



Universidade
Estadual de
Londrina

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MARCOS COELHO DE CARVALHO

**VALORES DE REFERÊNCIA DO ÁCIDO SIÁLICO SÉRICO
EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE E SUA APLICAÇÃO AO
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA
DOS BOVINOS.**

Londrina
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCOS COELHO DE CARVALHO

**VALORES DE REFERÊNCIA DO ÁCIDO SIÁLICO SÉRICO
EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE E SUA APLICAÇÃO AO
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA
DOS BOVINOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof.Dr. Wilmar Sachetin Marçal
Co-orientadora: Prof. Dra. Mara R. S. Balarin

Londrina
2007

MARCOS COELHO DE CARVALHO

VALORES DE REFERÊNCIA DO ÁCIDO SIÁLICO SÉRICO EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE E SUA APLICAÇÃO AO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA DOS BOVINOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wilmar Sachetin Marçal
UEL - PR

Prof. Dra. Mara Regina Stipp Balarin
UEL - PR

Prof. Dr. Eduardo H. Birgel Junior
USP - SP

Londrina, 8 de novembro de 2007.

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Wilmar Sachetin Marçal.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências, órgãos de fomento à pesquisa e empresas abaixo relacionadas:

1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT
2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC
3. Becton Dickinson: Doação dos tubos coletores de sangue Vacuntainer®
4. Fazenda Figueira (ESALQ – USP): cessão dos animais para o experimento

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cáthia Maria Coelho de Carvalho
e Joaquim Marinho de Carvalho
Por que dedico a vocês meus pais?
Tenho muitos motivos a considerar,
mas de forma resumida posso dizer que é porque
eu os amo e sou feliz.

Sou feliz porque tive vocês como meus pais,
que buscaram não somente me passar instruções,
mas me proporcionaram uma educação adequada
às necessidades da minha formação e da minha consciência.

Vocês foram o alicerce, o fundamento do
ensinamento de honestidade, amor e carinho.

Vocês me presentearam com meus
queridos irmãos, Marcelo e Marly.
A tarefa de vocês foi, é, e sempre será nobre.
Meu muito obrigado meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado ao longo deste trabalho, tornando possível a concretização desse sonho. Porque como disse São Paulo: "Tudo aquilo que é gerado por Deus vence o mundo, e esta vitória que vence o mundo é a nossa fé."

Aos meus irmãos, Marcelo C. de Carvalho e Marly C. C. Neves, que me apoiaram muito em toda a minha vida e também ao meu amigo e cunhado Ivo A. Neves Júnior e aos dois sobrinhos, que amo muito, Cristiano Carvalho Neves e Maria Eduarda Carvalho Neves.

Em especial, ao mestre e amigo, Reitor da UEL, professor doutor Wilmar S. Marçal, por ser uma pessoa dotada de enorme conhecimento, orientou-me durante toda a graduação e agora no mestrado. Meu sincero muito obrigado pela oportunidade e pela confiança.

Às professoras Nilva N. Fonseca e Mara R. S. Balarin pelo auxílio e suporte intelectual no decorrer da pesquisa.

Às minhas avós, Maria de Arruda Coelho e Maria Marinho de Carvalho, mulheres de muita sabedoria e de grande força interior que foram importantes exemplos em minha formação, amo vocês.

In memoriam, aos meus avôs Poty Coelho e José Carvalho da Fonseca, de quem sinto muitas saudades.

À minha querida Ia (Maria), pessoa a qual tenho enorme carinho e gratidão, o meu muito obrigado.

À família Matsuoka, em especial à minha querida namorada Ethel C. M. Alves Matsuoka, obrigado por existir na minha vida.

Aos meus grandes amigos Marcio de Nadai Bonin, Bruno Garcia Botaro, Ivan Luis Stella, Tiago R. Stella, Danilo Laurente Ferreira, Walter Piola, Maira Salomão, Adriana Coelho, Janaína Nagao e Ana Paula de Oliveira.

Aos familiares e ao amigo Danilo T. Stipp que sempre me acolheram em minhas estadas em Londrina e em muitos momentos da graduação.

Aos meus tios, tias, primos e primas que desde muito tempo torcem por mim, e que hoje estão felizes com essa conquista.

À Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura e suporte fornecidos.

A todos os funcionários, em especial aos do Laboratório de Patologia Clínica da UEL, José Roberto e João Cardoso.

Ao CNPq, CAPES, Fazenda Figueira, município de Londrina – PR e Fazenda Bela Manhã, município de São Jerônimo da Serra – PR, que contribuíram muito para a realização da presente pesquisa.

Ao professor Décio Sabattini e ao bioquímico Edílson Cabrera, por auxiliar na extração e mensuração do ácido siálico, ambos do Departamento de Patologia Clínica da UEL.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que deixei de citar involuntariamente, muito obrigado.

RESUMO

CARVALHO, Marcos Coelho de. **Valores de referência do ácido siálico sérico em bovinos da raça nelore e sua aplicação ao diagnóstico precoce da Hematúria Enzoótica dos Bovinos.** 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

A *Pteridium aquilinum* (samambaia) é um dos vegetais tóxicos mais preocupantes em vários países do mundo. No estado do Paraná é uma das plantas tóxicas que causam grandes prejuízos à pecuária, ocorrendo em 105 dos 399 municípios existentes. Por essa razão, a Ciência busca através das instituições de pesquisa, encontrar meios para o controle epidemiológico da intoxicação pela samambaia, visando diagnosticar precocemente a forma clínica da hematúria enzoótica dos bovinos. Em um ensaio realizado na década de 80 pesquisadores demonstraram a alta correlação entre a produção excessiva de mucoproteína nos animais com tumor de bexiga e o ácido siálico. Baseado nesse estudo, realizou-se um ensaio com o objetivo de quantificar e determinar os valores normais do ácido siálico no sangue de fêmeas sadias da raça nelore criadas no Norte do Paraná. Avaliou-se 20 bezerras, 19 novilhas e 20 vacas. A média do ácido siálico em cada grupo foi respectivamente $0,740 \pm 0,311$ g/L, $0,611 \pm 0,225$ g/L e $0,591 \pm 0,236$ g/L. Os valores do ácido siálico encontrados nas bezerras nelore saudáveis foram próximos aos descritos na literatura pesquisada. Porém nas vacas e nas novilhas obtiveram-se menores médias, sugerindo que no nelore adulto sadio, o nível do ácido siálico é inferior comparado com outras raças européias leiteiras. Pautado nessas informações confrontou-se o nível de ácido siálico sérico de 19 novilhas da raça nelore clinicamente saudáveis, contra 29 novilhas também da raça nelore, porém nascidas e criadas em propriedade endêmica para hematúria enzoótica dos bovinos. Na data de coleta, constatou-se que 2 novilhas das 29 novilhas apresentavam o sinal clínico clássico da enfermidade, pois apresentavam sangue na urina. A média do ácido siálico sérico do grupo controle igual a $0,611 \pm 0,225$ g/L, esteve muito próximo da média do grupo avaliado igual a $0,615 \pm 0,258$ g/L. O resultado obtido na presente pesquisa demonstra que não foram significativas as diferenças entre as médias dos grupos. Portanto, o ácido siálico não se demonstrou efetivo como biomarcador, quando testado em novilhas que estão sofrendo intoxicação pela ingestão contínua de samambaia, animais com predisposição ao desenvolvimento de tumor de bexiga.

Palavras-chave: *pteridium aquilinum*, ácido siálico, biomarcadores, bovinos.

ABSTRACT

CARVALHO, Marcos Coelho de. **Reference values of the serum sialic acid in bovines of the Nelore breed and this application to the early diagnosis of Bovine Enzootic Hematuriae.** 2007. 69 f. Dissertation (Master's degree in Animal Science) - State University of Londrina, Londrina. 2007.

Pteridium aquilinum is one of the most concerning toxic fern in many countries in the world. In state bracken fern determines great losses to cattle raising, occurring in 105 of the 399 Parana's municipal. Thus being, the Science research institutions look for ways to anticipate the diagnosis, mainly the clinical Enzootic Hematuriae form of the disease. In an assay in the 80's, researchers demonstrated a positive correlation between excessive mucoprotein production in tumoral bladder of animals and sialic acid. Based in these studies, an assay was carried out to standardize and determine the normal values of sialic acid concentrations in blood of clinically health Nelore females raised in north Paraná. 20 calves, 19 heifers and 20 cows were appraised. The average blood sialic acid concentrations of each group were respectively $0,740 \pm 0,311$ g/L, $0,611 \pm 0,225$ g/L e $0,591 \pm 0,236$ g/L. The values of the sialic acid found in healthy nelore's heifers were close to the described in the world literature. However in the cows and in the heifers medium minors were obtained, suggesting that, in the healthy adult nelore the level of the sialic acid is inferior compared with other races European milk cows. Based on those information the level of serum sialic acid of 19 nelore's heifers clinically healthy was confronted, against 29 heifers also of nelore's race, however been born and reared in endemic property for bovine enzootic haematuriae. In the collection date, it was verified that 2 heifers of the 29 heifers presented the classic clinical sign of the illness, because they were urinating blood. The average of the serum sialic acid of the control group was equal a $0,611 \pm 0,225$ g/L, very close the average of the equal group to $0,615 \pm 0,258$ g/L. The result obtained in the present research demonstrates that were not significant the differences among the averages of the groups. Therefore, the sialic acid was not demonstrated effective as biochemical marker, when tested in heifers that are suffering continuous intoxication for the fern ingestion, animals that can development a bladder tumor.

Keywords: *pteridium aquilinum*, sialic acid, biochemical marker, bovine.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Introdução.....	14
1.2 Considerações Sobre a Planta.....	16
1.2.1 Princípios Tóxicos da Samambaia	17
1.2.2 Condições para Intoxicar.....	19
1.2.3 Perigo das Queimadas.....	20
1.2.4 Manifestação Sazonal.....	20
1.3 Formas Clínicas da Intoxicação em Bovinos.....	21
1.4 Relatos no Estado do Paraná.....	23
1.5 Diagnóstico.....	25
1.5.1 Diagnóstico Diferencial.....	25
1.5.2 Achados de Necropsia	26
1.6 Medidas Terapêuticas	27
1.6.1 Medidas Preventivas	28
1.7 Aspectos de Saúde Pública.....	29
1.8 O ácido Siálico.....	30
1.8.1 Importância do Ácido Siálico na Ciência	32
1.8.2 Marcadores Tumoriais.....	36
REFERÊNCIAS	38
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.2 Objetivos Específicos	45
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	46
3.1 ARTIGO 1 - Determinação dos Valores do Ácido Siálico no Sangue de Fêmeas Sadias da Raça Nelore Criadas no Norte do Paraná	47
3.2 ARTIGO 2 - Avaliação Bioquímica do Ácido Siálico como Biomarcador Tumoral em Novilhas Criadas em Propriedade Endêmica para Hematúria Enzoótica dos Bovinos	57
4 CONCLUSÃO	66
5 APÊNDICE	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Síntese de aminoaçúcares	32
FIGURA 2 Estrutura da membrana celular, com ampliação para um glicolípídeo de mebrana	32
FIGURA 3 Formação de eritrócitos circulantes	34

LISTA DE TABELAS

Determinação dos Valores do Ácido Siálico no Sangue de Fêmeas Sadias da Raça Nelore Criadas no Norte do Paraná

TABELA 1 Valores séricos médios do ácido siálico (g/L) em vacas, novilhas e bezerras da raça nelore clinicamente saudáveis.....52

Avaliação Bioquímica do Ácido Siálico como Biomarcador Tumoral em Novilhas Criadas em Propriedade Endêmica para Hematúria Enzoótica dos Bovinos

Tabela 1 – Valores das médias e desvios padrões 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, da raça nelore.63

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A *Pteridium aquilinum*, popularmente conhecida como samambaia, é um dos vegetais tóxicos mais preocupantes em vários países do mundo, incluindo o Brasil. No Paraná é uma das plantas tóxicas que causam grandes prejuízos à pecuária bovina, ocorrendo em 105 municípios (POLACK, 1990), dos 399 existentes (FERREIRA, 1996). Embora em algumas fazendas as pastagens sejam periodicamente renovadas, ainda assim a samambaia persiste, em proporções que variam de, no mínimo, brotos quase imperceptíveis a arbustos bem viçosos (OLIVEIRA et al., 1998).

Por essa razão, a ciência busca, cada vez mais, encontrar meios para o controle epidemiológico, já que em algumas localidades do estado do Paraná há predileção ou crescimento da planta e muitos pecuaristas utilizam essas áreas como pastagem para cria e recria de gado. Assim sendo, as instituições de pesquisa buscam maneiras de diagnosticar o quanto antes os animais acometidos, sobretudo pela forma clínica da Hematúria Enzoótica dos Bovinos (HEB) e o ácido siálico pode ser um possível biomarcador para essa enfermidade.

A utilização de biomarcadores inflamatórios para o diagnóstico e para o controle pós-operatório de neoplasias na espécie humana, já vem sendo utilizada de forma rotineira há anos. Tem-se verificado também, um aumento crescente de publicações nessa linha de pesquisa na medicina veterinária de animais de companhia. Todavia, esta tecnologia de diagnóstico ainda está pouco difundida na bovinocultura.

Na HEB, é produzido na superfície das células tumorais quantidade razoável de mucina, presente também no interior da bexiga na forma de muco. Trabalho conduzido por Singh et al. (1980) demonstrou a possibilidade de alta correlação entre o ácido siálico e a produção excessiva de mucoproteína pelos animais com neoplasia na bexiga, sugerindo que o ácido siálico é uma substância importante e poderá estar associado ao processo do desenvolvimento tumoral. Conforme Makimura e Usui (1990) destacaram, há inter-relação entre o ácido siálico e o aumento de neutrófilos em bovinos acometidos por doenças inflamatórias. Os

estudiosos Manohar et al. (1993) comprovaram a elevada significância ($P < 0,01$) a correlação entre o ácido siálico e o carcinoma etmoidal em bovinos.

Por estar localizado nas posições terminais de glicoconjugados da superfície celular, o ácido siálico está intimamente envolvido em processos biológicos fundamentais à manutenção da vida, mas em funções diferentes daquelas normalmente atribuídas aos carboidratos, a de armazenadores de energia (glicogênio e amido, por exemplo), ou como componentes de blocos estruturais (quitina e celulose). Os exemplos do envolvimento dos ácidos siálicos são relatados nos processos biológicos que incluem: 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).

Tram et al. (1997) comprovaram também que as maiores concentrações de ácido siálico estão especialmente no cérebro humano e que a suplementação com ácido siálico tem sido associada a um aumento de aprendizagem, após o nascimento com o desenvolvimento cerebral. Neste estudo os pesquisadores observaram que os níveis de ácido siálico na saliva de 18 crianças amamentadas, e o leite é um alimento rico em ácido siálico, foram quase duas vezes mais elevados do que em 15 crianças alimentadas com fórmulas sem o ácido siálico. Os autores concluíram que a concentração mais alta de ácido siálico no leite materno é a responsável pela maior concentração nos fluídos e tecidos corpóreos das crianças amamentadas.

Outro exemplo da presença do ácido siálico pode ser observado no processo inflamatório, mais especificamente no local da inflamação, em que a presença da proteína selectina P na superfície das células endoteliais, interage com um resíduo de ácido siálico específico das glicoproteínas dos leucócitos circulantes na corrente sanguínea. Esta interação diminui a velocidade de difusão dos leucócitos, devido à adesão permitindo a rolagem destes ao longo do revestimento endotelial dos capilares, possibilitando dessa forma, a migração dos leucócitos até o local da inflamação para iniciar uma resposta imune. (NELSON; COX, 2000; BERG et al., 2002; SEARS; WONG, 1999; SLEE et al., 2001).

Ensaio conduzido por Cutil et al. (2004) e Gunes et al. (2004) comprovaram, respectivamente, a evolução sérica do ácido siálico como um

marcador inflamatório em bovinos com reticuloperitonite traumática e os níveis do mesmos com lesões oculares em bezerros com ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

Por essas e outras interações envolvendo o ácido siálico, o aperfeiçoamento de testes práticos para a mensuração desse açúcar, ganha cada vez mais campo na medicina humana e avança como adjuvante na medicina veterinária.

1.2 Considerações Sobre a Planta

A *Pteridium aquilinum*, samambaia do campo ou simplesmente samambaia, é uma planta perene, rizomatosa, herbácea, ereta e ramificada, medindo entre 50 a 180 cm de altura (TOKARNIA et al., 1979).

Os estudiosos destacam que a samambaia é uma planta cosmopolita de todas as regiões tropicais e temperadas (SEHNEM, 1972). Segundo Taylor (1989), a samambaia é encontrada em todos os continentes, exceto no Antártico, sendo considerada a maior praga do reino vegetal e listada entre as cinco espécies vegetais de maior ocorrência na Terra.

Trata-se de um vegetal de característica invasora, sendo bastante freqüente em solos ácidos, arenosos e de baixa fertilidade. Infesta campos, matas ciliares, capoeiras, beiras de matos e de estradas. Na Finlândia, calcula-se que clones individuais da planta existem há mais de 650 anos e que a remoção da cobertura florestal cria *habitat* ideal para a invasão da samambaia (OINONEN, 1967), mantendo-se exuberante em ambientes onde há pouca competição (POLACK, 1990).

Do ponto de vista botânico, o gênero *Pteridium* é considerado monotípico e a única espécie é a *aquilinum*. Entretanto, nessa espécie há duas sub-espécies, *aquilinum* e *caudatum*, sendo estas compostas por diversas variedades geográficas (TAYLOR, 1989). Na América do Sul registra-se, principalmente, a ocorrência de *Pteridium aquilinum* sub-espécie *caudatum*, variedade *caudatum* (TRYON, 1941). No Brasil a presença da *Pteridium aquilinum* já foi registrada em

praticamente todos os estados (LORENZI, 1982), tendo sido identificada a variedade *arachnoideum* (TOKARNIA et al., 2000).

Na literatura pesquisada verificou-se um número variado de trabalhos científicos com a planta *Pteridium aquilinum* e as suas implicações na clínica dos bovinos, demonstrando a correlação entre as manifestações clínicas da toxidez com a ingestão da samambaia pelos bovinos (MARÇAL et al., 2002). Em condições naturais, a samambaia determina, além da hematúria, o carcinoma de orofaringe, popularmente conhecido por "caraguatá", sem haver influência racial no aparecimento dessas enfermidades clínicas (TOKARNIA et al., 1969; MARÇAL et al., 2002).

Estudos realizados no Brasil mostraram alterações cromossômicas em bovinos intoxicados pela samambaia, e que ainda, essa planta tóxica exerce uma ação imunossupressora caracterizada por anemia e diminuição das células de defesa nos animais acometidos (MOURA, 1989).

1.2.1 Princípios Tóxicos da Samambaia

Todas as partes da samambaia contêm os princípios tóxicos em forma ativa, sendo o broto a porção mais tóxica de suas partes aéreas e o rizoma a parte da planta com maior atividade carcinogênica (HIRONO et al., 1973). A planta, mesmo quando dessecada, conserva sua toxidez por muito tempo (TOKARNIA et al., 1979). A brotação que surge após as queimadas ou geadas é muito temida e perigosa, pois concentra uma grande quantidade dos princípios tóxicos da planta, determinando quadros agudos de toxidez (MARÇAL, 2000), principalmente quando há superlotação de pastagens (PARKER; MCCREA, 1965).

Conforme destaca Hopkins (1986), a planta possui diferentes princípios ativos tóxicos com ação carcinogênica, quando ingeridos, entre os quais:

- a) Tiaminase, enzima que degrada a Tiamina ou Vitamina B1, tem maior ação tóxica em eqüinos, que apresentam quadro sintomático neurológico;

- b) Quercetina, considerado um flavonol, é o agente carcinogênico primário da *Pteridium aquilinum*;
- c) Ácido chiquímico, exerce efeitos carcinogênicos variáveis, dependendo do tempo de dessecação e estocagem da planta;
- d) Prunasina, considerada um glicosídeo cianogênico, encontrado nas folhas jovens, exercendo pouca atividade carcinogênica;
- e) Ptaquilosídeo, capaz de produzir tumor intestinal, mamário e de bexiga em ratos experimentais;
- f) Aquilideo A, também possui atividade carcinogênica;
- g) Canferol, é também um flavonol¹ e considerado carcinogênico.

Por muitos anos, as várias substâncias encontradas na samambaia foram relacionadas à atividade carcinogênica, resultados conseguidos através de experimentos em animais de laboratório. “O tanino foi considerado uma dessas substâncias quando inoculado em ratos” (CRUZ; BRACARENSE apud WANG et al., 1976). Entretanto, outros experimentos comprovaram que a administração de samambaia sem tanino induziu em (47%) a mais tumores intestinais nesta mesma espécie (CRUZ; BRACARENSE apud PAMUCKU et al., 1967). Portanto para alguns pesquisadores o tanino não é considerado um componente carcinogênico da *Pteridium aquilinum* (EVANS et al., 1982).

Hoje a ação do tanino tem relação apenas com a formação de um complexo com proteínas insolúveis e não digeríveis. Isto leva a um emagrecimento progressivo do animal, com perturbações na fisiologia do aparelho digestório final em ruminantes. (CRUZ; BRACARENSE apud ALONSO-AMELOT, 1999).

Segundo Polack (1990) outros princípios tóxicos da planta, estão sendo isolados de diversos ácidos orgânicos como o ácido dicafelaitártico, pelo menos cinco flavonóides, perto de 30 pterosina-sesquiterpenos e, também, polissacarídeos, glicosídeos, astragalinas, isoquercetina, catecolaminas e pteraquilina.

¹ Flavonol *sm* (*flavona+ol*) *Quím* Cada um de vários derivados de flavonas, especialmente o composto cristalino incolor C₅H₉O₂(OH), que ocorre em forma de pigmentos vegetais amarelos.

Sobre o ptaquilosídeo, Riet-Correa et al. (1993) afirmaram se tratar de um glicosídeo norsesquiterpeno que contribui significativamente para a ação mutagênica e carcinogênica da *Pteridium aquilinum*. Clarke e Clarke (1975); Tokarnia et al. (1979) e Tokarnia et al. (2000), mencionaram ainda a existência da tiaminase, muito representativa toxicologicamente nos eqüinos, determinando quadro clínico neurológico, embora a toxidez naquela espécie seja rara de ocorrer nas condições brasileiras (MARÇAL; CAMPOS NETO, 1996; MARÇAL, 2000). Já em 1942, Goetze (apud REICHMANN, 1975), supunha existir na samambaia, além da tiaminase, um veneno vascular causador da diátese hemorrágica. Esta fase clínica da doença é popularmente conhecida por “suor de sangue” (MARÇAL, 1990; NIERO et al., 1991), referindo-se a uma manifestação clínica de hematuria (MARÇAL, 2000).

1.2.2 Condições para Intoxicar

Embora a planta não seja palatável, determinadas condições favorecem sua ingestão pelos bovinos. Em épocas de escassez alimentar, a fome constitui a primeira causa básica de ingestão da samambaia pelos bovinos. Isto normalmente ocorre em estações secas, pois a planta suporta bem o período sem chuvas, possibilitando sua procura pelos animais (MARÇAL, 1990). Segundo Tokarnia et al. (2000) os bovinos que ingerem a samambaia acabam “viciados na planta”, por causa das ingestões repetidas e compulsivas, caracterizando-se assim o vício como segundo fator para intoxicar.

O terceiro fator que possibilita a procura dos animais pela planta é a carência de pastagem (TOKARNIA et al., 1979; MARÇAL, 1990). Como a samambaia costuma se desenvolver e atingir boa altura, os bovinos suprem a necessidade de fibra, comendo os caules e folhas longas que a planta normalmente possui (TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000).

Por fim, os bovinos confinados ou semi-confinados podem se intoxicar pelo fornecimento de feno produzido em locais onde ocorra o crescimento da samambaia (MARÇAL et al., 2000; TOKARNIA et al., 2000).

A intoxicação nos eqüinos pela planta ocorre provavelmente quando os animais ingerem aproximadamente 10g/Kg de peso vivo por dia, num espaço de 30 a 40 dias, embora esses animais não tenham hábito de procurar a planta, porque possuem o apetite mais seletivo que os bovinos. Entretanto, as causas apresentadas como condições de favorecimento da intoxicação na espécie bovina podem ser aplicadas aos eqüinos, particularmente pela fome e pela contaminação no feno (MARÇAL, 2000).

1.2.3 Perigo das Queimadas

As queimadas não somente possibilitam a sobrevivência, como também criam condições propícias para o seu crescimento devido as suas características invasivas, surgindo mesmo em áreas onde não havia sua detecção. A brotação que surge após as queimadas concentra uma grande quantidade dos princípios tóxicos, tornando-se altamente perigosa para os animais (MARÇAL et al., 2001).

O desmatamento florestal através do fogo, incentivados pelas atividades agropecuárias, minerais ou madeireiras faz com que a samambaia se propague pelo campo, afetando profundamente o ecossistema local e pondo em risco a economia da atividade agropecuária (ALONSO-AMELOT, 1999).

1.2.4 Manifestação Sazonal

Com relação à manifestação sazonal, Musca (1997), trabalhando com bovinos na Romênia, detectou maior incidência de manifestações clínicas nas estações do verão e outono. No Brasil, Tokarnia et al. (1967), ao presenciarem um surto de intoxicação pela samambaia, associaram a escassez de pastagens no inverno e a presença da planta na propriedade rural com a ocorrência do episódio.

A invasão da samambaia está relacionada diretamente ao manejo das terras, diminuindo consideravelmente quando os campos são cultivados, sem todavia desaparecer completamente. A sua incidência volta a aumentar quando a cultura de terra é abandonada. Relata-se que a frequência de intoxicação de samambaia em bovinos aumenta em regiões em que, devido à má qualidade dos solos, as culturas agrícolas foram abandonadas após as colheitas (DURÃO et al., 1995).

Além da grande resistência frente aos diversos ambientes, a samambaia possui capacidade invasiva muito alta em decorrência de seus esporos. Em épocas de seca os esporos são lançados para a atmosfera podendo viajar centenas de quilômetros e colonizar outras áreas (TROTTER, 1990).

Marçal (2000) também destaca que em fazendas localizadas no sul e sudeste do Brasil, é evidente o aumento da manifestação clínica de surtos agudos na época do inverno, devido à escassez de pastagens nessas estações e pelo fato da samambaia suportar bem a seca. Segundo o autor, a planta tem se disseminado muito no estado do Paraná devido as condições edafoclimáticas favoráveis para ocupar terras não mecanizáveis, e que servem como pastagem ao rebanho bovino.

1.3 Formas Clínicas da Intoxicação em Bovinos

A toxidez da samambaia não se restringe a um único bovino. Normalmente, vários animais são atingidos pelas toxinas, o que permite considerar que a planta exerce malefícios para grandes rebanhos de bovinos. Pesquisadores brasileiros caracterizaram, experimentalmente, três formas clínicas das doenças causadas pela samambaia aos bovinos (MARÇAL; CAMPOS NETO, 1996).

Partindo do pressuposto que a samambaia tem efeito cumulativo, a fase de intoxicação aguda, foi comprovada ao fornecer experimentalmente aos bovinos uma quantidade superior a 10 g/Kg de peso vivo durante três semanas a pouco mais de um mês. Esta fase foi classificada como diátese hemorrágica, sendo popularmente conhecida como "suor de sangue" (TOKARNIA et al., 1969; MARÇAL et al., 2001).

Segundo Yamane et al. (1975), na intoxicação aguda pela samambaia nos bovinos, há também um aumento de fragilidade capilar e no tempo de sangramento, e uma diminuição na retração do coágulo, que pode ser evidenciado com base na trombocitopenia e no aumento do fibrinogênio. Hayashi (1981) relatou que, hematologicamente, bovinos intoxicados revelam depressão da atividade da medula óssea com trombocitopenia e leucopenia comprovada pela biópsia de medula óssea. Pelas observações de Durão et al. (1995), a intoxicação aguda é caracterizada por uma síndrome hemorrágica em quase todas as vísceras, levando os animais a óbito em torno de 12 a 72 horas.

As manifestações crônicas do consumo lento e prolongado das toxinas presentes nas samambaias caracterizam-se pelo crescimento de tumores específicos em bovinos, enfermidades conhecidas pelo nome de hematúria enzoótica dos bovinos (HEB), tumor na bexiga, e carcinomas epidermóides do trato digestivo superior (CETDS), tumor no esôfago (CAMPOS NETO et al., 1975; TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000).

Nos quadros tóxicos não há predisposição por raça (PAMUKCU et al., 1976), ou mesmo sexo (HOPKINS, 1986). No Brasil, os primeiros casos de HEB foram relatados por Bueno (1953) como papilomatose faríngea e por Lacaz (1954) nas observações de cistite com presença de hemácias na urina.

A segunda forma de intoxicação é a HEB, que foi verificada e classificada quando se forneceu a planta aos bovinos em quantidades inferiores a 10 g/Kg durante um ou mais anos (ROSENBERGER; HEESCHEN, 1960; PAMUKCU et al., 1967; MUELLER et al., 1978; MAXIE, 1993). As principais características desta fase evolutiva crônica são a evidência de incontinência urinária com hematúria intermitente e emaciação. Ocorre perda de sangue sem reposição pela medula (anemia aplástica), podendo acometer vacas prenhes e causar abortamento (MARÇAL et al., 1991).

A terceira forma de manifestação foi observada ofertando-se quantidades muito pequenas de samambaia aos bovinos (também inferiores a 10g/kg de peso vivo por dia), porém por vários anos. É caracterizada pela formação de CETDS (DOBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1967).

Essa neoformação por se localizar na faringe, devido ao seu aspecto macroscópico, popularmente é chamada de “figueira da goela” ou “favo” (JARRET, 1978). Os bovinos acometidos apresentam emagrecimento progressivo por dificuldade de deglutição, tosse, “ronquidão” ou “ronqueira”, dispnéia com demasiado cansaço, isolando-se do rebanho (MARÇAL et al., 2002). Costuma acometer bovinos com mais de cinco anos de idade (FENWICK, 1988). Algumas pesquisas sugerem que há uma interação entre o vírus da papilomatose e a substâncias tóxicas da *Pteridium aquilinum* no desenvolvimento desses carcinomas, ou seja, a *Pteridium aquilinum* teria um efeito imunodepressivo frente ao organismo e os vírus, por sua vez, seriam capaz de desenvolver os tumores (JARRET, 1978; CAMPO et al., 1980; FENWICK, 1988; MOURA, 1989; BARKER et al., 1993).

É preciso ressaltar, entretanto, que muitos estudos a campo vem evidenciando que as manifestações de hematúria e o “caraguatá” estão surgindo em bovinos mais jovens, machos e fêmeas, alguns com somente 18 meses de idade, acarretando maiores prejuízos aos criadores (MARÇAL et al., 2000). Destas três formas clínicas classicamente conhecidas a incidência maior de casos refere-se à HEB, e a menor, aos casos de CETDS (MARÇAL et al., 2000).

Muitos acreditam que a ingestão de uma planta espinhosa causa o tumor de garganta nos bovinos, isso ocorre onde há a *Pteridium aquilinum* (samambaia) e a planta espinhosa chamada caraguatá. Trata-se de um tipo de babosa, que não causa o carcinoma epidermóide do trato digestivo superior (CETDS) ou sintoma popularmente chamado de “ronqueira”. Esta babosa é botanicamente classificada com *Aloe humilis* (POLACK, 1990).

1.4 Relatos no Estado do Paraná

Basile et al. (1981) relataram a ocorrência da forma aguda de intoxicação em 16 bovinos na região de Londrina, estado do Paraná, onde os óbitos de todos os animais ocorreram entre um a três dias após o início dos sintomas clínicos, sobretudo por diátese hemorrágica. Niero et al. (1991) relataram um surto de intoxicação aguda pela samambaia em Tamarana, estado do Paraná. Na

oportunidade, final de inverno de 1990, 42 machos e 5 fêmeas da raça nelore, com faixa etária de 12 a 36 meses de vida, vieram a óbito. Os principais sintomas observados pelos autores, em alguns animais antes da morte e na necrópsia, foram hematidrose, epistaxis, hemorragias nas mucosas e serosas, petéquias e sufusões na pleura e peritônio visceral, nos intestinos e rúmen.

Ainda com relação aos episódios de intoxicação aguda pela samambaia, Polack (1990) também observou que os animais do rebanho bovino paranaense, acometidos com o quadro agudo estavam em pastagens infestadas pela *pteridium aquilinum*, o maior número de mortes ocorreu em municípios onde a infestação da planta era mais elevada.

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 Arapoti, que o problema de intoxicação pela planta era mais freqüente nos animais de primeira cria ou em vacas na faixa etária de 4 a 5 anos. Os bovinos apresentavam urina com coloração avermelhada, emagrecimento progressivo e prostração, com quadro clínico irreversível, culminando com óbito no período de 10 a 60 dias.

Marçal et al. (2001) descreveram a ocorrência de um surto de intoxicação aguda pela samambaia em bovinos, criados numa propriedade rural localizada no município de Reserva, estado do Paraná. Um total de 25 animais foi a óbito e a ocorrência da intoxicação teve, muito provavelmente, relação direta com as freqüentes e acentuadas geadas ocorridas no mês de julho de 2000. Além do relato clínico, os autores apresentaram considerações a respeito da proliferação da samambaia no Paraná, destacando condições ambientais e climáticas favorecedoras dessa disseminação, bem como os prejuízos à pecuária e as conseqüências da presença desse vegetal tóxico nas pastagens paranaenses.

Outro surto de intoxicação aguda foi descrito por Marçal et al. (2002), onde 14 bovinos da raça Aberdeen angus, foram a óbito numa propriedade rural localizada no município de Ortigueira, estado do Paraná, infestada pela samambaia. A ocorrência se deve a superlotação de animais em piquetes, que tornaram as pastagens cultivadas muito baixas, favorecendo a procura da samambaia, que se mantinha viçosa e atraente ao consumo animal, possibilitando ingestão de grandes quantidades da referida planta em curto espaço de tempo pelos bovinos.

1.5 Diagnóstico

Quando ocorrem as manifestações clínicas da intoxicação pela samambaia nos bovinos, a primeira conduta ao diagnóstico é constatar a existência da planta na propriedade. Caso haja a existência desta na pastagem, é importante que se colha a urina dos animais para submetê-la à pesquisa laboratorial de microhematúria o que pode auxiliar no diagnóstico da hematúria enzoótica e desta forma, como primeira providência deve-se trocar os animais para pasto sem a samambaia.

Nas situações crônicas, como HEB e CETDS, atendimentos clínicos podem ser feitos em propriedades onde não existe a samambaia. É necessário, então, uma anamnese investigativa, bem como a confirmação da planta na fazenda de origem dos animais. Marçal (2000) alerta para questões litigiosas na compra de animais em leilões e transações comerciais, já que a manifestação clínica, sobretudo de Hematúria, pode ocorrer após algum tempo da chegada dos bovinos na nova propriedade rural, onde não existia ou existe a samambaia.

Deve-se necropsiar os bovinos que morreram, para concluir a toxidez determinada pela samambaia e em algumas circunstâncias, um animal doente pode ser sacrificado para “representar” o rebanho e confirmar a intoxicação. Contudo, nem sempre essa situação é aceita pelos pecuaristas, que preferem destinar para o abate os animais doentes, para diminuir perdas (MARÇAL, 2000).

1.5.1 Diagnóstico Diferencial

Embora as formas clínicas sejam bem conhecidas, é importante considerar algumas enfermidades com sinais clínicos semelhantes para o diagnóstico diferencial.

Na fase aguda ou de diátese hemorrágica pode-se citar a pasteurelose (TOKARNIA et al., 1979), intoxicação por *crotalaria sp*, intoxicação por trevo doce mofado (POLACK, 1990), Clostridiose e a síndrome produzida por

irradiação ionizante, por serem enfermidades que causam alteração da permeabilidade vascular e/ou dos mecanismos de coagulação. (HAGAN, 1952; SIPPEL, 1952; EVANS et al., 1954).

A forma de hematúria enzoótica precisa ser diferenciada de babesiose, leptospirose, hemoglobinúria bacilar e hemoglobinúria pós parto, por serem enfermidades que causam alteração da coloração da urina. (TOKARNIA et al., 1979; MARÇAL, 1990).

A forma de CETDS precisa ser diferenciada da tuberculose e actinobacilose e actinomicose (TOKARNIA et al., 1979), enfermidades com características de emagrecimento progressivo e dificuldade de deglutição alimentar (TOKARNIA et al., 1969; MARÇAL, 1990).

1.5.2 Achados de Necropsia

Durante a necrópsia de bovinos com quadro agudo de intoxicação pode-se perceber lesões hemorrágicas do tecido celular subcutâneo, hemorragias no baço, intestino e bexiga, além de úlceras nas mucosas (TOKARNIA et al., 1979; BASILE et al., 1981; DURÃO et al., 1995; MARÇAL et al., 2001). O sistema digestivo mostra edema e vários pontos hemorrágicos, bem como a presença de fragmentos da samambaia no interior do rúmen (NIERO et al., 1991, MARÇAL et al., 2001). Nesta fase, a histopatologia revela rarefação do tecido hematopoiético na medula óssea, (EVANS et al., 1954; TOKARNIA et al., 1967; TOKARNIA et al., 1979; NIERO et al., 1991; TOKARNIA et al., 2000). As alterações mais significativas do exame hematológico são trombocitopenia e leucopenia (EVANS et al., 1954; NIERO et al., 1991; MARÇAL; CAMPOS NETO, 1996; MARÇAL et al., 2001).

Na HEB, são visíveis os hemangiomas ou nódulos puntiformes na bexiga, às vezes do tamanho de um grão de ervilha, podendo atingir um diâmetro maior (MARÇAL, 2000).

No CETDS, popular “caraguatá”, observa-se formação nodular na região de orofaringe, com o tumor assumindo o aspecto de “couve-flor”, atingindo

importantes estruturas digestivas e respiratórias nos bovinos. A histopatologia revela que o tumor é carcinomatoso. A presença de papilomas no cárdia ruminal e esôfago não é um achado raro, tanto na forma de hematúria como no carcinoma (TOKARNIA et al., 1979; MARÇAL, 2000).

1.6 Medidas Terapêuticas

Não há terapia específica, pois a toxidez da planta pode em curto prazo levar a óbito os bovinos com quadros de diátese hemorrágica ou determinar alterações crônicas irreversíveis na HEB e na CETDS. As tentativas terapêuticas são paliativas (MARÇAL, 2000). Nesse sentido, foi realizado um estudo em propriedades rurais no estado do Paraná, testando a eficácia de alguns produtos na suspensão temporária da hematúria, sobretudo em vacas gestantes, através de um medicamento hemostático diretamente aplicado na bexiga. Os resultados preliminares permitiram considerar esse método terapêutico como importante auxílio para evitar o abortamento dos animais, diminuindo assim, prejuízos aos criadores de bovinos em áreas endêmicas (MARÇAL et al., 1991).

Nos casos da Hematúria Enzoótica, Stober (1970) já mencionava que não se conhece tratamento eficaz e que a retirada dos animais dos pastos invadidos pela samambaia, com adequada suplementação alimentar, levam a uma lenta recuperação, desde que a enfermidade não esteja em estágio avançado, porém nunca há cura completa.

Existe relato da utilização de produtos para estimular a medula óssea a produzir sangue, ação semelhante a alguns anabolizantes humanos. Utilizou-se álcool DL-Batil com esse propósito, mas o teste foi realizado somente em um animal (BLOOD et al., 2002). Essa tentativa terapêutica nem sempre surte o efeito desejado, sendo marcada mais pelo insucesso, pois não há tempo hábil para que a reposição sangüínea assegure a vida do animal enfermo, já que o número de plaquetas e leucócitos é baixo (MARÇAL, 1990). Além disso, é extremamente oneroso o uso desses tipos de medicamentos e nem sempre surtem o efeito esperado. Mediar os animais com sais de ferro também não é recomendado, pois a

anemia não é ferropriva (MARÇAL, 1990; MARÇAL, 2000). Complexos vitamínicos que contenham vitamina K (anti-hemorrágica), bem como as transfusões sangüíneas são inúteis, pois os princípios tóxicos continuam agindo no organismo dos animais, além do que, seria necessário um volume muito grande de reposição sangüínea para debelar o problema, o que a torna inviável economicamente (MARÇAL, 2000).

Alguns criadores do norte do estado do Paraná estão vacinando os bovinos contra hemoglobinúria bacilar, afirmando que as vacas param de urinar sangue. Entretanto, esta observação pode ser considerada também como um paliativo, pois a vacina não atua sobre o efeito tóxico causado pela samambaia. É provável que, como em toda vacinação, os bovinos tenham uma “melhora imunológica transitória”, mas não o suficiente para debelar a Hematúria. Após alguns dias, o problema reincide (MARÇAL et al., 2001).

É preciso destacar, todavia, que há um significativo custo nessas ações, que muitas vezes são executadas para se “mascarar” os sintomas e vender os animais, ou destiná-los ao abate, muitas vezes sem o serviço de inspeção federal nas carcaças (MARÇAL, 2000).

1.6.1 Medidas Preventivas

É necessário e conveniente dedicar atenção especial à profilaxia, única medida que consegue limitar a enfermidade causada pela toxidez da samambaia nos bovinos. A erradicação da planta nos pastos, arrancando-a na época da rebrota é fundamental. O êxito deste procedimento demora algum tempo, mas eliminar a planta ainda continua sendo o melhor procedimento para se acabar com as intoxicações (MARÇAL, 2000). No estado de São Paulo, segundo Marçal (1992), a *Brachiaria decumbens* disseminou-se muito na década de 90, pois não é uma gramínea exigente quanto à questão de fertilidade do solo. Segundo o autor essa rápida disseminação foi responsável pela quase extinção da samambaia em muitas áreas que, no passado, sofriam com mortalidade de bovinos intoxicados.

Na questão da erradicação, melhores perspectivas podem surgir com aplicação da tecnologia agrícola, erradicando a samambaia por um cuidado

intensivo do solo, com boas e completas adubações, calagem e formação de novas pastagens com qualidade. Se estas medidas não forem possíveis, recomenda-se a alternância de pastoreio entre pastos contaminados e limpos em períodos de vinte e um dias (REICHMANN, 1975).

É extremamente importante que haja correta e contínua mineralização do gado em áreas onde a samambaia ainda não foi erradicada. O sal mineral exerce importante ação preventiva, evitando que os animais tornem-se imunodeprimidos e mais vulneráveis, condição propícia para que a planta acelere as manifestações tóxicas nos bovinos (MARÇAL, 2000). As zonas geográficas onde a samambaia predomina e onde freqüentemente ocorrem as intoxicações dos bovinos são caracterizadas por solos pobres, ácidos, com baixos níveis de cálcio e fósforo (DURÃO et al., 1995).

Deve-se também evitar a superpopulação de animais num mesmo pasto, por decorrência de impedir a deterioração rápida das pastagens, a falta de pasto faria os bovinos procurarem a samambaia para suprir a fome. Alguns criadores adquirem animais em época de preço baixo e arrendam pastagens para recria. Normalmente as terras mais baratas para esta finalidade são aquelas onde há presença da planta, o que acaba determinando grandes prejuízos pela sua toxidez.

O desmatamento, destoca, degradação das pastagens e os roçados abandonados levam ao desequilíbrio ecológico, com variações climáticas indesejáveis, causando o empobrecimento do solo e favorecendo a proliferação da samambaia. Por essas razões, esses aspectos devem ser sempre evitados (MARÇAL et al., 2001).

1.7 Aspectos de Saúde Pública

No homem há uma correlação positiva em se ingerir leite de vacas contaminado pelo ptaquilosídeo e a maior incidência de câncer no estômago (ALONSO-AMELOT et al., 1996). A toxina da planta já foi isolada no leite bovino, e os bezerros que mamam o leite de vacas intoxicadas já sofrem os efeitos da

intoxicação desde que nascem. Estudos também demonstraram a formação de tumores em ratos e camundongos alimentados com leite de vacas que consumiram samambaia. O consumo de leite de vacas intoxicadas deve ser rigorosamente evitado e comercializado. No Japão, há uma tradição em se consumir a samambaia, através de um prato conhecido por “warabi”, considerado um alimento nacional, sendo, por outro lado, responsável por alta incidência de câncer de estômago (HIRAYAMA, 1979).

Pela literatura consultada, não há ainda, conhecimento científico suficiente para condenar o consumo de carne dos bovinos acometidos pela enfermidade. Entretanto, alguns pesquisadores alertam que uma maior porcentagem de câncer de estômago no homem, ocorre nas regiões onde existem vacas leiteiras que ingerem samambaia (ALONSO-AMELOT et al., 1996). Por estas condições, é preciso evitar o consumo da carne de animais contaminados, como prevenção à saúde do homem, exemplo que ressalta ainda mais, a importância dos conhecimentos da ciência veterinária e suas inúmeras contribuições para a saúde pública.

1.8 O Ácido Siálico

Os ácidos siálicos são carboidratos ou mais especificamente açúcares formados por 9 carbonos, ligados normalmente a outros carboidratos por ligações acetosídicas. Estas ligações ocorrem nas posições terminais de glicoconjugados, ou seja, glicoproteínas e glicolipídios localizados na superfície da membrana celular. Estes ácidos estão intimamente envolvidos aos processos biológicos fundamentais à manutenção da vida, ou seja, as células, muito diferente das funções normalmente atribuídas aos carboidratos de armazenadores de energia (glicogênio e amido, por exemplo) ou como componentes de blocos estruturais (quitina e celulose). Exemplos do envolvimento dos ácidos siálicos em processos biológicos incluem as funções de mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus, entre outras (NELSON; COX, 2000; BERG et al., 2002).

Em 1951 Gottschalk 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, tem como molécula precursora a N-acetil-D-manosamina ou simplesmente NanaNac (ANGATA; VARKI, 2002).

Outros derivados comuns; porém encontrados em menor quantidade, são ácido N-glicosilneuramínico (Neu5G1, 2) e 5-hidroxineuramínico (ácido 3-desoxi-D-glicero- α -D-galacto-non-2-ulopiranosônico - KDN, 3). Foi relatada a ocorrência de derivados dos ácidos siálicos 1, 2 e 3 que incorporam em suas estruturas um ou mais grupos acetilas, ou envolvem a lactonização ou fosforilação da hidroxila em C9 ou a metilação ou sulfatação da hidroxila em C8. Como componentes de glicoconjugados, os ácidos siálicos estão ligados a hexoses, como α (2,3)- ou α (2,6)- α -Gal ou α -GalNHR e ligados a outros ácidos siálicos como α (2,8) segundo (CHAMPE; HARVEY, 2002)

A ação da enzima Neu5Ac aldolase (também conhecida como ácido siálico 9-P sintase) sobre a N-acetil-D-manosamina 6-fosfato, na presença de fosfoenolpiruvato (FEP), gera uma base de Schiff e, subsequente, o ácido siálico-9-P (ácido N-acetilneuramínico 9-fosfato), segundo destacam (KEPPLER, 2001; JACOBS, 2001). A perda do grupamento fosfato, mediada pela enzima ácido siálico 9-fosfato fosfatase fornece o ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico – Neu5Ac) total que é direcionado ao núcleo da célula.

Neste compartimento, o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) é ativado à custa de hidrólise de citidina trifosfato (CTP), sendo formado CMP-ácido siálico que é transportado para o complexo de Golgi. Nesta organela, CMP-ácido siálico atuará como doador de glicosídeo no processo de alongamento de cadeias dos oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídios, por ação de enzimas denominadas sialiltransferases. Assim, glicoproteínas ou glicolipídios sialilados são secretados ou entregues à membrana plasmática da célula (KEPPLER, 2001).

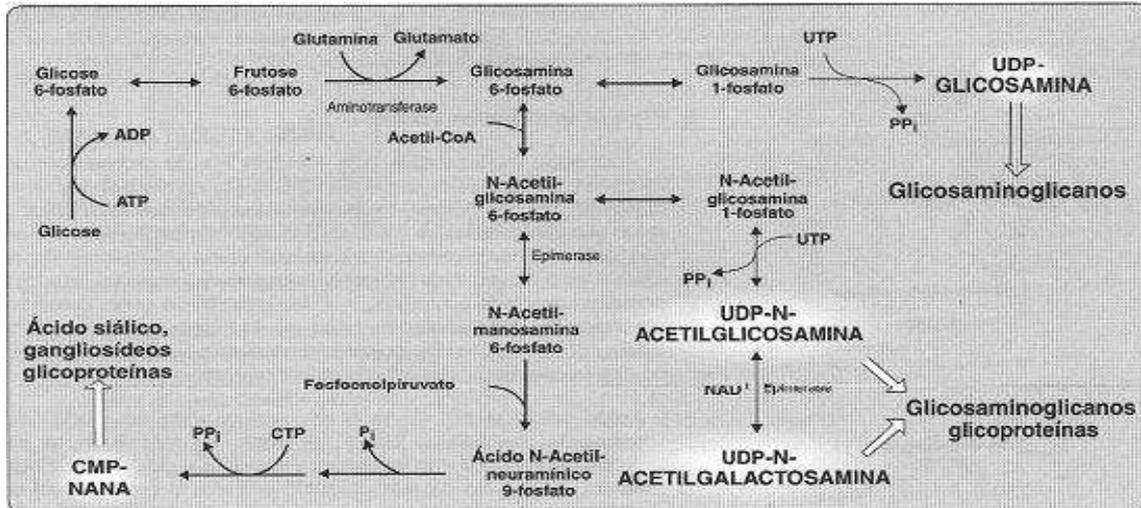


Figura 1 – Síntese de aminoaçúcares
Fonte: Champe e Harvey (2002, p.157)

1.8.1 Importância do Ácido Siálico na Ciência

Os ácidos siálicos encontram-se presentes na membrana celular, cravados nas proteínas, glicoproteínas e glicolípídios. As proteínas transportadoras na membrana celular permitem a passagem de certos íons e moléculas, outras proteínas exercem o papel de receptor, transmitindo o sinal do exterior para o interior da célula, há ainda proteínas que funcionam como enzimas, participando de reações que ocorrem nas membranas.

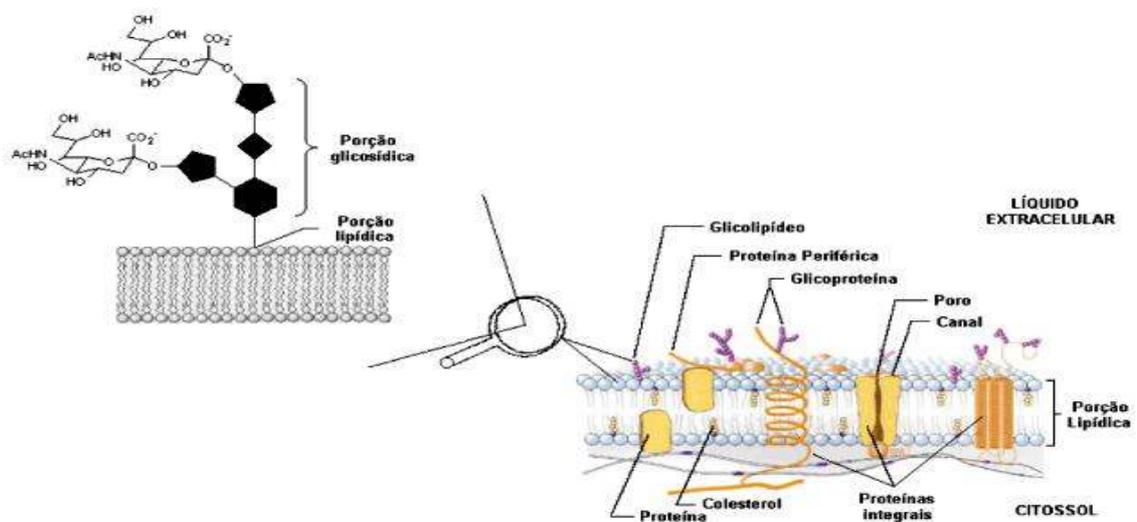


Figura 2 - Estrutura da membrana celular, com ampliação para um glicolípídeo de membrana.
Fonte: Fátima et al. (2003)

As glicoproteínas são fundamentais em processos biológicos como fertilização, ativação do sistema imune, replicação viral, crescimento e renovação celular (DWEK, 1996). A biomedicina reconhece, cada vez mais, o câncer como um distúrbio resultante de genes anormais, e muitos pesquisadores do câncer acreditam que, alterações na estruturas das glicoproteínas e outros glicoconjugados nas superfícies das células cancerosas, são importantes no fenômeno da metástase (MURRAY, 1998).

Esse processo tem a seguinte explicação: como as lectinas reconhecem açúcares específicos, elas então, são utilizadas para testarem a um nível geral, os resíduos de açúcares expostos nas membranas (MURRAY, 1998). Isso sugere que a organização ou a estrutura de uma série de glicoproteínas nas superfícies de células tumorais, seja de certa forma, diferentes da observada em células normais.

As mucinas que também são compostas de glicoproteínas, em alguns casos, tendem a mascarar determinados antígenos de superfície. Muitas células cancerosas formam quantidades excessivas de mucinas, protegendo as células mutantes neoplásicas contra a supervisão imunológica (MONTGOMERY et al., 1994).

Nos tecidos extra-neurais os ácidos siálicos presentes nas glicoproteínas de membrana celular são alvos de pesquisa contra o câncer, entretanto, no corpo dos mamíferos são poucas as concentrações de ácido siálico nas superfícies das membranas das células, menos de 10% do ácido siálico total que está presente no organismo. A maior parte do ácido siálico presente no organismo dos mamíferos encontra-se no sistema nervoso central, particularmente nas terminações nervosas, sob a forma de gangliosídeos, que contém glicoesfingolipídeos cobertos de ácido siálico.

Nos eritrócitos os ácidos siálicos atuam como mediadores na renovação celular. As células eritrocíticas ao se formarem na medula óssea atingem a maturação e são lançadas a corrente sanguínea e têm como principal função o transporte de oxigênio a todos os tecidos do corpo. Um dos eventos biológicos que determinam o tempo de vida útil do eritrócito, que é em média de aproximadamente 120 dias, é a perda dos resíduos de ácidos siálicos presentes em seus glicoconjugados de membrana (MAMMEN et al., 1998). As unidades de ácidos

siálicos encontradas nas extremidades protegem essas células da captação pelo fígado. Quando os eritrócitos estão velhos e prontos para a destruição e reposição, ocorre a remoção dos ácidos siálicos terminais pela enzima sialidase expondo resíduos de galactose, que interagem com receptores dos hepatócitos (MAMMEN et al., 1998).

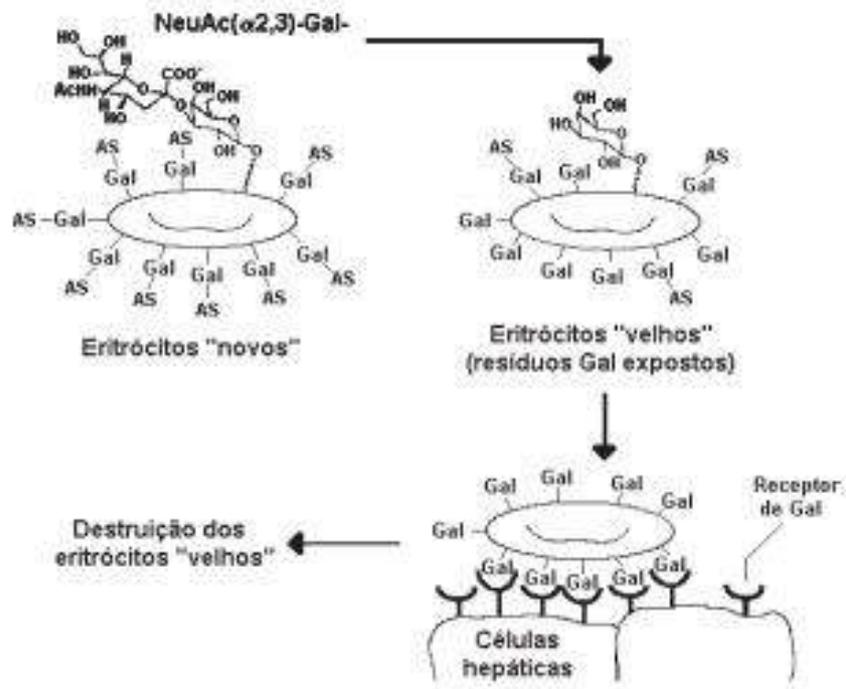


Figura 3 – Formação de eritrócitos circulantes
Fonte: Fátima et al. (2003)

Estudo em células eritrocíticas de humanos foi observado que o ácido siálico quando administrado nesse meio de cultura celular promove hemólise em torno de 9% das células, por causar instabilidade na membrana celular. Entretanto, quando o ácido siálico é introduzido com cálcio esse efeito não foi observado, ao contrário, em situações de estresse osmótico, esse conjunto medicamentoso promoveu uma melhora na resistência da membrana eritrocítica (BRUNO; CUPPINI, 1981).

Outro exemplo da importância dos estudos sobre os ácidos siálicos refere-se ao processo inflamatório. Neste caso, os leucócitos que circulam na corrente sanguínea devem se ligar à superfície de células endoteliais (células que

revestem os vasos sanguíneos) antes de migrarem entre estas células para chegar ao local atingido. No local da inflamação, a selectina P da superfície das células endoteliais interage com um resíduo de ácido siálico específico das glicoproteínas dos leucócitos circulantes, esta interação diminui a velocidade de circulação dos leucócitos, devido à adesão e à rolagem destes ao longo do revestimento endotelial dos capilares (SLEE et al., 2001).

Uma segunda interação entre as moléculas de integrinas localizadas na membrana plasmática dos leucócitos e uma proteína de adesão na superfície das células endoteliais permite sua passagem através da parede do capilar para os tecidos danificados, para iniciar uma resposta imune. Fármacos que interferem na ligação selectina-carboidrato auxiliam no tratamento de doenças inflamatórias crônicas causadas por leucócitos hiperativos (SEARS; WONG, 1999).

De todos os processos biológicos mediados por ácidos siálicos, os que despertaram maior interesse e se tornaram alvo de estudos mais detalhados, a maior parte deles ainda em andamento, são referentes à infecção dos humanos por bactérias e vírus. Por exemplo, a toxina *pertussis*, produzida por *Bordetella pertussis*, bactéria que causa a coqueluche, penetra na célula alvo somente depois de interagir com um oligossacarídeo contendo uma unidade de ácido siálico terminal (NELSON; COX, 2000; BERG et al., 2002).

Em bovinos o ácido siálico sérico foi mensurado nos bezerros acometidos pela bactéria *Moraxela bovis*, causadora de ceratoconjuntivite (GUNES et al., 2004). Os resultados demonstraram que o valor médio nos animais saudáveis foi de $0,764 \pm 0,031$ g/L; nos animais doentes $1,069 \pm 0,036$ g/l, sendo crescente de acordo com a sintomatologia, leve, moderada, ou grave. Ensaio conduzido por Cital et al. (2004) comprovaram a evolução sérica do ácido siálico como um marcador inflamatório em bovinos com reticuloperitonite traumática.

Por fim, a compreensão de detalhes dos sítios de ligação das toxinas (lectinas) aos oligossacarídeos, ainda incipiente, pode permitir, por engenharia genética, a produção de toxinas análogas para uso nas vacinas. As toxinas podem ser modificadas de forma a perder a sua potencialidade, tornando-se atenuadas, o que permitiria o desencadeamento de uma resposta imune que proteja o organismo quando exposto à toxina natural (BERG et al., 2002).

1.8.2 Marcadores Tumorais

Marcadores tumorais são substâncias encontradas no sangue, urina ou tecidos de indivíduos com certo tipo de câncer. A maioria dos marcadores tumorais são proteínas ou fragmentos de proteínas. Eles são produzidos pelo próprio tumor ou pelo organismo como resposta à presença do câncer (MILLER et al., 1978).

É importante lembrar que na medicina humana quase nenhum resultado de marcador tumoral isoladamente determina condutas no tratamento de câncer. São utilizados outros testes e exames para explorar se há outros fatores que estejam causando alterações no nível dos marcadores.

A maior parte dos marcadores tumorais é medida por um exame no sangue ou na urina. Os médicos colhem uma pequena quantidade de sangue ou urina e submetem a um exame especial de laboratório. Os testes medem a quantidade dessas substâncias (marcadores tumorais) encontradas na amostra. Alguns marcadores tumorais são medidos diretamente de uma amostra do tumor retirada durante a biópsia. Esses marcadores tumorais dão informações aos médicos sobre o tumor e como ele poderá reagir aos diferentes tipos de tratamento.

Os marcadores tumorais são utilizados para auxiliar no:

- a) Rastreamento do câncer: Alguns marcadores tumorais são utilizados para a triagem de pessoas com alto risco de desenvolver um câncer. Eles agem como um “sinal de alerta”, apontando aos médicos que novos exames podem ser necessários. Esses marcadores tumorais podem auxiliar na detecção do câncer em um estágio bem precoce, quando há melhor chance de cura;
- b) Diagnóstico do câncer: Os marcadores tumorais não são comumente utilizados para diagnosticar o câncer. O câncer poderá ser diagnosticado através de uma biópsia. Entretanto, o nível do marcador tumoral na época do diagnóstico poderá auxiliar o médico a prever a evolução provável da doença;

- c) Monitorizar o tratamento do câncer: Esse é o uso mais comum dos marcadores tumorais. Os marcadores tumorais são regularmente dosados durante o tratamento com o objetivo de avaliar se o mesmo está funcionando. Isso é chamado de exame seriado. Se o câncer estiver respondendo ao tratamento, os níveis do marcador tumoral quase sempre diminuem. Se os níveis aumentarem, isso poderá ser um sinal de que o câncer não está respondendo ao tratamento;
- d) Detectar o reaparecimento do câncer: É outro uso comum dos marcadores tumorais. Exames de seguimento realizados regularmente podem ajudar o médico a detectar um possível retorno ou recorrência do câncer antes do mesmo aparecer no raio-X, na tomografia computadorizada ou no exame físico. Quanto mais rápido a recorrência é detectada, mais fácil e eficaz será seu tratamento (COONER,1993).

Alguns marcadores tumorais na medicina humana ainda encontram-se em investigação, tais como o ácido siálico LASA (ácido siálico associado a lipídeos) mensurado no sangue. No início, parecia ser um marcador tumoral, uma vez que um estudo demonstrou que seus níveis caíam após cirurgia. Entretanto os níveis de LASA também diminuem após a remoção de pólipos não-cancerosos.

Entretanto, na medicina veterinária um dos trabalhos conduzido por Singh et al. (1980) em 11 vacas, sendo 4 saudáveis e 7 hematóricas, houve aumento de 35% e 50% nos níveis de mucoproteína e ácido siálico séricos, respectivamente, quando comparado em ambas categorias, isto pode ser reflexo da reação tecidual e da presença de neoplasias. Makimura e 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 a elevada significância ($P < 0,01$) entre o ácido siálico total como também o ligado a lipídios com o Carcinoma Etmoidal em Bovinos.

Portanto, cada vez mais pesquisas da medicina humana e veterinária envolvendo o ácido siálico, convalidam este açúcar como um marcador tumoral confiável.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho, salud animal y salud humana. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, New York, v. 16, p. 528-547, 1999.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; SMITH, B.L.; LAUREN, D.R. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**, London, v. 382, n. 6592, p. 587, 1996.
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. **Chem. Rev.**, Washington, n. 702, p. 439-439, 2002.
- BARKER, I. K.; VAN DREUMEL, A. A.; PALMER, N. The alimentary system: neoplasia of the esophagus and forestomachs. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P.C.; PALMER N. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. 4.ed. San Diego: Academic, 1993. v. 2, p. 51-52.
- BASILE, J. R.; GASTE, L.; REIS, A.C. F. Intoxicação aguda de bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*) no estado do Paraná. **Rev. Ciênc. Agr.**, Curitiba, v. 3, p. 167-170, 1981.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2002.
- BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A.; RADOSTITS, O. M. **Clínica veterinária**. 9. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002.
- BRUNO, C.; CUPPINI, R. The importance of N-acetylneuraminic acid and of its interaction with Ca⁺⁺ in the stability of the erythrocytic membrane. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, Napoli, v. 5, n. 21, p. 44-50, 1981.
- BUENO, P. Papilomatose faringea em bovinos. **Biológico**, São Paulo, v. 19, n. 1, p.8-10, 1953.
- CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; JARRET, W. F. H.; LAIRD, H. M. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, London, v.286, n. 5769, p. 180-182, 1980.
- CAMPOS NETO, O.; BARROS, H. M.; BICUDO, P. L. Estudo do carcinoma do trato digestivo superior e da *Hematúria Enzoótica* dos Bovinos na região de Botucatu-SP. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 125-139, 1975.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R.A. Glicosaminoglicanos. In: _____. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2002. p. 153-168.
- CITIL, M.; GUNES, V.; KARAPEHLIVAN, M.; ATALAN, G.; MARASLI, S. Evaluation of serum sialic acid as an inflammation marker in cattle with traumatic reticulo peritonitis. **Rev. Med. Vet.**, Toulouse, v. 155, n. 7, p. 389-392, 2004.

CLARKE, E.G. C.; CLARKE, M. D. **Veterinary toxicology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1975.

COONER, W. H. Definition of the ideal tumor marker. **Urol Clin North Am.**, Philadelphia, v.20, p.575, 1993.

DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de Hematúria e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 2, p. 489-504, 1967.

DURÃO, J. F. C.; FERREIRA, M. L.; CABRAL, A.; PELETEIRO, M. C.; AFONSO, F.; CORREIA, J. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da Hematúria Enzoótica dos bovinos. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, Lisboa, v. 5, n. 1, p. 11-20, 1995.

DWEK, R. A. Glycobiology: Towards understanding the function of sugars. **Chem. Rev.**, Washington, v. 96, p. 683-720, 1996.

EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R.; HUGHES, L. E. Studies on bracken fern poisoning in cattle. **Br. Vet. J.**, London, v. 110, pt. 1, p. 295-306, 1954.

EVANS I. A.; PROROK, J. H.; COLE, R. C.; AL-SALMANI, M. H.; AL-SAMARRAI, A. M. H.; PATEL, M. C.; SMITH, R. M. M. The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. **Proc. Royal Soc.**, Edinburgh, v.81B, p.65-77, 1982.

FÁTIMA, A.; BAPTISTELLA, L. H. B.; PILLI, R. A. Ácidos Siálicos: da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 306-316, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v28n2/23654f2.gif>. Acesso em: set. 2007.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*): toxic effects and toxic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 46, p. 147-173, 1988.

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. **Rev. Med. Vet.**, Toulouse, v. 155, n. 10, p. 508-511, 2004.

HAGAN, W. A. Bracken poisoning of cattle. **Cornell Vet.**, Ithaca, v. 15, p. 326-332, 1952.

HAYASHI, T. Application of jamshidi's needle to bone marrow biopsy and diagnosis of bracken poisoning in cattle. **J. Japan Vet. Med. Assoc.**, Tokyo, v. 34, p. 206-211, 1981.

HIRAYAMA, T. Diet and cancer. **Nutr. Cancer**, Mahwah, v. 1, p. 67-81, 1979.

HIRONO, I.; FUSHIMI, K.; MORI, H.; MIWA, T.; HAGA, M. Comparative carcinogenic activity of in each part of bracken. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v .50, n. 5, p. 1367-1371, 1973.

HOPKINS, N. C. G. Aetiology of enzootic haematuria. **Vet. Rec.**, London, v. 118, p. 715-717, 1986.

JACOBS, C. L.; GOON, S.; YAREMA, K. J.; HINDERLICH, S.; HANG, H. C.; CHAI, D. H.; BERTOZZI, C. R. Substrate Specificity of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway. **Biochemistry**, Washington, v. 40, n. 43, p. 12864-12874, 2001.

JARRET, W. F. H. Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma in cattle. **Bull. Cancer**, Paris, v. 652, p.191-194, 1978.

KATOPODIS, N.; HIRSHAUT, Y.; GELLER, N. L.; STOCK, C. C. Lipid-associated sialic acid test for detection of human cancer. **Cancer Res.**, Philidelphia, v. 42, n. 12, p. 5270-5275, 1982.

KEPPLER, O. T.; HORSTKORTE, R.; PAWLITA, M.; SCHMIDT, C.; REUTTER, W. Biochemical engineering of the *N*-acyl side chain of sialic acid: biological implications. **Glycobiology**, Cary, v. 11, n. 2, p.11R-18R, 2001.

LACAZ, S. J. Cistite hemorrágica ou hematúria crônica dos bovídeos. **Biológico**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 64-65, 1954.

LEVINSON, S. A.; McFATE, R. P. **Clinical laboratory diagnosis**. 7. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1969.

LORENZI, H. *Pteridium aquilinum* (L) Kuhn. In: _____ **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: Plantarum 1982. p. 341

MAKIMURA, S.; USUI, M. Correlation between haptoglobin and sialic acid or mucoprotein in diseased bovine serum. **Jpn. J. Vet. Sci.**, Tokyo, v. 52, n. 6, p. 1245-1250, 1990.

MAMMEN, M.; CHOI, S. K.; WHITESIDES, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. **Angew. Chem. Int. Ed.**, Weinheim, v .37, n. 20, p. 2754-2794, 1998.

MANOHAR, B. M.; SUNDARARAJ, A.; NAGARAJAN, B.; SHANMUGAM, V. Biochemical markers in the diagnosis of ethmoid carcinoma in cattle. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 70, n. 1, p. 14-16, 1993.

MARCADORES tumorais. **Brasilmedicina.com**, São Paulo, v. 6, n. 310, jun. 2007. Disponível em: <http://www.brasilmedicina.com.br/noticias/pgnoticias_det.asp?AreaSelect=2&Codigo=1283>. Acesso em: jun. 2007.

MARÇAL, W. S. Samambaia em pasto é veneno. **Folha de Londrina**, Londrina, 24 mar. 1990. Folha Rural, n. 718, p. 13.

MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; BALARIN, M. R. S. Perspectiva terapêutica para a hematuria enzoótica dos Bovinos: I - Estudo clínico preliminar. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 46., 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SPMV, 1991, p.48.

MARÇAL, W.S. Braquiária reduz a intoxicação por samambaia. **O Estado de S. P.**, São Paulo, 23 set. 1992. Suplemento Agrícola, p.24.

MARÇAL, W. S.; CAMPOS NETO, O. Condições nutricionais favoráveis à toxidez da samambaia nos bovinos. **Pec. Corte**, São Paulo, v. 61, p. 94-96, nov.1996.

MARÇAL, W. S. **A toxidez da samambaia nos bovinos**. 2000. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/bovino-samambaia.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2005.

MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; MARQUES, M. C.G.; FERNANDES, R. P.; MONTEIRO, A. A. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná – Brasil. **Semina**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 139-144, jul./dez. 2001.

MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; MONTEIRO, F. A. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Abeerden angus. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 77-81, 2002.

MAXIE, M. G. The urinary system. Enzootic hematuria. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic Press., 1993. p. 534-536

MILLER, C. A.; WANG, P.; FLASHNER, M. Mechanism of *arthrobacter sialophilus* neuraminidase: the binding of substrates and transition-state analogs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Netherlands, v. 83, n. 4, p. 1479-1487, 1978.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. W; SPECTOR, A.A. **Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos**. 5.ed. Porto Alegre: Artes Medicas, 1994.

MOURA, J. V. **Aberrações cromossômicas em bovinos intoxicados crônica e naturalmente pela samambaia (*Pteridium aquilinum*)**. 1989. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MURRAY, R. K. Glicoproteínas. In: HARPER, H.A. **Harper: bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p.648-654

MUSCA, M. S. Histopathological and haematological studies in cows with enzootic haematuria. **Rev. Rom. Med. Vet.**, Bucuresti, v. 7, n. 3, p. 241-245, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3. ed. : New York: Worth Publisher, 2000.

NIERO, L.; MARÇAL, W. S., REIS, A. C. F., ACCORSI, E. Surto de intoxicação aguda em bovinos pela ingestão de samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná. In: SIMPÓSIO DE ESTAGIÁRIOS DO CCB/UDEL, 9., 1991, Londrina, Pr. **Anais...** Londrina: UEL, 1991. p. 90

OINONEM, E. The correlation between the size of finish bracken *Pteridium aquilinum* (L) Kuhn clones and certain periods of site story. **Acta Forestalia Fennica**, v.83, n.2, p.1-51, 1967.

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)

PAMUKCU, A. M.; GOKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary bladder neoplasms induced by feed bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 917-924, 1967.

PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M.; BRYAN, G. T. Naturally occurring and bracken – fern - induced bovine urinary bladder tumors. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 13, p.1 10-122, 1976.

PARKER, W. H.; McCREA, C.T. Bracken (*Pteris aquilina*) poisoning of sheep in the Nort York Moors. **Vet. Rec.**, London, v. 77, p. 861-866, 1965.

POLACK, E. W. **Toxicidade da *Pteridium aquilinum* no Estado do Paraná**. 1990. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1990.

REICHMANN, C. E. **Hematúria enzoótica dos bovinos**. São José do Rio Preto, 1975. (Palestra proferida).

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicação por plantas e micotoxícoses em animais domésticos**. Pelotas: Varela, 1993.

ROSENBERGER, G.; HEESCHEN, W. Adlerfarn (*Pteris aquilina*) – die Ursache des sog. Stallrottes der Rinder (Haematuria vesicalis bovis chronica). **Dtsch. Tierarztl. Wschr**, Hanover, v. 67, n. 8, p. 201-208, 1960.

SEARS, P.; WONG, C. H. Carbohydrate mimetics: A new strategy for tackling the problem of carbohydrate-mediated biological recognition. **Angew. Chem, Int. Ed.**, Weinheim, v. 38, n. 16, p. 2301-2324, 1999.

SEHNEM, A. Pteridáceas. In: REITZ, P.R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972.

SINGH, A.K; JOSHI, H.C; RAY, S.N. Serum mucoprotein and silical acid in enzootic bovine haematuria. **Zentbl. Vet. Med. Reih. A**, Berlin, v. 27, n. 8, p. 678-681, 1980.

SIPPEL, W. L. Bracken fern poisoning. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 121, p. 9-13, 1952.

SLEE, D. H.; ROMANO, S.J.; YU, J.; NGUYEN, T.N.; JOHN, J.K.; RAHYA, N.K.; AXE, F.U.; JONES, T.K.; RIPKA, W.C. Development of potent non-carbohydrate imidazole-base small molecule selectin inhibitors with antiinflammatory activity. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 44, n. 13, p. 2094 -2107, 2001.

STOBER, M. Adlefarn (*Pteridium aquilinum*). In. ROSENBERGER, G. (Ed.). **Krankheiten des rindes**. Berlin: Paul Parey, 1970. p. 1260-1265.

TAYLOR, J. A. The Bracken problem: a global perspective. In: TAYLOR, J.A.; SMITH, R.T. (Ed.). **Bracken control and management**. Sydney: Australian Institute of Agricultural Science, 1989. p. 3-19.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de intoxicação aguda pela "samambaia" (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 2, p. 329-336, 1967.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; CANELLA, C.F.C. Ocorrência de Hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil: II estudos complementares. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 4, p. 209-224, 1969.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000.

TRAM, T. H.; BRAND MILLER, J. C.; McNEIL, Y.; McVEAGH, P. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants. **Arch. Dis. Childhood**, London, v. 77, v. 4, p. 315-8, 1997.

TROTTER, W. R. Is bracken a health hazard? **Lancet**, Minneapolis, v. 336, p. 1563-1565, 1990.

TRYON, R. M. A revision of the genus *Pteridium*. **Rhodora**, Lawrence, v. 43, p. 1-67, 1941.

WANG, C.Y.; CHIU, C.W.; PAMUCKU, A.M.; BRYAN, G.T. Identification of carcinogenic tannin isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. **Journal. Natl. Canc. Inst.**, Oxford, v.56, p.33-36, 1976.

WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of siálico acids. **J. Biol. Chem.**, 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: Infect. Disord**, v. 4, n. 5, p. 389-408, 2003.

YAMANE, O; HAYASHI, T; SAKU, S. Studies on blood coagulation disorders in domestic animals thrombelastograms of normal cattle and cattle affected with bracken poisoning. **Jpn. J. Vet. Sci.**, Tokyo, v. 37, p. 577-583, 1975.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Mensurar o marcador inflamatório e tumoral ácido siálico no sangue de bovinos da raça nelore criados no estado do Paraná, visando o auxílio no diagnóstico precoce da hematúria enzoótica dos bovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilização da técnica de espectrofotometria para determinação dos valores médios do ácido siálico no soro sangüíneo de vacas, novilhas e bezerras da raça nelore, clinicamente sadias;
- Determinar as concentrações séricas do ácido siálico em novilhas sadias e comparar com os valores encontrados em novilhas nascidas e criadas em propriedade endêmica para hematúria enzoótica dos bovinos (HEB).

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

RESUMO

Determinação dos Valores do Ácido Siálico no Sangue de Fêmeas Sadias da Raça Nelore Criadas no Norte do Paraná

Marcos Coelho de Carvalho²

Os marcadores tumorais e inflamatórios são substâncias encontradas no sangue, urina ou tecidos de pessoas e/ou animais com certos tipos de neoplasias ou inflamações crônicas. Eles são produzidos pelo próprio tumor ou pelo organismo como resposta à inflamação ou à presença do câncer. A utilização de biomarcadores, como o ácido siálico, no diagnóstico e no controle pós-operatório de neoplasias na espécie humana, já vem sendo utilizada de forma rotineira há anos. Porém, esta tecnologia de diagnóstico ainda está pouco difundida na medicina veterinária em se tratando de animais de produção. Envolvidos em processos biológicos fundamentais à manutenção da vida, os ácidos siálicos (açúcares de nove carbonos) encontram-se na membrana celular, exercendo funções como: mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular e renovadores celulares, entre outras. Em um ensaio na década de 80, pesquisadores demonstraram a alta correlação entre a produção excessiva de mucoproteína nos animais com tumor de bexiga e o ácido siálico. Outros destacaram a inter-relação entre o ácido siálico e o aumento de neutrófilos em bovinos acometidos por doenças inflamatórias. Comprovaram também em elevada significância a correlação entre o ácido siálico e o carcinoma etmoidal em bovinos. Pelo fato do ácido siálico mostrar-se significativamente aumentado em enfermidades como: Hematúria Enzoótica dos Bovinos, Tuberculose Crônica, Meningite Infeciosa, Leucose Bovina Infeciosa, Reticuloperitonite Traumática e Ceratoconjuntivite Infeciosa, realizou-se um ensaio com o objetivo de mensurar o referido marcador inflamatório e verificar os valores normais no sangue de fêmeas sadias da raça nelore criadas no Norte do Paraná. Avaliou-se 20 bezerras, 19 novilhas e 20 vacas. A média do ácido siálico em cada grupo foi respectivamente $0,740 \pm 0,311$ g/L, $0,611 \pm 0,225$ g/L e $0,591 \pm 0,236$ g/L. Os valores de ácido siálico encontrados em bezerras nelore saudáveis foram próximos aos descritos na literatura mundial. Porém nas vacas e nas novilhas sadias obtiveram-se menores médias, sugerindo que nos nelores adultos sadios os níveis do ácido siálico são inferiores, quando comparados a outras raças européias leiteiras.

Palavras-chave: ácido siálico, nelore, vaca, novilha, bezerra.

² Mestrando do Curso de Ciência animal da Universidade Estadual de Londrina. Email: coelhoecarvalho@hotmail.com

ABSTRACT

Determination of Values of the Sialic Acid in the Blood Of Healthy Females of Nelore Breed Raised in North Paraná

The tumoral and inflammatory markers are substances found in the blood, urine or tissues of people and/or animals with certain types of neoplastics or chronic inflammations. They are produced by the tumoral cells, inflammatory process or to the presence of the cancer itself. The use of biochemical markers as the sialic acid in the diagnosis and the postoperative control of neoplastics in the human specie has already been used as a routine for years. However, this diagnostic technology is barely used in Veterinary clinical practice for cattle. Sialic acid (sugars from nine carbons) has not only been involved to basic biochemical processes, energy storing or structural component (chitin and cellulose), but also involved on cell adhesion factors, mediators in intercellular communication, cellular renewers among others. In an assay in the 80's, researchers demonstrated a positive correlation between excessive mucoprotein production in tumoral bladder of animals and sialic acid. Others highlighted the interrelation between sialic acid and the neutrophil increase due to ordinary inflammatory diseases in bovines. It was also proven a positive correlation between the total sialic acid and ethmoidal carcinoma in bovines. Due to its relevance on diseases as: Bovine Enzootic Hematuriae, Chronic Tuberculosis, Infectious meningitis, Infectious Bovine leucosis, Traumatic Peritonitis and Infectious Keratoconjunctivitis, an assay was carried out to standardize and determine the normal values of sialic acid concentrations in blood of clinically health Nelore females (20 calves, 19 heifers and 20 cows) raised in north Paraná. The average blood sialic acid concentrations of each group were respectively $0,740 \pm 0,311$ g/L; $0,611 \pm 0,225$ g/L and $0,591 \pm 0,236$ g/L. The values of sialic acid found in healthy Nelore heifers were close to described ones in the world literature. However in the cows and in the heifers medium minors were obtained, suggesting that in the healthy adult nelores the levels of the sialic acid are mean, when compared to other *Bos taurus* breeds.

keywords: sialic acid, nelore, cow, calves, heifers.

Introdução

Marcadores tumorais e/ou inflamatórios são substâncias encontradas no sangue, urina ou tecidos dos animais com certo tipo de neoplasias. A maioria dos marcadores tumorais são proteínas ou fragmentos de proteínas. Eles são produzidos pelo próprio tumor ou pelo organismo como resposta à inflamação ou presença do câncer (MILLER et al., 1978).

A utilização de biomarcadores no diagnóstico e no controle pós-operatório de neoplasias na espécie humana, já vem sendo utilizada de forma rotineira há anos. Tem-se verificado também, um aumento crescente de publicações dessa linha de pesquisa na medicina veterinária de animais de companhia, porém, esta tecnologia de diagnóstico ainda está pouco difundida para animais de produção.

Dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana destacam-se os ácidos siálicos, uma família de carboidratos complexos de nove carbonos, normalmente ligados a outros carboidratos por meio de ligações cetosídicas (KATOPODIS et al., 1982). Localizados nas posições terminais de glicoconjugados da superfície celular, os ácidos siálicos estão intimamente envolvidos 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). Exemplos do envolvimento dos ácidos siálicos em processos biológicos incluem-se 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).

Tram et al. (1997) comprovaram que as maiores concentrações de ácido siálico estão especialmente no cérebro humano e que a presença deste ácido na alimentação tem sido associada a um aumento de aprendizagem em neonatos. Neste estudo os pesquisadores observaram que os níveis de ácido siálico na saliva de 18 crianças amamentadas foram quase duas vezes mais elevados do que em 15 crianças alimentadas de outra forma sem ser láctea. Tram et al. (1997) concluíram

que a concentração mais alta de ácido siálico no leite materno é a responsável pela maior concentração nos fluídos e tecidos corpóreos das crianças amamentadas.

Trabalho conduzido por Singh et al. (1980) demonstrou a possibilidade de alta correlação entre a produção excessiva de mucoproteína nos animais com tumor de bexiga e o ácido siálico. Makimura e 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 a elevada significância ($P < 0,01$) entre o ácido siálico total como também ligado a lipídios com o carcinoma etmoidal em bovinos, provando que o ácido siálico é uma substância importante no processo inflamatório e no desenvolvimento tumoral.

Ensaio conduzido por Cutil et al. (2004) e Gunes et al. (2004) comprovaram, respectivamente a evolução sérica do ácido siálico como um marcador inflamatório em bovinos com reticuloperitonite traumática e os níveis do mesmo com lesões oculares em bezerros com ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

Outro exemplo da presença do ácido siálico no processo inflamatório é o fato de que no local da inflamação, a proteína selectina P, presente na superfície das células endoteliais, interage com um resíduo de ácido siálico específico das glicoproteínas dos leucócitos circulantes na corrente sanguínea. Esta interação diminui a velocidade de difusão dos leucócitos, devido à adesão e à rolagem destes ao longo do revestimento endotelial dos capilares, possibilitando dessa forma a migração dos leucócitos até o local da inflamação para iniciar uma resposta imune (SLEE et al., 2001).

Por essas e outras interações envolvendo o ácido siálico, hoje o aperfeiçoamento de técnicas de mensuração rápida desse açúcar ganha campo na medicina humana e avança como adjuvante na medicina veterinária.

Mensurar e adaptar a técnica de extração do ácido siálico dos soros sanguíneos dos bovinos criados no estado do Paraná é um passo importante na busca do diagnóstico precoce tanto da hematúria enzoótica dos bovinos (HEB), como também de outras moléstias neoplásicas ou inflamatórias que acometem essa e outras espécies de animais.

Materiais e Métodos

Como suporte para a pesquisa de verificação do nível de ácido siálico no soro sanguíneo de bovinos sadios, procedeu-se um ensaio laboratorial da técnica para determinar o valor normal desse açúcar. Os animais selecionados foram fêmeas da raça nelore, criadas a pasto na Fazenda Figueira, uma estação experimental da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) localizada no município de Londrina estado do Paraná com altitude de 585 metros, Latitude de 23°19'11"S Longitude de 51°09'12"W (GUIA RODOVIÁRIO QUATRO RODAS, 2007).

A área total da propriedade é de 3686 hectares, sendo 2070 hectares de pastagem. A pastagem predominante é *Panicum maximum* cv Colônia, porém foram formadas novas áreas com *Panicum maximum* cv Tanzânia e *Panicum maximum* cv Mombaça, além de *Brachiaria brizantha* cv Marandu. Existem ainda 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 fêmeas nas três fases distintas do desenvolvimento da raça, para isso coletou-se sangue de 20 bezerras (5 a 7 meses de idade); 19 novilhas (15 a 24 meses de idade) e 20 vacas (com mais que 36 meses de idade), todos os animais passaram por anamnese clínica e apresentavam ausência de febre, baixíssima carga ectoparasitária, hidratados, com movimentos ruminais e fezes normais, além de peso e tamanho adequados a sua idade.

O sangue para pesquisa do ácido siálico foi coletado da veia coccígena, por meio de agulhas descartáveis e tubos Vacuntainer® (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Os tubos possuíam gel separador de soro e no laboratório foram centrifugados a 3000 rpm, por cinco minutos para obtenção completa do soro.

O armazenamento do soro foi feito em tubos ependorfs, que foram alocados em freezer com temperatura próxima a -20°C até a análise.

A análise laboratorial do ácido siálico foi realizada através do método do tiobarbitúrico, descrito por Warren (1951).

A leitura para a quantificação do ácido siálico foi feita pelo método de espectrofotometria, e para isso foi utilizado o equipamento Espectronic Hélios α Computadorizado Duplo Feixe Termoestatizado, pertencente ao Hospital Universitário 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, determinou-se também, o intervalo de confiança, utilizando-se para as análises o programa SAEG (1998).

Discussão e Resultado

As médias, desvios-padrão e intervalos de confiança obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias e desvios padrões e intervalo de confiança do ácido siálico (g/L) em vacas, novilhas e bezerras da raça nelore clinicamente saudáveis

CATEGORIA ANIMAL	ÁCIDO SIÁLICO	INTERVALO DE CONFIANÇA A 95%
Vacas	$0,591 \pm 0,236$	0,485 - 0,696
Novilhas	$0,611 \pm 0,225$	0,510 - 0,712
Bezerras	$0,740 \pm 0,311$	0,602 - 0,880
Média geral	$0,648 \pm 0,265$	0,579 - 0,717
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	40,22%	

(P= 15.40%)

Os resultados encontrados na presente pesquisa demonstraram que o ácido siálico apresenta-se em maior quantidade no soro dos bovinos jovens quando comparado aos adultos. Conforme é observado, as bezerras apresentam concentração média de ácido siálico de $0,740 \pm 0,311$ g/L, um pouco superior a média do ácido siálico do soro das vacas que é de $0,591 \pm 0,236$ g/L. Quando observamos os valores do ácido siálico das novilhas (categoria animal púbere) encontramos a média de $0,611 \pm 0,225$ g/L, e a média geral das três categorias

0,648 ± 0,265 g/L. Apesar dessa diferença não ser significativa, atribui-se a ela os fatores nutricional leite e crescimento. O leite, por ser um alimento rico em ácido siálico, e ao fator crescimento, pelo fato do ácido siálico exercer papel importante no desenvolvimento cerebral conforme demonstram pesquisas realizadas por Tram et al., (1997).

Quando comparamos os valores encontrados em cada categoria da presente pesquisa com os valores descritos na literatura mundial, verificamos que as 20 bezerras apresentam valor médio de ácido siálico de 0,740 g/L, muito próximo ao valor encontrado no estudo realizado por Gunes et al., (2004) que verificaram, em 12 bezerras sadias da raça Pardo Suíço, o valor médio de ácido siálico total de 0,763 g/L.

Nas novilhas da raça nelore o valor médio mensurado do ácido siálico foi 0,611 g/L. Muito embora, na literatura pesquisada, não se encontrou nenhum valor de referencia para efeito de comparação, entretanto, pelos critérios desenvolvidos no presente ensaio, nossos resultados podem se caracterizar como valores normais para essa categoria, servindo inclusive de base para outros ensaios que por ventura possam surgir.

Nas vacas nelores clinicamente sadias obteve-se o valor médio de 0,591 g/L de ácido siálico. Este valor foi inferior ao encontrado em dois artigos publicados por Cital et al. (2004) e Singh et al. (1980), que utilizaram como base de pesquisa animais clinicamente saudáveis, mas de raças leiteiras, sendo os valores respectivamente de 0,76 e 0,73 g/L de ácido siálico.

Esse resultado abre margem para novas discussões e hipóteses para explicar a possível diferença da concentração sérica do ácido siálico entre animais da raça nelore, com aptidão para carne e animais *bos taurus* de aptidão leiteira. Questionamentos surgem quanto às diferenças nutricionais existentes entre os grupos de animais. Hipóteses também são levantadas quanto às possíveis variações experimentais, existentes entre os trabalhos na mensuração do ácido siálico, por exemplo, os equipamentos ou reagentes utilizados. Porém a influencia genética pode ser determinante, pela rusticidade e aptidão de produção de carne do nelore. Qualquer que seja o motivo tal diferença merece ser desvendada com novas pesquisas, caso o ácido siálico venha mesmo mostrar-se eficiente no cumprimento do propósito de marcador tumoral e/ou inflamatório.

Esta perspectiva adquire maior margem para discussão quando observamos o resultado descrito no experimento de Manohar et al. (1993), que encontrou o valor de 0,60 g/L de ácido siálico total no sangue de vacas zebuínas, também clinicamente saudáveis criadas na Índia. Este valor é muito próximo ao encontrado na presente pesquisa 0,591 g/L.

Para futuros esclarecimentos outras pesquisas poderão ser conduzidas, mas a princípio o nelore adulto contém menores níveis de ácido siálico na corrente sanguínea que outras raças, principalmente leiteiras, conforme base comparativa descritas na literatura mundial.

Conclusão

As vacas adultas da raça nelore apresentaram valores de ácido siálico inferior aos das bezerras, apesar da diferença não ser significativa.

O valor médio 0,648 g/L, obtidos neste estudo poderá ser utilizado como referência para futuros trabalhos envolvendo o ácido siálico em bovinos da raça nelore criados a pasto.

REFERÊNCIAS

- CITIL, M.; GUNES, V.; KARAPEHLIVAN, M.; ATALAN, G.; MARASLI, S. Evaluation of serum sialic acid as an inflammation marker in cattle with traumatic reticulo peritonitis. **Rev. Med. Vet.**, Toulouse, v. 155, n. 7, p. 389-392, 2004.
- GUIA rodoviário quatro rodas. Disponível em: <<http://www.guia4rodasrodoviariopro.com.br/oque.asp>>. Acesso em: maio 2007.
- 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. **Rev. Med. Vet.**, Toulouse, v. 155, n. 10, p. 508-511, 2004.
- KATOPODIS, N.; HIRSHAUT, Y.; GELLER, N. L.; STOCK, C. C. Lipid-associated sialic acid test for detection of human cancer. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 42, n. 12, p. 5270-5275, 1982
- MAKIMURA, S.; USUI, M. Correlation between haptoglobin and sialic acid or mucoprotein in diseased bovine serum. **Jpn. J. Vet. Sci.**, 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 Vet. J.**, Madras, v. 70, n.1, p. 14-16, 1993.
- MILLER, C. A.; WANG, P.; FLASHNER, M. Mechanism of *arthrobacter sialophilus* neuraminidase: the binding of substrates and transition-state analogs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Netherlands, v. 83, n. 4, p. 1479-1487, 1978.
- SEARS, P.; WONG, C. H.; Carbohydrate mimetics: A new strategy for tackling the problem of carbohydrate-mediated biological recognition. **Angew. Chem. Int. Ed.**, Weinheim, v.38, n.16, p.2301-2324, 1999.
- SINGH, A.K; JOSHI, H.C; RAY, S.N. Serum mucoprotein and sialic acid in enzootic bovine haematuria. **Zentbl. Vet. Med. Reih. A**, Berlin, v.27, n.8, p.678-681, 1980.
- SLEE, D. H.; ROMANO, S.J.; YU, J.; NGUYEN, T.N.; JOHN, J.K.; RAHYA, N.K.; AXE, F.U.; JONES, T.K.; RIPKA, W.C. Development of potent non-carbohydrate imidazole-base small molecule selectin inhibitors with antiinflammatory activity. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 44, n. 13, p. 2094 -2107, 2001.
- TRAM, T. H.; BRAND MILLER, J. C.; McNEIL, Y.; McVEAGH, P. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants. **Arch. Dis. Childhood**, London, v.77, v.4, p.315-8, 1997.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG**: Sistema de Análise Estatística e Genética, versão 8.1. Viçosa, 1998.
- WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. **J. Biol. Chem.**, 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. **Curr. Drug Targets**, Oak Park, v. 4, p. 389, 2003.

RESUMO

Avaliação Bioquímica do Ácido Siálico como Biomarcador Tumoral em Novilhas Criadas em Propriedade Endêmica para Hematúria Enzoótica dos Bovinos

Marcos Coelho de Carvalho³

A *Pteridium aquilinum* (samambaia) é um dos vegetais tóxicos mais preocupantes em vários países do mundo. No estado do Paraná é uma das plantas tóxicas que causam grandes prejuízos à pecuária, ocorrendo em 105 dos 399 municípios existentes. Por essa razão, a ciência busca através das instituições de pesquisa, encontrar meios para o controle epidemiológico da intoxicação pela samambaia, visando diagnosticar precocemente a forma clínica da hematúria enzoótica dos bovinos. Estudos realizados demonstraram a alta correlação entre a produção excessiva de mucoproteína pelos bovinos com hematúria enzoótica e o ácido siálico, comprovando que este ácido atua como biomarcador tumoral associado ao processo inflamatório e ao desenvolvimento do carcinoma de bexiga. Baseado nessas informações, coletou-se sangue e confrontou-se o nível do ácido siálico sérico de 19 novilhas da raça nelore clinicamente saudáveis, criadas em propriedade isenta de samambaia e sem registro de caso clínico de hematúria enzoótica dos bovinos, contra 29 novilhas nelore nascidas e criadas em propriedade endêmica para hematúria enzoótica dos bovinos, devido a elevada infestação de samambaia nas pastagens. Na data da coleta, constatou-se que 2 das 29 novilhas apresentavam o sinal clínico clássico da enfermidade, pois apresentavam sangue na urina. A média do ácido siálico sérico do grupo controle foi igual a $0,611 \pm 0,225$ g/L, muito próximo à média do grupo avaliado igual a $0,615 \pm 0,258$ g/L. O resultado obtido na presente pesquisa demonstrou que as diferenças entre as médias dos grupos não foram significativas. Portanto, o ácido siálico não se demonstrou efetivo como biomarcador, quando testado em novilhas que estão sofrendo intoxicação pela ingestão contínua de samambaia, animais com predisposição ao desenvolvimento de tumor de bexiga.

Palavras-chave: *Pteridium aquilinum*, ácido siálico, biomarcadores, bovinos.

³ Mestrando do curso de Ciência animal da Universidade Estadual de Londrina. Email: coelhoecarvalho@hotmail.com

ABSTRACT

Biochemical Evaluation of the Sialic Acid as a Tumoral Marker in Heifers Raised in Endemic Property for Enzootic Hematuria of the Bovines

Pteridium aquilinum is one of the most concerning toxic vegetables in many countries in the world. In Parana state it is one of the toxic plants that cause great damages to the cattle raising, occurring in 105 of the 399 existing cities. Therefore, the science aims, try to find ways for the epidemiological control of the bovines intoxication. Thus being, look for ways to anticipate the diagnosis, mainly the clinical Enzootic Hematuriae form of the Bovines. Researches demonstrated the high correlation between the excessive production of mucoprotein by animals with Bovine Enzootic Hematuria and the sialic acid, proving that this acid act like a biochemical marker associated to the inflammatory process and bladder tumor development. Based in this informations, was collected blood and compare the serum sialic acid of 19 heifers of the race nelore was confronted clinically healthy, against 29 heifers also of the race nelore that was born and reared in endemic property for bovine enzootic haematuriae, due to a high infestation of braken fern in pasture. In the collection date, it was verified that 2 heifers of the 29 heifers presented the classic clinical sign of the illness, because they were urinating blood. The average of the serum sialic acid of the control group was equal to $0,611 \pm 0,225$ g/L, very close the average of the equal group to $0,615 \pm 0,258$ g/L. The result obtained in the present research demonstrates that were not significant the differences among the averages of the groups. Therefore, the sialic acid was not demonstrated effective as biochemical marker, when tested in heifers that are suffering continuous intoxication for the fern ingestion, animals that can development a bladder tumor.

Keywords: *Pteridium aquilinum*, sialic acid, biochemical marker, bovine.

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 causam grandes prejuízos à pecuária bovina, ocorrendo em 105 municípios (POLACK, 1990), 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 (OLIVEIRA et al., 1998).

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 Arapoti, que o problema de intoxicação pela planta era mais freqüente nos animais de primeira cria ou em vacas na faixa etária de 4 a 5 anos. Os bovinos apresentavam urina com coloração avermelhada, emagrecimento progressivo e prostração, com quadro clínico irreversível, culminando com possíveis óbitos.

Por essa razão, 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 a topografia íngreme e muitos pecuaristas utilizam essas áreas com pastagem para cria e recria de bovinos. Assim sendo, as instituições de pesquisa buscam meios para o diagnóstico precoce, sobretudo da Hematúria Enzoótica dos Bovinos (HEB) e os biomarcadores podem ser um importante instrumento de diagnóstico nesse processo.

A utilização de biomarcadores no diagnóstico e no controle pós-operatório de neoplasias na espécie humana, já vem sendo utilizada de forma rotineira há anos. Tem-se verificado também, um aumento crescente de publicações dessa linha de pesquisa na medicina veterinária de animais de companhia, e atualmente este método de diagnóstico tumoral vem se difundindo na bovinocultura, pela viabilidade econômica dos exames.

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).

Em 1951 Gottschalk 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, tem 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. Uma 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 este pode ser considerado um biomarcador para bovinos no processo neoplásico no tumor de bexiga.

Makimura e 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 conduzidos por Cutil et al. (2004) e Gunes et al. (2004) comprovaram, respectivamente, a evolução sérica do ácido siálico como um marcador inflamatório em bovinos com reticuloperitonite traumática e o nível do mesmo com lesões oculares em bezerras com ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

Determinar às concentrações séricas do ácido siálico em novilhas sujeitas a intoxicação pela samambaia e compará-las com os níveis normais de ácido siálico em novilhas sadias, é a fase inicial de uma pesquisa com biomarcadores, que no futuro pode gerar rapidez e efetividade ao 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, avaliou-se dois grupos distintos de fêmeas da raça Nelore. O grupo 1 (controle) composto de 19 novilhas clinicamente sadias. 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 desafiadas.

A fazenda do grupo 2 (experimental) localiza-se no município de São Jerônimo da Serra – Paraná, com altitude de 976 metros, Latitude de 23°43'06" S Longitude de 50°43'48" W (Guia Rodoviário Quatro Rodas, 2007). Esta região registra durante décadas elevadas prevalências de casos clínicos de HEB, segundo relato dos funcionários da fazenda pesquisada, anualmente surgem na propriedade cerca de 30 a 40 novos casos de HEB, 2 a 3 casos de carcinoma epidermóide do trato digestivo superior (CETDS), e nunca registrou-se caso de diátese hemorrágica. Na data de realização do experimento o rebanho total era de 608 animais com 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, a fazenda Figueira a 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 585 metros, Latitude de 23°19'11"S Longitude de 51°09'12"W (GUIA RODOVIÁRIO QUATRO RODAS, 2007).

A área total da propriedade é de 3686 hectares, sendo 2070 hectares de pastagem. A pastagem predominante é *Panicum maximum* cultivar Colômbio, 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, baixíssima carga ectoparasitária, hidratados, com movimentos ruminais e fezes normais, além de peso e tamanho adequados a sua idade.

O sangue para pesquisa do ácido siálico foi coletado da veia coccígena, por meio de agulhas descartáveis e tubos Vacuntainer® (Becton Dickinson, New Jersey, USA) com gel separador, em alguns houve a necessidade de centrifugar a 3000 rpm por cinco minutos para obtenção do soro. Armazenou-se os soros em tubos ependorfs, que foram alocados em freezer com temperatura inferior a -30°C , onde permaneceu até a data em que mensurou-se 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 α Computadorizado Duplo Feixe Termoestatizado pertencente ao Hospital Universitário em Londrina-PR.

Análise Estatística

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).

Discussão e Resultado

Tabela 1 – Valores das médias e desvios padrões 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, da raça nelore.

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

NS = Não significativo

A representação do ácido siálico como biomarcador inflamatório e tumoral é inquestionável de acordo com os trabalhos conduzidos por Gunes et al. (2004), Cital et al. (2004), Manohar et al. (1993), Makimura e Usui (1990). Porém 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 e nem registro clínico da enfermidade HEB, foi de 0,611 ± 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 ± 0,258 g/L. Cabe ressaltar que duas das vinte e nove 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.

Ensaio e pesquisas que propiciam a antecipação diagnóstica de enfermidades em animais de produção, sobretudo nos bovinos, é sempre desafiador e necessário, bem como confrontar um grupo de animais sadios contra outro 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 biomarcadores tumorais e/ou inflamatórios. A mensuração deste ácido

teve início na década de 80, como ferramenta de patologia clínica, através de pesquisa conduzida por Singh et al (1980). Nesta ocasião estes pesquisadores verificaram em 4 animais saudáveis e 7 hematúricos, o nível da mucoproteína e do ácido siálico com o objetivo de comparar valores entre animais saudáveis e hematúricos. 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 destes animais, respectivamente, isto pode ser reflexo da reação tecidual e da presença de neoplasias.

Nota-se pela literatura compulsada 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, que já não representa fator limitante no atual século. À medida em 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.

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 perspective. **Chem. Rev.**, 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. **Rev. Med. Vet.**, 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.
- GUIA rodoviário quatro rodas. Disponível em: <<http://www.guia4rodasrodoviariopro.com.br/oque.asp>>. Acesso em: maio 2007.
- 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. **Rev. Med. Vet.**, 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. **Jpn. J. Vet. Sci.**, 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 Vet. J.**, Madras, v. 70, n. 1, p. 14-16, 1993.
- 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)
- POLACK, E. W. **Toxicidade da *Pteridium aquilinum* no Estado do Paraná**. 1990. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1990.
- SINGH, A.K; JOSHI, H.C; RAY, S.N. Serum mucoprotein and silical acid in enzootic bovine haematuria. **Zentbl. Vet. Med. Reih. A**, 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. **J. Biol. Chem.**, 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. **Curr. Drug Targets** Oak Park, v. 4, p. 389, 2003.

4 CONCLUSÃO

As vacas e novilhas da raça nelore apresentaram valores de ácido siálico inferiores aos das bezerras, apesar da diferença não ser significativa.

O valor médio 0,648 g/L, obtidos neste estudo poderá ser utilizado como referência para futuros trabalhos envolvendo o ácido siálico em bovinos da raça nelore criados a pasto.

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, duas inclusive com o sinal clínico da enfermidade.

5 APÊNDICES

APÊNDICE: Protocolo da Técnica

Análise laboratorial do ácido siálico pelo método do tiobarbitúrico

1 - Reagentes

- Padrão do ácido N-acetilmurâmico.
- Metaperiodato de sódio (0,2M) em ácido fosfórico 9M;
- Arsenito de sódio 10% em uma solução de sulfato de sódio a 0,5M e 0,1 N de sulfato de amônia NH_2SO_4 (volumes iguais);
- Ácido Thiobarbitúrico 0,6% em sulfato de sódio 0,5M;

2 - Metodologia para quantificação do Ácido Siálico:

- Para a realização das análises dos soros dos animais, inicialmente obteve-se o padrão colorimétrico, que seria equivalente ao valor da cor esperada para o material analisado. Para isso teve-se que fazer uma curva de três pontos (mínimo, médio e máximo) que ficou determinado entre 0,100 e 0,800 UI.
- Para a obtenção da curva diluiu-se o padrão (0,05 g %) ou seja 50 mg/100 ml
- Para fidelizar os resultados, pegou-se o soro dos animais e colocou-se em banho Maria por 15 minutos para o descongelamento, em seguida centrifugou-se o soro a 10.000 RPM por cinco minutos, para evitar os efeitos de uma possível hemólise.
- Em uma amostra contendo acima de 0,05 nmol e ácido N-acetilmurâmico em um volume de 0,2 ml, foi adicionado 0,1 ml de solução de Metaperiodato;
- Os tubos foram agitados e deixados a temperatura ambiente por 20 minutos;
- Acrescentou-se aos mesmos, 1 ml de solução de arsenito, agitando os tubos até que a cor amarelo-marrom desapareça (nem sempre isso ocorreu);

- Acrescentou-se 3 ml de solução de ácido Thiobarbitúrico, os tubos foram agitados e colocados em banho de água fervente por 15 minutos;
- Deixados para esfriar em banho de água fria por 5 minutos;
- Durante o resfriamento, a cor vermelha pode enfraquecer e a solução freqüentemente torna-se “enevoada”. Isso não afeta a leitura final;
- Desta solução, 3 ml foram transferidos a outro tubo que contém 3 ml de ciclohexanona. Os tubos foram agitados no agitador por mais ou menos 20 segundos (para extração) e centrifugados por 3 minutos em uma centrífuga clínica.
- Retirou-se a fase orgânica (vermelho) e lê-se em 549 nm

Uso padrão de ácido siálico:

Fator = [] de ácido siálico

D.O. 549 nm

N moles de ac. N-acetil murâmico = fator X D.O. 549 nm

- Para evitar a interferência, por exemplo, dos lipídios insaturados, fez-se a leitura em 532 nm e em 549 nm.

N moles de ácido N-acetil murâmico é igual:

= fator 549 nm X D.O. 549 nm - fator 532 nm X D.O. 532 nm

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)