aftosa e Clostridiose, sendo as bezerras vacinadas também contra Brucelose. A vermifugação é feita uma vez ao ano no gado adulto e três vezes ao ano nos jovens.

Para a realização do experimento, foram selecionadas 19 novilhas (15 a 24 meses de idade). Todas elas passaram por anamnese clínica e apresentavam ausência de febre, inexpressiva carga ectoparasitária, estavam hidratadas, com movimentos ruminais e fezes normais, além de peso e tamanho adequados à sua idade.

O sangue para pesquisa do ácido siálico foi coletado da veia coccígena, por meio de agulhas descartáveis e tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, New Jersey, USA) com gel separador. Houve necessidade de centrifugação de algumas amostras a 3000 rpm por cinco minutos para obtenção do soro. Os soros foram armazenados em tubos, que foram alocados em freezer com temperatura inferior a -30° C, onde permaneceram até a data em que se mensurou o ácido siálico. A análise laboratorial do ácido siálico foi realizada através do método do tiobarbitúrico, descrito por Warren (1985). A leitura para a quantificação do ácido siálico foi feita pelo método de

espectrofotometria e, para isso, foi utilizado o equipamento Espectronic Hélios<sup>®</sup> Computadorizado Duplo Feixe Termoestatizado, pertencente ao Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina-PR.

Os dados obtidos no experimento foram submetidos a análise de variância e para comparação das médias foi realizado o teste de Tukey, utilizando-se o programa SAEG (1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A representação do ácido siálico como biomarcador inflamatório e tumoral é inquestionável de acordo com os trabalhos conduzidos por GUNES et al. (2004), CITIL et al. (2004), MANOHAR et al. (1993) e MAKIMURA & USUI (1990). Entretanto, o resultado do experimento demonstrado na Tabela 1, destaca que não foram significativas as diferenças entre as médias dos grupos controle e experimental, na tentativa de diagnóstico precoce para HEB. A média do ácido siálico nas novilhas Nelore nascidas em propriedade onde não há samambaia na pastagem nem registro clínico da enfermidade HEB foi de  $0,611 \pm 0,225$  g/L. O valor é muito próximo ao encontrado nas novilhas nascidas e criadas em propriedade endêmica para HEB, com elevada infestação de samambaia, média igual a  $0,615 \pm 0,258$  g/L. Cabe ressaltar que duas das 29 novilhas examinadas já estavam com sinal clínico clássico da hematúria enzoótica dos bovinos, ou seja, apresentavam sangue na urina na data de coleta do material biológico.

Tabela 1 – Valores das médias e desvios-padrão da concentração do ácido siálico em novilhas sadias, nascidas e criadas em propriedade sem ocorrência de HEB e novilhas criadas em propriedade endêmica para HEB, ambas da raça nelore

F. VARIAÇÃO	ÁCIDO SIÁLICO
Teste F	NS
GRUPO CONTROLE	$0,611 \pm 0,225$
GRUPO AVALIADO	$0,615 \pm 0,258$
MÉDIA GERAL	$0,613 \pm 0,243$
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	40,03

NS = Não significativo

Ensaio e pesquisas que propiciam a antecipação diagnóstica de enfermidades em animais de produção, sobretudo nos bovinos, são sempre desafiadores porém necessários, bem como confrontar um grupo de animais sadios contra um de animais prestes a desenvolver tumores, como é o caso da proposta deste experimento.

Mensurar o nível do ácido siálico sérico é a etapa inicial do estudo em busca de um diagnóstico precoce para hematúria enzoótica dos bovinos utilizando-se biomarcadores tumorais e/ou inflamatórios. A mensuração desse ácido teve início na década de 80, como ferramenta de patologia clínica, através de pesquisa conduzida por SINGH et al. (1980). Na ocasião, esses pesquisadores verificaram o nível da mucoproteína e do ácido siálico em quatro animais saudáveis e sete hematúricos com o objetivo de comparar valores entre os dois grupos de animais. No exame post-mortem dos animais hematúricos foi relatada a presença de hemangioma, adenoma e adenocarcinoma na bexiga urinária, além de aumento entre 35% e 50% nos níveis de mucoproteína e ácido siálico no sangue desses animais, respectivamente. Isso pode ser reflexo da reação tecidual e da presença de neoplasias.

Nota-se pela literatura consultada haver um hiato de tempo, com início na década de 80 e com novas mensurações somente uma década após. Isso provavelmente é reflexo do alto custo operacional de análises laboratoriais, o que já não representa fator limitante no século atual. À medida que a ciência e a tecnologia evoluem, é de se esperar que o custo analítico também seja mais acessível e possível em novos desafios experimentais, a exemplo do que está se propondo no presente trabalho.

## CONCLUSÃO

Nesta pesquisa o ácido siálico não se demonstrou efetivo como biomarcador, quando testado em novilhas nascidas e criadas em propriedade endêmica para Hematúria Enzoótica dos Bovinos, algumas inclusive com o sinal clínico da enfermidade.

## REFERÊNCIAS

ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary pers-

- pective. **Chemical Reviews**, Washington, n. 702, p. 439-439, 2002.
- CITIL, M.; GUNES, V.; KARAPEHLIVAN, M.; ATALAN, G.; MARASLI, S. Evaluation of serum siálico acid as an inflammation marker in cattle with traumatic reticulo peritonitis. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 155, n. 7, p. 389-392, 2004.
- FERREIRA, J. C. V. O **Paraná e seus municípios**. Maringá: Memória Brasileira, 1996.
- GOTTSCHALK, A. N-substituted isoglucosamine released from mucoproteins by the influenza virus enzyme. **Nature**, London, v. 167, n. 4256, p. 845-868, 1951.
- GUNES, V.; KARAPEHLIVAN, M.; CITIL, M.; ATALAN, G.; MARASLI, S. Relationship between serum sialic acid levels and eye lesions in calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 155, n. 10, p. 508-511, 2004.
- MAKIMURA, S.; USUI, M. Correlation between haptoglobin and sialic acid or mucoprotein in diseased bovine serum. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 52, n. 6, p. 1245-1250, 1990.
- MANOHAR, B. M.; SUNDARARAJ, A.; NAGARAJAN, B.; SHANMUGAM, V. Biochemical markers in the diagnosis of ethmoid carcinoma in cattle. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 70, n. 1, p. 14-16, 1993.
- MARÇAL, W. S. GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; GARGANTINI, M.; FERNANDES, R. P.; MONTEIRO, A. A. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.139-144, 2001.
- OLIVEIRA, G. P.; MATSUMOTO, T.; PRIMAVESI, A.C. **Ocorrência de intoxicação causada por samambaia (*Pteridium aquilinum*) na região nordeste do Paraná**. São Carlos: EMBRAPA, 1998. (Comunicado Técnico, v. 20) Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/44343/1/PROCIComT20GPO1998.00109.pdf>. Acesso em fevereiro 2008.
- SEARS, P.; WONG, C. H. Carbohydrate mimetics: A new strategy for tackling the problem of carbohydrate-mediated biological recognition. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v.38, n.16, p.2301-2324, 1999.
- SINGH, A.K; JOSHI, H.C; RAY, S.N. Serum mucoprotein and silical acid in enzootic bovine haematuria. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, Berlin, v.27, n.8, p.678-681, 1980.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG: **Sistema de Análise Estatística e Genética**, versão 8.1. Viçosa, 1998.
- WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of siálico acids. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.234, n. 8, p.1971-1975, 1959.
- WILSON, J. C.; VON ITZSTEIN, M. Recent strategies in the search for new anti-influenza therapies. **Current Drug Targets**, Oak Park, v. 4, p. 389, 2003.

---

Protocolado em: 06 mar. 2008. Aceito em: 21 fev. 2011.