



CENTRO UNIVERSITÁRIO FRANCISCANO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
Curso de Mestrado em Nanociências

DANIELI FERRARI DA ROSA

**ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÁCIDO SIÁLICO EM MODELO TUMORAL E
VIRAL**

Santa Maria, RS

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DANIELI FERRARI DA ROSA

**ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÁCIDO SIÁLICO EM
MODELO TUMORAL E VIRAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Nanociências, área de Ciências Tecnológicas, do Centro Universitário Franciscano – Unifra, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. SOLANGE CRISTINA DA SILVA MARTINS HOELZEL**

Co-orientador: **Prof. Dr. LUIZ CARLOS RODRIGUES JÚNIOR**

Santa Maria, RS

2010

R788e Rosa, Danieli Ferrarri da

Estudo dos níveis séricos de ácido siálico em modelo tumoral e viral / Danieli Ferrarri da Rosa ; orientadora Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel ; co-orientador Luiz Carlos Rodrigues Júnior – Santa Maria : Centro Universitário Franciscano, 2010.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, 2010

1. Ácido siálico. 2. Melanoma. 3. *Herpes Simplex virus 1* (HSV-1) 4. Glicoconjugados I. Hoelzel, Solange Cristina da Silva Martins. II. Rodrigues Júnior, Luiz Carlos III. Título.

CDU 616-006.81

Elaborada pela Bibliotecária Eunice de Olivera CRB10/1491

ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS

Mestrado em Nanociências

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO-ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO:

ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÁCIDO SIÁLICO EM MODELO
TUMORAL E VIRAL

Elaborada por:

DANIELI FERRARI DA ROSA

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel - UNIFRA

Presidente



Prof^ª. Dr^ª. Ivana Beatrice Mânica da Cruz - UFSM



Prof. Dr. Sergio Roberto Mortari - UNIFRA

Santa Maria, 26 de maio de 2010.



Biblioteca
Termo de autorização

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Acadêmico em Nanociências.
Título da Dissertação: ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÁCIDO SIÁLICO EM
MODELO TUMORAL E VIRAL
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. SOLANGE CRISTINA DA SILVA MARTINS HOELZEL

Eu, DANIELI FERRARI DA ROSA, R. G. n^o 1086853205, autor da Dissertação acima citada, autorizo ao Centro Universitário Franciscano – UNIFRA - a disponibilizar, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, o documento, em meio eletrônico, na Rede Mundial de Computadores (Internet) para fins de leitura e/ou impressão e para divulgação da produção científica gerada na Instituição, a partir desta data.


Assinatura do Autor


Assinatura do Orientador

Santa Maria, RS
Local

18/06/2010.
Data

*Aos meus pais, pelo amor e carinho e por nunca terem
medido esforços para me proporcionar uma boa educação.*

*Ao meu irmão, minha avó e meu avô (in memoriam),
por todo amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo amparo nos momentos difíceis, por mostrar o caminho certo nas horas incertas, pela força de seguir em frente e, por mais esta conquista.

Aos meus pais, Olmiro e Vera, por todo amor e carinho, por serem a base de tudo e por todo apoio emocional e financeiro, pois muitas vezes abriram mão de seus sonhos para que eu realizasse os meus.

Ao meu avô, Ramiro (in memorian), que mesmo ausente sempre se fez presente em meus pensamentos, nas lembranças, deixando além da imensa saudade muitos ensinamentos.

À minha avó, Edith, por todo carinho e preocupação.

Ao meu irmão, Olmiro Junior, pelo carinho, pelo abraço de ternura.

Ao meu namorado, Renan, por todo amor, por entender a mudança de humor repentina, por suportar os momentos difíceis, por me acalmar. Agradeço pela compreensão e por estar sempre ao meu lado. Te amo!

À minha orientadora, Prof.^a Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel, pelos ensinamentos, por todo apoio, incentivo e ajuda durante a realização deste trabalho deixo aqui o meu reconhecimento.

Ao meu co-orientador, Prof. Luiz Rodrigues, pelos ensinamentos, ajuda e apoio durante a realização do trabalho.

À Isabel, responsável pelo laboratório de Nanotecnologia, pela amizade, por toda a ajuda, pela preocupação, por muitas vezes deixar de fazer as coisas dela para ajudar não só a mim, mas todos dentro e fora do laboratório. Isa, tu é um anjo!

À Gabriela Moraes, pela pergunta: "Amiga, como tu tá? Precisa de alguma coisa? Se precisar é só me falar que eu te ajudo!" Não tenho palavras Gabizinha, obrigada por tua amizade, por toda a ajuda do início ao fim deste trabalho e pelo conforto nas horas difíceis. São incontáveis os desabafos, os chororôs, e claro, as gargalhadas também, né amiga?!

À Alexandra, pela amizade e por toda a ajuda prestada, mesmo sempre cheia de coisas e na correria entre Erechim e Santa Maria ela sempre arrumava um tempo para ajudar e bater um papo. Amiga, obrigada de coração por tudo. Vencemos mais essa!

À Carine, que trabalhou comigo no laboratório de Cultura Celular, pela amizade e ajuda, pela torcida, pois foi difícil e árduo o trabalho com as células. Cari, obrigada por tudo!

À Thaís e ao Rodrigo, que assumiram o meu lugar e o da Carine na Cultura de Células, por todo o empenho, dedicação em aprender algo novo em pouco tempo e ainda nas férias.

À Leonara, que durante um tempo trabalhou junto na cultura de células e com os animais no Biotério. Obrigada pela ajuda e amizade de longa data.

À Nara, pela amizade e na condição de médica patologista do laboratório de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria pelo grande auxílio na parte histológica deste trabalho. Muito obrigada por tudo.

Às meninas do laboratório, o trio da farmácia que trabalha com as nanocápsulas, Gabriela Farias, Jerusa e Márcia, pela amizade, pela convivência no laboratório, pelas conversas de descontração e desabafo. E aí gurias, já assinaram o ponto?

À Danizinha, que assim como eu passou por momentos bem difíceis. Obrigada por tua amizade, por tuas palavras de conforto e pelo abraço aconchegante.

À Adrienne, pela amizade, pelas risadas, pelas conversas de desabafo que descontraíam nos momentos de tensão.

Ao Luís Ricardo que me ajudou muito com os camundongos, pela amizade e pelas conversas no laboratório.

Às meninas da limpeza, a Rosane e a Denise, que sempre chegavam de bom humor no laboratório, alegrando o trabalho de todos.

Ao Sérgio da recepção, que todos os dias me recebia com um “bom dia”, com um sorriso alegre, e que sempre me deu incentivo nas horas difíceis.

À Lidiane, ex-secretária, a Ana Paula e a Franciele secretárias do mestrado, pelo carinho e pela ajuda durante todo esse tempo.

À professora Ivana Zanella, coordenadora do Mestrado, e a professora Solange Fagan durante o tempo em que foi coordenadora do mestrado, aos professores do programa de Pós Graduação da UNIFRA - Mestrado de Nanociências.

À UNIFRA e a CAPES pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

E a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho deixo aqui o meu agradecimento.

*Existe somente uma idade para a gente ser feliz,
somente uma época na vida de cada pessoa
em que é possível sonhar e fazer planos
e ter energia bastante para realizá-las
a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.
Essa idade tão fugaz na vida da gente
chama-se PRESENTE
e tem a duração do instante que passa.*

Autor Desconhecido

RESUMO

Estudo dos Níveis Séricos de Ácido Siálico em Modelo Tumoral e Viral

O ácido siálico é o nome genérico dado a família de monossacarídeos carboxilados com nove átomos de carbono que aparece na porção terminal de glicoconjugados. Estas moléculas estão envolvidas em vários processos biológicos, tais como, processos de reconhecimento celular, adesão plaquetária, migração, invasão, potencial metastático, sendo também um receptor para bactérias e vírus. O aumento das concentrações séricas de ácido siálico total tem sido descrito em vários grupos de pacientes que sofrem de tumores cerebrais, leucemia, melanoma, carcinoma e outros tipos de cânceres. A clivagem do ácido siálico é um passo crucial para a infecção do vírus Influenza, uma vez que este ácido é parte do receptor celular usado pelo vírus durante o processo de internalização celular. A neuraminidase, enzima produzida pelo vírus, cliva a ligação entre o ácido siálico e as glicoproteínas virais, permitindo a entrada dos vírus nas células. O objetivo desse estudo foi analisar os níveis séricos de ácido siálico em modelo de melanoma murino e modelo de infecção herpética (HSV-1). No modelo tumoral foram utilizados camundongos C57BL/6 e no modelo viral camundongos BALB/c. Os camundongos receberam 2×10^5 células B16F10 através da administração subcutânea na coxa e a progressão do tumor foi acompanhada todos os dias até o tumor se tornar visível. A infecção com HSV-1 foi realizada através da administração intraperitoneal de 10^2 PFU de vírus. O ácido siálico das amostras de soro foram quantificadas pelo método tiobarbitúrico em espectrofotômetro à 549 nm. Uma curva padrão com ácido siálico comercial foi usada como parâmetro para a quantificação. Os resultados mostraram que as concentrações de ácido siálico no modelo tumoral foram aumentadas nos animais com tumor quando comparadas ao grupo controle e houve diferença significativa ($p < 0,05$) no primeiro dia após a administração das células. Para o modelo de infecção viral houve diferença significativa ($p < 0,05$) no primeiro dia após a infecção quando comparado o grupo infectado com o controle. Na análise histológica da coxa dos camundongos realizada após 24 horas da administração de células B16F10 foram encontrados grupos compactos de melanócitos arredondados ou poligonais, com citoplasma amplo e claro, cromatina irregular, núcleos hipercromáticos e vacuolizados, nucléolos eosinofílicos e mitoses atípicas.

Palavras-chave: Ácido siálico, melanoma, *Herpes Simplex virus 1* (HSV-1), glicoconjugados.

ABSTRACT

Study of serum levels of Sialic Acid in Tumor and Viral Model

The sialic acid is the generic name of carboxylated monosaccharides family with nine carbon glycoconjugated at terminal portion. These molecule family are involved in several biological processes such cell recognition processes, platelet adhesion, migration, invasion and metastatic potential, it also work as a receptor for bacteria and viruses. High concentrations of total sialic acid in the blood have been reported in different groups of patients with brain tumors, leukemia, melanoma, carcinoma and other kinds of cancers. The cleavage of sialic acid is a crucial step in virus infection influenzae, since this acid is part of the cellular receptor that the virus uses during the process of cellular internalization. The neuraminidase, an enzyme produced by the virus, cleaves the bond between sialic acid and the viral glycoproteins, allowing the entry of viruses into cells. The aim of this study was the analysis of serum sialic acid levels in murine melanoma and Herpes Simplex virus-1 (HSV-1) infection model. In the tumor model were used C57BL/6 and in the viral model BALB/c mice. Mice were injected with 2×10^5 B16F10 cells subcutaneously in the thigh and the tumor progression was followed each day till it became visible. The HSV-1 infection was conducted by intraperitoneally injection of with 10^2 PFU of virus. The sialic acid in serum samples was quantified by thiobarbituric method in spectrophotometer at 549 nm. A standard curve with commercial sialic acid was used as parameter for quantification. The results showed that in tumor model the sialic acid was increased compared with control group and have significant difference ($p < 0.05$) in the first day after administration of cells. For the viral infection the concentration of sialic acid showed a significant difference ($p < 0,05$) in the first day after infection when compared infected with control group. The histological analysis in thigh of mice performed 24 hours after administration of B16F10 cells were found compact groups of round or polygonal melanocytes with clear and large cytoplasm, irregular chromatin, hyperchromatic and vacuolated nuclei, eosinophilic nucleoli and atypical mitosis.

Keywords: Sialic acid, melanoma, *Herpes Simplex virus 1*, glycoconjugates.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Ocorrência e Diversidade Estrutural dos Ácidos Siálicos	22
TABELA 2 – Concentração referente à curva analítica do ácido N-Acetilneuramínico .	54
TABELA 3 – Valores referentes às absorvâncias, média \pm desvio padrão (DP) para a construção da curva de calibração do ácido siálico	56
TABELA 4 – Análise de Variância (ANOVA) correspondente as absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do ácido siálico	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura e as ligações de alguns derivados de ácido siálico.....	21
FIGURA 2 – Algumas funções biológicas e patológicas do ácido siálico.....	25
FIGURA 3 – Diversidade de interações patobiológicas que envolvem ácido siálico..	26
FIGURA 4 – Destruição de eritrócitos circulantes sem resíduos de ácido siálico	29
FIGURA 5 – Modelo esquemático para a ligação de granulócitos às células endoteliais ativadas.....	30
FIGURA 6 – Família de siglecs humanos e de roedores	31
FIGURA 7 – Desenvolvimento do melanoma metastático	35
FIGURA 8 – Estrutura viral do <i>Herpesvirus</i>	39
FIGURA 9 – Ligação e fusão do vírus (HSV-1) com a célula hospedeira	41
FIGURA 10 – Representação gráfica da curva de calibração do ácido siálico, obtida por espectrofotometria do visível, $\lambda = 549$ nm.....	57
FIGURA 11 – Comparação entre o número de células em diferentes dias entre células Vero e células B16F10.	58
FIGURA 12 – Coxa esquerda normal, após 24 horas da administração de células Vero.....	59
FIGURA 13 – Tumor na coxa direita do camundongo 24 horas após a administração de células B16F10.....	59
FIGURA 14 – Coxas de camundongos 15 dias após a administração de células Vero e células B16F10, respectivamente	60
FIGURA 15 – Fotomicrografia da coxa de camundongos tratados com células Vero (A) e células B16F10 (B).....	61
FIGURA 16 – Fotomicrografia característica de melanoma subcutâneo	62
FIGURA 17 – Comparação da concentração de ácido siálico em camundongos com Melanoma, Controle e células Vero	64
FIGURA 18 – Comparação da concentração de ácido siálico do grupo infectado com vírus (HSV-1) e controle (CTL) nos diferentes dias do experimento	67
FIGURA 19 – Comparação da concentração de ácido siálico do grupo infectado com vírus (HSV-1) e controle (CTL) em diferentes horas após a infecção	69

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{M/L}$	Micromolar por Litro
AAV12 –	Vírus Adeno-Associado tipo 12
ALP –	Fosfatase Alcalina
ANOVA –	Análise de Variância
AS –	Ácido Siálico
B16F10 –	Linhagem de células de melanoma murino
BALB/c –	Linhagem de Camundongos
BK virus –	Tipo de Poliomavírus
C57BL/6 –	Linhagem de Camundongos
CA19-9 –	Marcador Tumoral
CD11/CD18 –	Beta Integrina (proteína trans-membrana dos leucócitos)
CMP –	Citidina monofosfato
CMP-Neu5Ac –	Citidina 5-monofosfato-ácido -N-acetilneuramínico
CMP-Neu5Gc –	Citidina 5-monofosfato-ácido -N-glicolilneuramínico
CMV –	Citomegalovírus
CVA24v –	Variante A24 Coxsackievirus
DC –	Células Dendríticas
diSia –	Dímeros de ácido siálico
DM –	Diabetes mellitus
DMEM –	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO –	Dimetil Sulfóxido
DNA –	Ácido Desoxirribonucléico
DP –	Desvio Padrão
DPR –	Desvio Padrão Relativo
EBV –	Vírus <i>Epstein Barr</i>
ECM –	Matriz Extracelular
EUA –	Estados Unidos da América
EV70 –	Enterovírus tipo 70

FCoV –	Coronavírus Felino
gB –	Glicoproteína viral B
gC –	Glicoproteína viral C
gD –	Glicoproteína viral D
gH –	Glicoproteína viral H
gI –	Glicoproteína viral I
gL –	Glicoproteína viral L
HHV-6 –	<i>Herpesvirus Humano 6</i>
HHV-7 –	<i>Herpesvirus Humano 7</i>
HHV-8 –	<i>Herpesvirus Humano 8</i>
HSV –	<i>Herpes Simplex virus</i>
HSV-1 –	<i>Herpes Simplex virus 1</i>
HSV-2 –	<i>Herpes Simplex virus 2</i>
HVEM –	Mediador de entrada de <i>Herpesvirus</i>
IFN –	Interferon
IFN α –	Interferon Alfa
IFN β –	Interferon Beta
IgG –	Imunoglobulina G
ICAM –	Molécula de Adesão Intercelular
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
JC vírus –	Tipo de Poliomavírus
KDN –	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosônico
KH ₂ PO ₄ –	Fosfato de Potássio Monobásico Anidro
KOS –	Linhagem de HSV
KHSV –	<i>Herpesvirus</i> do Sarcoma de Kaposi
MAG –	Mielina Associada à Glicoproteína
ManNAc –	N-acetilmanosamina
ManNAc-6P –	N-acetilmanosamina-6-fosfato
ManNAc-9P –	N-acetilmanosamina-9-fosfato
MHC –	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mL –	Mililitro

mM –	Milimolar
mM/mL –	Milimolar por Mililitro
mM/L –	Milimolar por Litro
Na ₂ HPO ₄ –	Fosfato de Sódio Bibásico Anidro
N-CAMs –	Molécula de Adesão de Células Neurônais
Neu5Ac –	Ácido 5-N-acetilneuramínico
NeuNAc –	Ácido N-acetilneuramínico
NeuNAc9P –	Ácido N-acetilneuramínico-9-fosfato
Neu5Gc –	Ácido 5-N-glicolilneuramínico
NK –	Células <i>Natural Killer</i>
oligoSia –	Oligômeros de ácido siálico
PBS –	Salina Tamponada com Fosfato
PFU –	Unidade Formadora de Placa (<i>Plaque Forming Unit</i>)
pH –	Potencial Hidrogeniônico
poliSia –	Polímeros de ácido siálico
PSA –	Ácido Polisiálico
R ² –	Coefficiente de correlação
RGP –	Fase de Crescimento Radial
RPM –	Rotações por Minuto
S100, HMB-45, MART-1 e MITF –	Marcadores Imunohistoquímicos
SBF –	Soro Bovino Fetal
Selectina E –	Selectina de Células Endoteliais
Selectina L –	Selectina de Leucócitos
Selectina P –	Selectina de Plaquetas
Sialil Le ^x –	Antígeno Sialil Lewis
Sialil-Tn –	Antígeno Sialil associado a tumor
Siglec –	Proteína trans-membrana que reconhece ácido siálico
SNC –	Sistema Nervoso Central
TCID –	Dose de Infecção em Cultura de Tecidos (<i>Tissue Culture Infections Dose</i>)

TNF α –	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TS –	Trans-sialidase
UDP-Glc-NAc –	Uridina difosfato-N-acetilglucosamina
Vero –	Linhagem de Células Epiteliais de rim de macaco verde africano
VGP –	Fase de Crescimento Vertical
VZV –	Vírus da Varicela Zoster
WHO –	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
α 2,3 –	Ligação glicosídica α 2,3
α 2,6 –	Ligação glicosídica α 2,6
α 2,8 –	Ligação glicosídica α 2,8

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 ÁCIDO SIÁLICO	20
2.1.1 FUNÇÕES DOS GLICOCONJUGADOS SIALIZADOS	26
2.2 ÁCIDO SIÁLICO E TUMOR	32
2.3 ÁCIDO SIÁLICO E VÍRUS	38
2.4 MARCADORES	44
2.5 MÉTODOS PARA DOSAGEM DE ÁCIDO SIÁLICO.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	47
3.1.1 MATERIAIS.....	47
3.1.2 EQUIPAMENTOS.....	48
3.2 ANIMAIS	48
3.3 CÉLULAS E VÍRUS	49
3.4 PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA E REAGENTES.....	49
3.4.1 MEIO DMEM SUPLEMENTADO COM 10 % SBF	49
3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	49
3.5.1 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	49
3.5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS	50
3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS B16F10 E VERO	50
3.7 INDUÇÃO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS C57BL/6 COM CÉLULAS B16F10	50
3.8 INFECÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS BALB/c COM HSV-1	51
3.9 COLETAS DE SANGUE	52
3.10 DOSAGENS DO ÁCIDO SIÁLICO	52
3.10.1 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES	53
3.10.1.1 REAGENTE PERIODATO	53

3.10.1.2 REAGENTE ARSENITO.....	53
3.10.1.3 REAGENTE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO	53
3.10.2 CURVA ANALÍTICA.....	53
3.10.3 DOSAGEM DO ÁCIDO SIÁLICO	54
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO SIÁLICO.....	56
4.2 CONTAGEM DAS CÉLULAS B16F10 E VERO <i>IN VITRO</i>	57
4.3 RESULTADOS DA INDUÇÃO DO TUMOR.....	59
4.3.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA	59
4.3.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO ÁCIDO SIÁLICO EM MODELO DE MELANOMA MURINO EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	63
4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO ÁCIDO SIÁLICO EM MODELO DE INFECÇÃO HERPÉTICA COM HSV-1 EM CAMUNDONGOS BALB/c	66
4.5 MÉTODO TIOBARBITÚRICO PARA DOSAGEM DO ÁCIDO SIÁLICO	70
4.6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
5 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	85
ANEXO I - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....	85

1 Introdução

O ácido siálico (AS) é um monossacarídeo formado por nove carbonos (MALYKH; SCHAUER; SHAW, 2001), carregado eletronegativamente (SCHAUER, 2004) e devido a modificações estruturais, forma uma família de mais de cinquenta moléculas com estruturas diferentes (MÜNSTER-KÜHNEL et al, 2004). Essa diversidade é devido a variedade de substituições nas posições 4, 5, 7, 8 e 9 da cadeia do AS, também denominado ácido neuramínico, formando por exemplo, o ácido 5-N-acetilneuramínico (Neu5Ac), o ácido 5-N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e o ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosônico (KDN), sendo estes os principais tipos de AS (VARKI; VARKI, 2007).

Os ácidos siálicos podem ser encontrados em alguns microrganismos invertebrados e em todos os tecidos de mamíferos (SCHAUER, 2004). Nos mamíferos, os ácidos siálicos normalmente ocupam posições terminais expostas sobre as cadeias de oligossacarídeos glicoconjugados (TANNER, 2005) e atuam em uma variedade de processos celulares como na adesão e reconhecimento celular, inflamação e resposta imune (MALYKH; SCHAUER; SHAW, 2001; TANNER, 2005).

De acordo com Akcay e colaboradores (2001) a superfície das células cancerosas difere em muitos aspectos das células normais. Uma dessas transformações está associada com mudanças na composição da membrana celular, verificando-se alterações nas membranas em termos do conteúdo de AS de glicoproteínas e glicolípídios. Nos processos tumorais o AS está envolvido na migração, invasão e potencial metastático (CHANG et al, 2006).

No Brasil, o câncer mais incidente é o câncer de pele, sendo que o tumor cutâneo de maior importância é o melanoma. Embora ele represente 4 % dos tumores de pele é o responsável por mais de 79 % das mortes por este tipo de câncer (DIMATOS et al, 2009). O diagnóstico precoce é a melhor alternativa para alcançar a cura (CALIFANO; NANCE, 2009), sendo que a presença de metástases nos pacientes com melanoma significa um mau prognóstico (THIES et al, 2002).

Além dos ácidos siálicos estarem implicados em processos tumorais, os mesmos estão envolvidos em infecções virais, pois muitos microrganismos

desenvolvem estratégias, utilizando o AS presente na superfície celular como um sítio de ligação para a adesão e subsequente infecção da célula (SCHAUER, 2004). Como é o caso do vírus *Influenza*, onde as glicoproteínas virais, responsáveis pela ligação do vírus nos receptores da superfície celular do hospedeiro, se ligam ao AS para penetrarem nas células (SUZUKI et al, 2000). Assim como o *Influenza*, sabe-se que dois membros da família *Picornaviridae*, variante A24 *coxsackievirus* (CVA24v) e *enterovirus* tipo 70 (EV70), responsáveis pela maioria dos casos de conjuntivite aguda hemorrágica, fazem do AS o seu receptor celular para a infecção do hospedeiro (NILSSON et al, 2008).

Da mesma maneira os *Poliomavirus* humanos (JC vírus e BK vírus) que podem provocar disfunção renal, utilizam resíduos de AS para se ligar à célula hospedeira (DUGAN; GASPAROVIC; ATWOOD, 2008). O vírus *Adeno-Associado* tipo 12 (AAV12), não infecta humanos, mas pode infectar bovinos, aves, equinos e ovinos, e é dependente de AS e sulfato de heparano para infectar as células do hospedeiro (SCHMIDT et al, 2008).

Os métodos para diagnóstico tumoral e viral ainda são muitas vezes inespecíficos, pouco precisos ou caros (VARELLA et al, 2005; VESTERGAARD; MENZIES, 2008), no caso de tumores, a demora no diagnóstico pode ser fatal, sendo que uma diminuição na taxa de mortalidade de pacientes com melanoma pode ser alcançada através do diagnóstico precoce (HALPERN; LIEB, 2007).

O diagnóstico das infecções herpéticas pode ser realizado através de isolamento do vírus em cultura celular e detecção do DNA viral por reação em cadeia da polimerase (PCR). Sendo que o isolamento em cultura celular é mais barato que a PCR, entretanto os resultados são obtidos 24 à 48 horas após a inoculação da amostra na cultura de células (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A nanotecnologia tem impacto positivo em quase todos os setores, incluindo a saúde. A aplicação da nanotecnologia à saúde (nanomedicina) requer a interseção de várias disciplinas, incluindo biologia, química, física, química e engenharia mecânica, ciência dos materiais e da medicina clínica. Recentemente, várias novas modalidades diagnósticas e terapêuticas surgem através da montagem supramolecular de componentes simples, impossíveis de serem desenvolvidas sem a engenharia em

nanoescala (FARAKHZAD; LANGER, 2006).

O uso de nanotecnologias para aplicações de diagnóstico oferece uma grande promessa para atender às rigorosas demandas dos laboratórios clínicos em sensibilidade e custo-eficácia (AZZAZY; MANSOUR; KAZMIERCZAK, 2006).

Em decorrência do exposto e, sabendo que o ácido siálico está presente nos glicoconjugados na superfície das membranas de células tumorais e algumas infecções virais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento do ácido siálico na fase aguda utilizando modelos de melanoma murino e infecção herpética com *Herpes Simplex Virus 1* (HSV-1), e relacionar com as concentrações séricas de AS no início do processo tumoral e na infecção herpética.

2 Referencial Teórico

2.1 Ácido Siálico

As cadeias de glicanos (carboidratos) dos vertebrados são compostas principalmente por açúcares de 5 e 6 carbonos. Uma exceção é a família dos ácidos siálicos, que são α -ceto ácidos com uma cadeia de 9 carbonos (ANGATA; VARKI, 2002).

Os ácidos siálicos mais abundantes são o ácido 5-N-Acetilneuramínico (Neu5Ac), o ácido 5-N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e o ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosônico (KDN). O Neu5Gc difere do Neu5Ac devido à existência de um átomo de oxigênio adicional na porção N-acil (MALYKH; SCHAUER; SHAW, 2001), sendo o Neu5Gc presente em traços nos tecidos e fluidos humanos saudáveis (MALYKH; SCHAUER; SHAW, 2001). As maiores variações estruturais ocorrem na posição 5 do AS, o qual pode ser substituído por acetamido, hidroxiacetamido ou hidroxila, para formar Neu5Ac, Neu5Gc e KDN, respectivamente (MÜNSTER-KÜHNEL et al, 2004), sendo esses derivados mostrados na Figura 1.

A ligação glicosídica do AS com outros açúcares pode ocorrer de três maneiras diferentes: ligação glicosídica α 2,3; α 2,6 e α 2,8, (Figura 1), sendo a última forma geralmente existente como homopolímeros de algumas glicoproteínas expressas em tecido neural e gangliosídeos (ULLOA; REAL, 2001). Nas células de mamíferos, os monômeros de AS (Neu5Ac, Neu5Gc e KDN) podem formar dímeros (diSia), oligômeros (oligoSia) ou polímeros (poliSia) em cadeias lineares aniônicas que consistem de repetições desses monômeros através de ligações glicosídicas α 2,8 entre os resíduos de AS (WANG et al, 2009).

Os ácidos siálicos contribuem para uma enorme diversidade estrutural de carboidratos complexos, os quais são os maiores constituintes de proteínas e lipídios das membranas celulares e macromoléculas secretadas. A diversidade da cadeia de glicanos é aumentada pela biossíntese de vários tipos de ácidos siálicos (Tabela 1) (ANGATA; VARKI, 2002; BUSCHIAZZO; ALZARI, 2008), potencializando desta forma a complexidade dos glicoconjugados (SCHAUER, 2004).

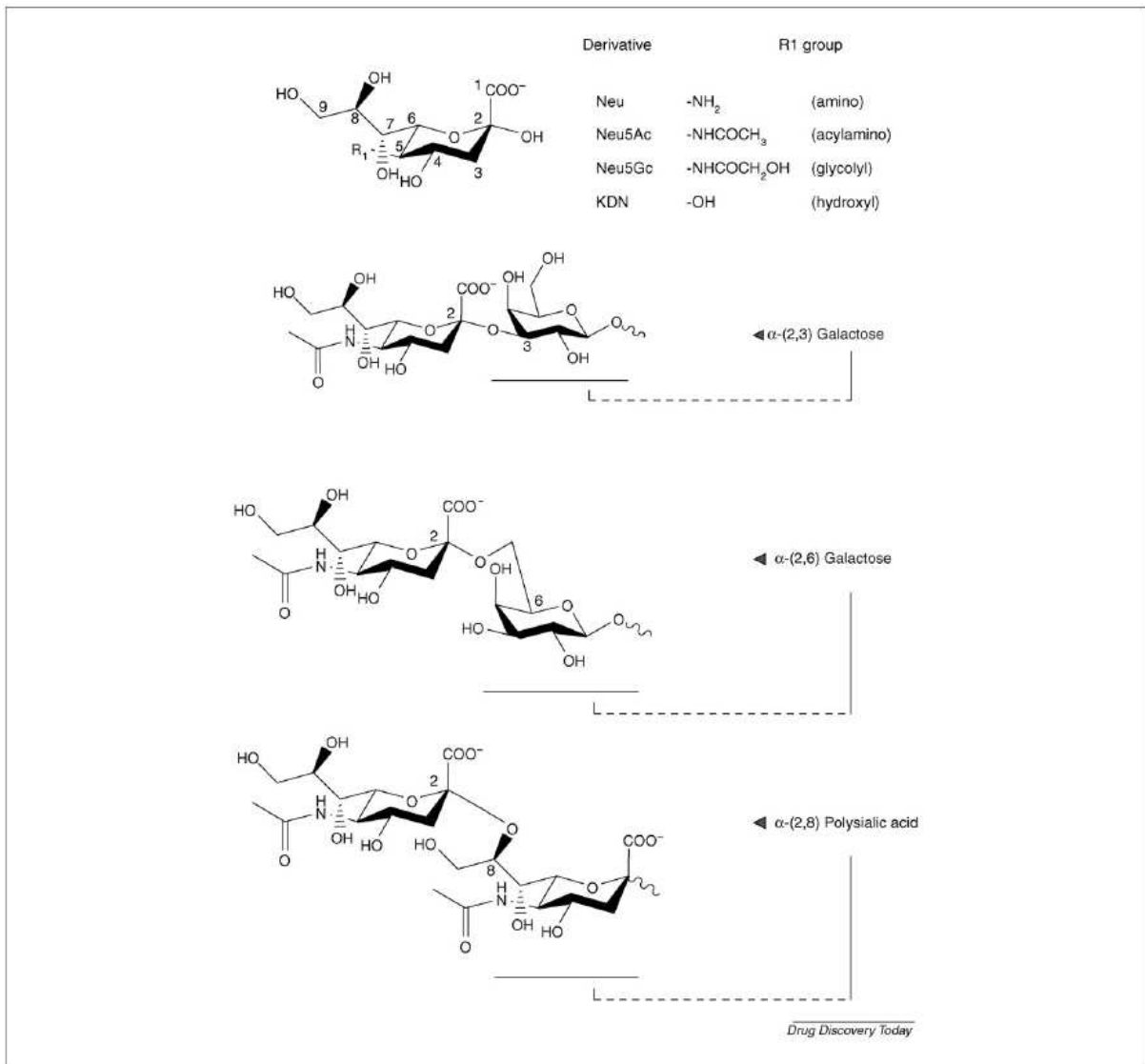


Figura 1. Estrutura e ligações de alguns derivados de ácido siálico (BYRNE; DONOHOE; O'KENNEDY, 2007).

De acordo com Schauer (2004), apesar da diversidade estrutural e da existência de vários tipos de AS sua distribuição depende do animal, espécies celulares, função da célula e parece ser fortemente regulada a nível genético. Desta forma, uma célula ou organismo nunca apresentará todos os tipos de AS.

Tabela 1. Ocorrência e Diversidade Estrutural dos Ácidos Siálicos (Adaptada de ANGATA; VARKI, 2002).

Nome dos Compostos	Abreviaturas	Ocorrência ^a
Ác. Neuramínico	Neu	V ^b
Ác. Neuramínico 1,5 lactâmico	Neu 1,5 lactâmico	V
Ác. 5-N-acetilneuramínico	Neu 5Ac	V, E, Ps, Pz, F, B
Ác. 5-N-acetil-4-O-acetilneuramínico	Neu 4,5Ac ₂	V
Ác. 5-N-acetil-7-O-acetilneuramínico	Neu 5,7Ac ₂	V, Pz, B
Ác. 5-N-acetil-8-O-acetilneuramínico	Neu 5,8Ac ₂	V, B
Ác. 5-N-acetil-9-O-acetilneuramínico	Neu 5,9Ac ₂	V, E, Pz, F, B
Ác. 5-N-acetil-4,9-di-O-acetilneuramínico	Neu 4,5,9Ac ₃	V
Ác. 5-N-acetil-7,9-di-O-acetilneuramínico	Neu 5,7,9Ac ₃	V, B
Ác. 5-N-acetil-8,9-di-O-acetilneuramínico	Neu 5,8,9Ac ₃	V
Ác. 5-N-acetil-4,7,9-tri-O-acetilneuramínico	Neu 4,5,7,9Ac ₄	V
Ác. 5-N-acetil-7,8,9-tri-O-acetilneuramínico	Neu 5,7,8,9Ac ₄	V
Ác. 5-N-acetil-4,7,8,9-tetra-O-acetilneuramínico	Neu 4,5,7,8,9Ac ₅	V
Ác. 5-Nacetil-9-O-lactilneuramínico	Neu 5Ac9Lt	V
Ác. 5-N-acetil-4-O-acetil-9-O-lactilneuramínico	Neu 4,5Ac ₂ 9Lt	V
Ác. 5-N-acetil-7-O-acetil-9-O-lactilneuramínico	Neu 5,7 Ac ₂ 9Lt	V
Ác. 5-N-acetil-8-O-metilneuramínico	Neu 5Ac ₈ Me	V, E
Ác. 5-N-acetil-9-O-acetil-8-O-metilneuramínico	Neu 5,9Ac ₂ 8Me	V, E
Ác. 5-N-acetil-8-O-sulfoneuramínico	Neu 5Ac8S	V, E
Ác. 5-N-acetil-4-acetil-8-O-sulfoneuramínico	Neu 4,5Ac ₂ 8S	V, E
Ác. 5-N-acetil-9-O-fosfoneuramínico	Neu 5Ac9P	V ^{c,d}
Ác. 5-N-acetil-2,3-O-dideidroneuramínico	Neu 2en5Ac	V ^d
Ác. 5-N-acetil-9-O-acetil-2-deoxi-2,3-dideidroneuramínico	Neu 2en5,9Ac ₂	V ^d
Ác. 5-N-acetil-2-deoxi-2,3-dideidro-9-O-lactilneuramínico	Neu 2en5Ac9Lt	V ^d
Ác. 5-N-acetil-2,7- hidroneuramínico	Neu 2,7an5Ac	V ^d
Ác. 5-N-acetilneuramínico1,7-lactona	Neu5Ac1,7lactona	V
Ác. 5-N-acetil-4,9-di-O-acetilneuramínico1,7-lactona	Neu4,5,9Ac ₃ 1,7lactona	V
Ác. 5-N-glicolilneuramínico	Neu5Gc	V, Pz, F
Ác. 4-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu4Ac5Gc	V
Ác. 7-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu7Ac5Gc	V
Ác. 8-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu8Ac5Gc	V
Ác. 4,7-di-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu4,9Ac ₂ 5Gc	V
Ác. 4,9-di-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu4,9Ac ₂ 5Gc	V
Ác. 8,9-di-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu8,9Ac ₂ 5Gc	V
Ác. 7,8,9-tri-O-acetil-5-N-glicolilneuramínico	Neu7,8,9Ac ₃ 5Gc	V
Ác. 5-N-glicolil-9-O-lactilneuramínico	Neu5Gc9Lt	V
Ác. 4-O-acetil-5-N-glicolil-9-lactilneuramínico	Neu4Ac5Gc9Lt	V
Ác. 8-O-acetil-5-N-glicolil-9-lactilneuramínico	Neu8Ac5Gc9Lt	V
Ác. 4,7-di-O-acetil-5-N-glicolil-9-lactilneuramínico	Neu4,7Ac ₂ 5Gc9Lt	V
Ác. 7,8-di-O-acetil-5-N-glicolil-9-lactilneuramínico	Neu7,8Ac ₂ 5Gc9Lt	V
Ác. 5-N-glicolil-8-O-metilneuramínico	Neu5Gc8Me	E
Ác. 9-O-acetil-5-N-glicolil-8-metilneuramínico	Neu9Ac5Gc8Me	E
Ác. 7,9-di-O-acetil-5-N-glicolil-8-O-metilneuramínico	Neu7,9Ac ₂ 5Gc8Me	E
Ác. 5-N-glicolil-8-O-sulfoneuramínico	Neu5Gc8S	V, E
Ác. 5-N-glicolil-9-O-sulfoneuramínico	Neu5Gc9S	E
Ác. 5-(O-acetil)glicolilneuramínico	Neu5GcAc	V
Ác. 5-(O-metil)glicolilneuramínico	Neu5GcMe	E
Ác. 2-deoxi-2,3-dideidro-5-N-glicolilneuramínico	Neu2en9Ac5Gc	V ^d
Ác. 9-O-acetil-2-deoxi-2,3-dideidro-5-N-glicolilneuramínico	Neu2en9Ac5Gc	V ^d
Ác. 2-deoxi-2,3-dideidro-5-N-glicolil-9-O-lactilneuramínico	Neu2en5Gc9Lt	V ^d
Ác. 2,7-hidro-5-N-glicolilneuramínico	Neu2,7an5Gc	V ^d
Ác. 2,7-hidro-5-N-glicolil-8-O-metilneuramínico	Neu2,7an5Gc8Me	E ^d
AC. 5-N-glicolilneuramínico1,7-lactona	Neu5Gc1,7lactona	V
Ác. 2-ceto-3-deoxinononico	KDN	V, B
Ác. 5-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN5Ac	V
Ác. 7-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN7Ac	V
Ác. 9-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN9Ac	V
Ác. 4,5-di-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN4,5Ac ₂	V
Ác. 4,7-di-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN4,7Ac ₂	V
Ác. 5,9-di-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN5,9Ac ₂	V
Ác. 7,9-di-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN7,9Ac ₂	V
Ác. 8,9-di-O-acetil-2-ceto-3-deoxinononico	KDN8,9Ac ₂	V
AC. 2-ceto-3-deoxi-5-O-metilnononico	KDN5Me	B
Ác. 2-ceto-3-deoxi-9-O-fosfonononico	KDN9P	V ^{c,d}

^aAbreviaturas: V - vertebrados; E – equinodermos; Ps – protostômios (insetos e moluscos); Pz – protozoários; F – fungos; B – bactérias; ^b – presente apenas como forma ligada; ^c – intermediário biossintético; ^d – presente apenas como forma livre.

Em humanos, o AS pode ser encontrado em tecidos e fluidos corpóreos, incluindo saliva, suco gástrico, soro, urina, lágrimas, fluido cérebro-espinhal e leite. As concentrações variam fisiologicamente com a idade, etnia, condição normal/anormal do metabolismo do Ácido Siálico, assim como da ingestão do mesmo proveniente da alimentação. Os níveis normais de AS total no soro ou plasma de indivíduos saudáveis está entre 1,58 a 2,22 mM/L, principalmente ligado a proteínas (2 mM/L), gangliosídeos (10 a 50 μ M/L), e AS livre (0,5 a 3 μ M/L) (WANG, 2009).

A concentração normal de AS em camundongos é de 20,2 a 25,8 μ g/mL, segundo o estudo realizado por Menon e colaboradores (1999) em camundongos da linhagem C57BL/6, avaliando a atividade anti-metastática da curcumina e da catequina, na redução da formação de metástases pulmonares por células B16F10. O nível sérico de AS foi determinado através do método do ácido tiobarbitúrico no grupo controle, onde havia somente animais normais sem indução de tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento, e nos demais grupos estudados. Nesse estudo foi demonstrado que o uso de substâncias anti-metastáticas diminuiu a concentração de AS no soro de camundongos quando comparado com animais que não receberam tratamento.

A biossíntese do AS (Neu5Ac e Neu5Gc) ocorre no citosol com a formação de N-acetilmanosamina (ManNAc) proveniente de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). A ManNAc é então fosforilada e forma ManNAc-6 fosfato (ManNAc-6P). O segundo passo envolve a condensação de ManNAc ou ManNAc-6P com fosfoenolpiruvato para gerar NeuNAc ou NeuNAc-9P. O NeuNAc-9P é desfosforilado e gera NeuNAc. A ativação do NeuNAc em citosina-5-monofosfato-ácido-N-acetilneuramínico (CMP-Neu5Ac) ocorre no núcleo. Após, já no citosol, o CMP-Neu5Ac pode ser modificado para citosina-5-monofosfato-ácido-N-glicolilneuramínico (CMP-Neu5Gc) através da citosina-5-monofosfato-ácido-N-acetilneuramínico hidroxilase (CMP-Neu5Ac hidroxilase). O CMP-Neu5Ac e CMP-Neu5Gc são então transportados por um carreador específico do complexo de golgi, de onde são transferidas por sialiltransferases para resíduos de galactose das glicoproteínas e glicolípídios da membrana celular (CHEN et al, 2002; TANNER, 2005).

As características biofísicas de vários sistemas biológicos são determinadas

pela presença da carga negativa e hidrofiliçidade do AS na superfície das células. Um exemplo da importância da carga negativa do AS é mostrado nos eritrócitos humanos e em outros tipos de células. O AS proporciona uma repulsão de carga, evitando desta forma, interações indesejadas de células na corrente circulatória (VARKI, 2008). A carga negativa, além de ser determinante nas interações entre as células (linfócitos T e B), também é importante em hormônios e citocinas e na invasão de patógenos (CROSS et al, 2003).

A densidade do AS presente na membrana basal glomerular parece crucial para manter a função normal de filtração renal (VARKI, 2008). A presença de sulfato de heparano e AS contribuem para a eletronegatividade da parede do capilar glomerular, contribuindo desta forma, para a seletividade da barreira que é dependente de carga. Pacientes com Diabetes mellitus (DM) tem redução na quantidade de sulfato de heparano e de AS, aumentando o ritmo de filtração glomerular e o fluxo plasmático renal nas fases iniciais de DM, sugerindo que essas alterações sejam responsáveis pela proteinúria e pelas lesões histopatológicas renais (FARIA, 2001).

No cérebro de mamíferos existe uma grande quantidade de polímeros de AS com ligações $\alpha 2,8$, denominado de ácido polisiálico (PSA), ligados a moléculas de adesão de células neuronais (NCAM), que são moléculas de superfície celular, as quais exercem atividades relacionadas com adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. O alto grau de hidratação do PSA permite aumentar a distância entre as membranas das células, que respondem com maior eficiência aos sinais extrínsecos (RUTISHAUSER, 2008).

De acordo com Rutishauser (2008) os níveis de PSA são reduzidos no cérebro de indivíduos adultos, porém, níveis elevados de PSA persistem em regiões distintas para manter a capacidade neurogênica, como na zona subventricular, ou regiões que apresentam plasticidade fisiológica, como no hipotálamo. Devido à habilidade do PSA em regular o desenvolvimento e a plasticidade neural em adultos, a manipulação das funções de PSA pode ter valor terapêutico em situações nas quais o tecido tenha sido lesado.

Além de implicações em animais, existem muitas bactérias que produzem e utilizam o AS em sua superfície celular, a fim de mimetizar células de mamíferos e

confundir o sistema imune do hospedeiro, como por exemplo, a *Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis* e *Campylobacter jejuni* (BUSCHIAZZO; ALZARI, 2008). Já, a *Corynebacterium diphtheriae* transfere para si o AS de glicoconjugados do hospedeiro usando uma *trans*-sialidase (TS) (uma forma modificada de sialidase que catalisa uma reação eficiente de sialiltransferase) (CROCKER; VARKI, 2001).

O mesmo mecanismo pode ser observado em alguns protozoários, como ocorre no *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), onde a transferência do AS é realizada através da TS, uma enzima que cliva o AS de glicoconjugados da célula do hospedeiro e transfere para as estruturas receptoras da sua superfície, promovendo a sialização que evita o reconhecimento pelo sistema complemento e ativação do sistema imune (JACOBS; ERDMANN, FLEISCHER, 2010). Apesar da TS e dos glicoconjugados sializados aparentemente apresentarem funções críticas para a infecção, persistência e patogênese da doença de Chagas causada pelo *T. cruzi*, os exatos mecanismos moleculares da sua função e os receptores para estas estruturas sializadas nas células hospedeiras ainda são desconhecidos (BUSCHIAZZO et al, 2002). Algumas das implicações do AS em processos biológicos são demonstradas na Figura 2.

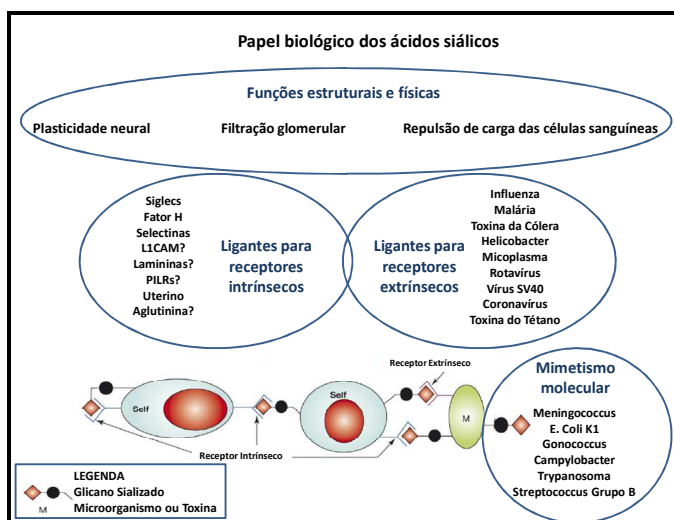


Figura 2. Algumas funções biológicas e patológicas do ácido siálico (Adaptado de VARKI, 2008). Primeiro, devido à carga negativa e hidrofobicidade, o AS tem muitos papéis estruturais ou físicos, por exemplo, na plasticidade neural, filtração glomerular e repulsão de carga das células sanguíneas. Segundo, o AS serve como componente de sítios de ligação para diversos patógenos e toxinas. Terceiro, o AS serve como ligante para receptores intrínsecos como Siglecs e fator H. As interações possíveis entre AS (como moléculas de glicanos sializadas) expressas nas células do hospedeiro (Self) com receptores intrínsecos expressos na mesma célula ou em uma célula diferente são demonstradas. A classe final das funções é o mimetismo molecular, no qual microrganismos patogênicos utilizam o AS para evitar a ativação do sistema imune do hospedeiro. Abreviações: L1CAM – molécula de adesão celular L1; PILR – par de imunoglobulinas como receptor.

Nos vírus a presença do AS na superfície das células pode interferir nas infecções, sendo que o reconhecimento e a ligação em um receptor apropriado na superfície da célula do hospedeiro é o primeiro passo da infecção viral, como acontece com alguns vírus como *Influenza A* e *C* (KEPPLER et al, 2001) e o vírus JC (JCV) da família dos poliomavírus (EASH et al, 2004).

A Figura 3 mostra os principais envolvimento do AS em processos patobiológicos, onde os ácidos siálicos são encontrados em posições terminais de N e O-glicanos (glicoproteínas da membrana celular se ligam aos carboidratos através de ligações N ou O-glicosídicas) e glicoesfingolípídios expressos na superfície celular.

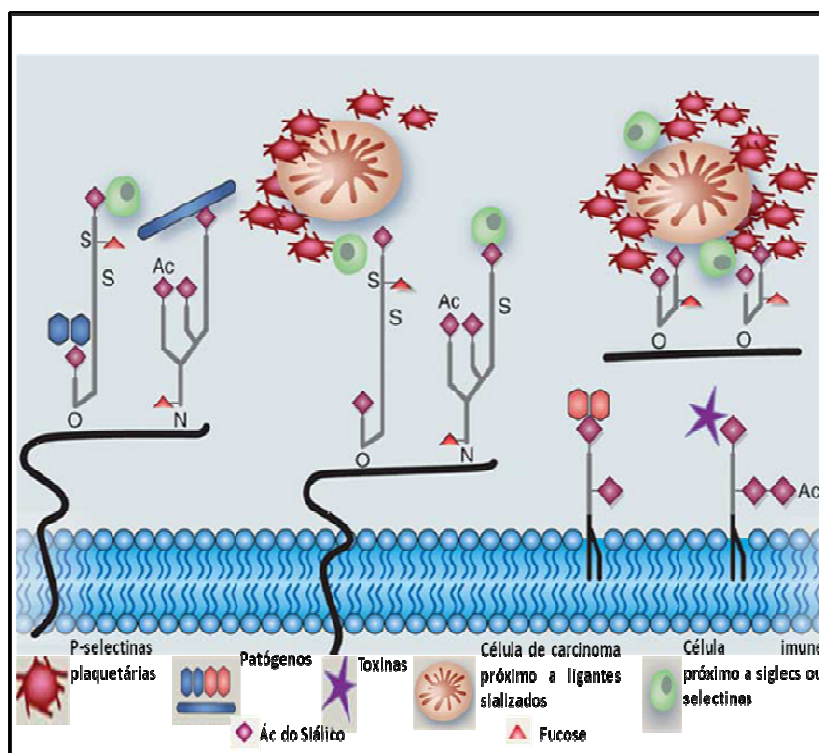


Figura 3. Diversidade de interações patobiológicas que envolvem ácido siálico. (Adaptado de VARKI; VARKI, 2007). Os resíduos de Ácido Siálico presentes nas glicoproteínas e glicolípídios da membrana celular podem se ligar a P-selectinas, patógenos, toxinas, células imunes e células tumorais.

2.1.1 Funções dos Glicoconjugados Sializados

As células normais de todo organismo vivo apresentam conformidade em relação a citologia, histologia e funcionalidade, para promover a manutenção da vida. De acordo com suas características morfológicas e funcionais, determinadas por seu

material genético, e, devido a sua especificidade, as células estão agrupadas em tecidos, que por sua vez formam os órgãos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). O contato e a permanência de uma célula ao lado da outra são controlados por substâncias intracitoplasmáticas e, ao que parece se reconhecem por processos de superfície (GENNIS, 1989).

Esses processos de superfície ocorrem na membrana plasmática, a qual define a periferia da célula e envolve todo o conteúdo celular, definindo as fronteiras e proporcionando seu contato com o ambiente (GENNIS, 1989; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). As membranas são impermeáveis à maioria dos solutos polares ou eletricamente carregados e possuem cerca de 5 a 8 nm de espessura, sua organização química e física, assim como suas funções dependem de três classes de compostos bioquímicos que são lipídeos, proteínas e carboidratos. Os lipídeos e proteínas das membranas arranjam-se na forma de um modelo mosaico fluido, onde os fosfolipídios formam uma bicamada na qual estão inseridas as proteínas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Já os carboidratos, presentes em todos os sistemas biológicos são encontrados fixados tanto às moléculas de lipídios como às moléculas de proteínas através de ligações covalentes formando glicoconjugados, denominados glicolipídios e glicoproteínas, respectivamente (FUSTER; ESKO, 2005), que são característicos de cada tipo celular sendo expressos especificamente de acordo com o estágio de desenvolvimento de células ou tecidos (ROSETE et al, 2008).

Os glicoconjugados são moléculas biologicamente ativas e agem na transmissão de informações, principalmente nas interações específicas entre as células e entre células e a matriz extracelular. Algumas de suas múltiplas funções são o reconhecimento e adesão célula-célula, migração celular, coagulação do sangue e resposta imunológica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

As moléculas de adesão são essenciais para o desenvolvimento e a manutenção de organismos multicelulares e as interações proteína-carboidrato são importantes na comunicação celular (KELM et al, 1994). As cadeias de glicoconjugados de todos os tipos de células geralmente possuem o AS ligado em suas posições terminais (VARKI, 2008), participando de importantes funções intrínsecas necessárias para um

desenvolvimento orgânico normal e, por outro lado fazem parte de sítios de reconhecimento, os quais os patógenos atacam (VARKI; VARKI, 2007).

Com relação às funções intrínsecas, o AS pode ser reconhecido por receptores intrínsecos em células de vertebrados. Entre esses receptores estão as lectinas, selectinas e as siglecs (proteínas trans-membrana que reconhecem ácido siálico) (VON GUNTEN; BOCHNER, 2008; VARKI; VARKI, 2007).

As lectinas são proteínas que reconhecem açúcares (excluindo anticorpos) (ANGATA; VARKI, 2002) que se ligam a carboidratos com alta afinidade e especificidade. São encontradas em mamíferos e regulam uma variedade de funções celulares críticas. Dentre as lectinas de mamíferos que reconhecem AS sobre vários tipos celulares estão as selectinas (que regulam a adesão e migração de leucócitos, incluindo células T), siglecs (que regulam a sinalização intracelular), e as galectinas (participam da migração e apoptose de células T) (BI; BAUM, 2009).

As lectinas também atuam em uma ampla variedade de processos intercelulares de reconhecimento, adesão e sinalização, como também no endereçamento intracelular de proteínas recém-sintetizadas. Além de atuarem em processos como maturação de leucócitos, diferenciação, proliferação, apoptose e migração (BI; BAUM, 2009)

Um exemplo de mecanismo de sinalização ocorre nos eritrócitos, onde as unidades de AS encontradas nas extremidades das células protegem-nas 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 lectinas (receptores de assialoglicoproteína; “assialo” indica “sem ácido siálico”) do fígado e baço (BULAI et al, 2003), conforme mostra a Figura 4. O mesmo mecanismo de desialização ocorre com linfócitos e trombócitos, os quais ficam presos em resíduos de galactose do fígado e macrófagos do baço quando perdem seus resíduos de AS (SCHAUER, 2009).

Outro exemplo é a ceruloplasmina, uma glicoproteína transportadora de átomos de cobre, a qual tem várias cadeias oligossacarídicas que terminam com AS. A remoção dos resíduos de AS pela sialidase é uma forma pela qual o organismo marca proteínas velhas para serem destruídas e repostas. A interação ceruloplasmina-

receptor, no fígado, desencadeia a endocitose e a destruição da ceruloplasmina (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

As selectinas são receptores encontrados nas membranas plasmáticas de leucócitos (L-selectinas), plaquetas (P-selectinas) e em células endoteliais (E-selectinas) e regulam o reconhecimento de estruturas que contém AS e fucose (ANGATA; VARKI, 2002) desempenhando um papel importante na imunidade inata, hemostasia e reperfusão (VARKI; VARKI, 2007).

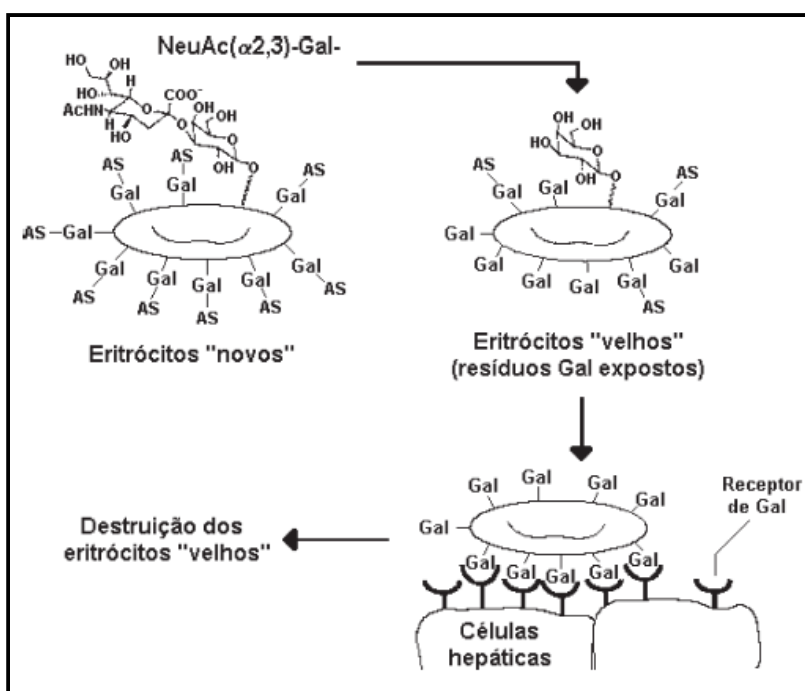


Figura 4. Destruição de eritrócitos circulantes sem resíduos de ácido siálico. Quando os eritrócitos estão velhos e prontos para a destruição, ocorre a remoção dos ácidos siálicos terminais pela enzima sialidase expondo resíduos de galactose, que interagem com receptores dos hepatócitos (FÁTIMA et al, 2005).

São as selectinas que iniciam o primeiro passo para a adesão de leucócitos da corrente circulatória com células endoteliais ativadas (BI; BAUM, 2009). A saída de leucócitos da circulação para o sítio da inflamação (E- e P-selectinas) ocorre através da ligação da P-selectina com carboidratos específicos dos leucócitos circulantes, como pode ser observado na Figura 5 (WANG, 2005). De acordo com Fuster e Esko (2005) em processos tumorais, os ácidos siálicos também tem um importante papel na adesão de células tumorais com plaquetas e leucócitos através de receptores (selectinas), que

regulam a adesão de plaquetas, leucócitos e células endoteliais pela expressão respectiva de P-selectina, L-seletina e E ou P-selectina.

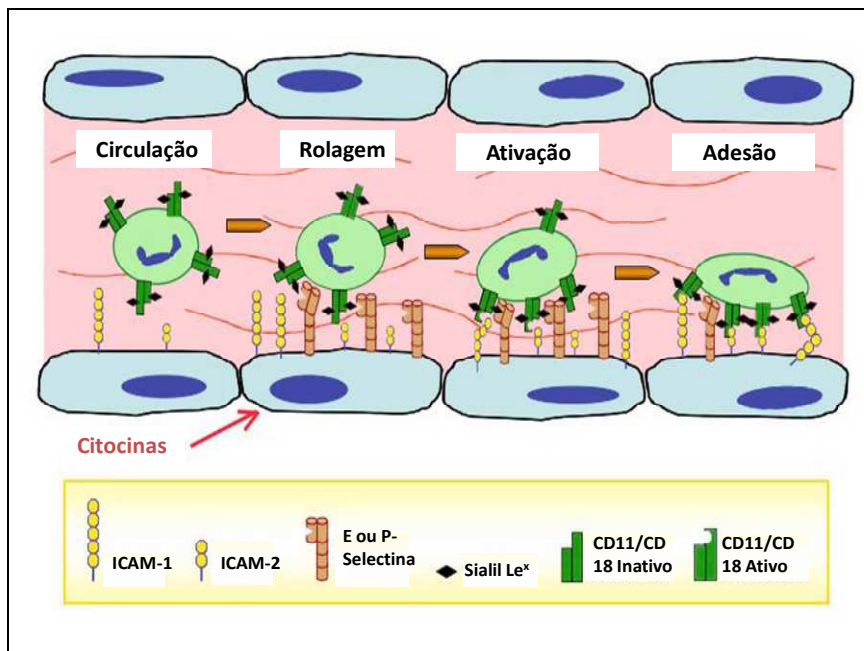


Figura 5. Modelo esquemático para a ligação de granulócitos às células endoteliais ativadas. Células endoteliais na ausência de estímulo expressam baixas quantidades de ICAM-1 e ICAM-2. Após um estímulo de citocinas as quantidades de ICAM-1 e ICAM-2 são aumentadas e induzem o aumento dos níveis de E e P-selectina. A ligação de E ou P-selectina com Sialil Le^x de CD11/CD18 sobre os granulócitos pode desencadear a ativação de CD11/CD18 fazendo com que os granulócitos se prendam sobre as células endoteliais através de ICAM-1 e ICAM-2. Este modelo pode ser aplicado ao modo de adesão de células tumorais e metástase (Adaptado de WANG, 2005).

A outra classe de lectinas, denominada siglecs (proteínas que reconhecem ácido siálico) é caracterizada pela sua especificidade por AS (CROCKER; REDELINGHUYS, 2008). São membros da superfamília das imunoglobulinas e sinalizam funções nos sistemas hematopoiético, imune e nervoso (CROCKER, 2002). São principalmente encontradas em células da imunidade inata e adaptativa e parecem desempenhar um papel importante nesses processos (VARKI; VARKI, 2007).

A família das siglecs humanas é composta por 15 membros, predominantemente expressos sobre os leucócitos (ERBACHER et al, 2009), com exceção da mielina associada a glicoproteína (MAG) (siglec-4), que é expressa em tecidos nervosos por células que formam mielina, como oligodendrócitos e células de Schwann. (CROCKER, 2002; CROCKER; PAULSON; VARKI, 2007; BI; BAUM, 2009;

LOPEZ; SCHNAAR, 2009).

Dois grupos primários de siglecs já foram identificados: o primeiro grupo inclui a sialoadesina (siglec-1), CD22 (siglec-2), MAG (siglec-4), e siglec-15, todos estes são bem conservados em mamíferos. O segundo grupo, mais evoluído, é chamado de siglecs relacionadas ao CD33 (siglec-3) que são: siglec-3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 e 16, em humanos. Já em ratos, as siglecs do grupo CD33 compreendem as siglecs - E, F, G e H, as ilustrações encontram-se na Figura 6 (CROCKER; PAULSON; VARKI, 2007; CROCKER; REDELINGHUYS, 2008).

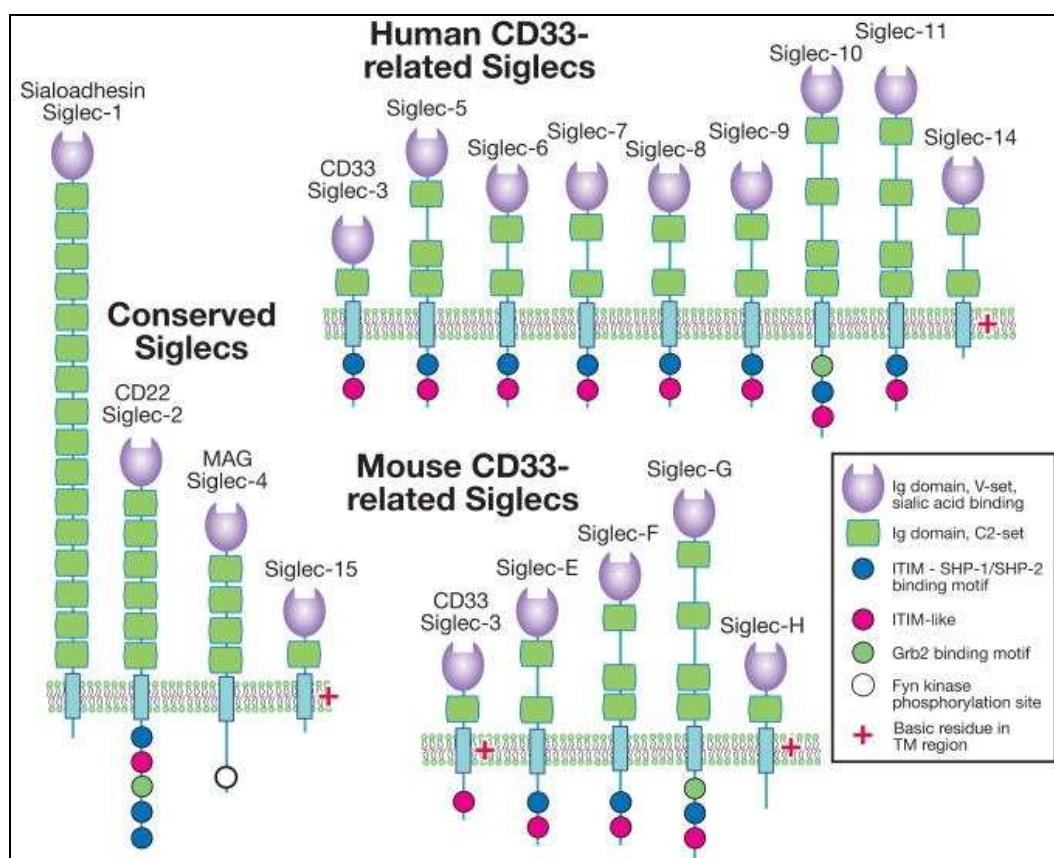


Figura 6. Família de Siglecs humanos e de roedores (VARKI; CROCKER, 2009).

As galectinas, a última classe de lectinas citada, são proteínas solúveis, secretadas por uma via não clássica que passa pelo complexo de golgi. Estão presentes em células imunes, tais como células T, células B, macrófagos, eosinófilos, basófilos, e células epiteliais do timo (ERBACHER et al, 2009). Até agora foram

identificadas 15 galectinas de mamíferos, sendo que as galectinas 1, 2, 3, 8 e 9 são expressas em células T. As galectinas, além de reconhecerem diferentes receptores (glicanos, como o ácido siálico), estão envolvidas em muitos processos biológicos importantes: no sistema imune regulam a maturação de linfócitos, migração, proliferação sobrevivência e morte celular (BI; BAUM, 2009). A sua atividade biológica é, em parte, mediada por grupos de proteínas na superfície das células alvo com sequências de N-acetilactosamina, que está presente em ambos os N- e O- glicanos em alternância, sendo que variações na atividade de glicosiltransferases e glicosidasas modulam a densidade de ligações para galectinas. A α 2,6-sialiltransferase é um exemplo de enzima que regula a ativação de células T, secreção de citocinas ou apoptose através de alterações nos sítios de ligação de galectinas (ERBACHER et al, 2009).

As galectinas 1, 3 e 9 são expressas em células dendríticas imaturas e maduras. A galectina 1 é um fator regulatório da resposta imune que reduz a proliferação de linfócitos, induz apoptose de células T, inibe a secreção de citocinas próinflamatórias e regula a adesão celular. A galectina 3, ao contrário da 1, promove o crescimento e a proliferação celular e induz citocinas próinflamatórias (ERBACHER et al, 2009). Além do potencial das galectinas em participar da adesão célula-célula, célula-matriz e regulação do crescimento, elas estão envolvidas em processos patológicos como o câncer (DANGUY; CAMBY; KISS, 2002). Nesses casos, a expressão aumentada da galectina 1 favorece o crescimento tumoral e influencia o potencial metastático, pois regula vários eventos biológicos como a migração e adesão celular e angiogênese (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

2.2 Ácido Siálico e Tumor Cutâneo

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna potencialmente fatal com incidência crescente ao longo das últimas décadas (FERRARI JÚNIOR, et al, 2008), e que causa grande impacto na sociedade (DUNCAN, 2009), pois afeta pacientes com uma média de idade de 50 anos, e é por esta razão que o melanoma está entre os cânceres mais graves, quando avaliada a estimativa de vida (FERRARI JÚNIOR, et al, 2008).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2010, estima-se 5.930 novos casos de melanoma no Brasil, sendo 2.960 em homens e 2.970 em mulheres e a maioria destes na região sul, sendo que o Rio Grande do Sul tem a maior taxa bruta de incidência, estima-se 8,61 novos casos para cada 100.000 homens e 7,68 novos casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2009).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma podem ser genéticos ou ambientais, sendo que a exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV) solar é a causa ambiental de maior significância, principalmente a exposição nos primeiros 20 anos de vida (SOUZA et al, 2009). Indivíduos adultos com faixa etária de 30 a 70 anos tem uma maior predisposição para o melanoma, entretanto, todas as idades podem ser afetadas, confirmando a natureza multifatorial da malignidade (DOBEN; MACGILLIVRAY, 2009). A grande maioria dos melanomas surge na pele, mas também podem surgir em outros sítios de origem como, a mucosa oral e anogenital, esôfago, meninges e olhos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os melanócitos podem absorver a radiação UV e sobreviver a um estresse genotóxico considerável. E a pele, principal barreira para o ambiente externo, precisa dos melanócitos para fornecer fotoproteção e termorregulação através da produção de melanina. O grau de produção desse pigmento é conhecido como fototipo de pele (a cor da pele e facilidade de bronzeamento) e é o indicador mais útil do risco de câncer de pele humana na população em geral (LIN; FISHER, 2007).

O melanócito da epiderme humana apresenta uma relação simbiótica com os queratinócitos, onde um melanócito está associado com aproximadamente trinta e seis queratinócitos. Os queratinócitos podem controlar o crescimento dos melanócitos por meio de mecanismos, tais como, (i) comunicação extracelular através de fatores de crescimento parácrinos; (ii) comunicação intracelular via segundos mensageiros e transdução de sinal e (iii) comunicação intercelular juncional (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2005).

Os melanócitos normais se localizam na membrana basal da epiderme (KLOSE et al, 2006), cercado os queratinócitos através de processos dendríticos, e são os responsáveis pelos fenótipos tais como cor do olho, cabelo e pele, através da síntese de melanina (GODING, 2007). A melanina, produzida em vesículas intracelulares

especializadas, os melanossomas, é um pigmento complexo que desempenha um papel fundamental na fotoproteção da pele, absorvendo e dissipando a luz solar e reduzindo o oxigênio reativo (ORTOLANI-MACHADO; FREITAS; FARACO, 2009).

Sob condições normais, a homeostase determina se uma célula permanece inativa, prolifera, diferencia ou sofre apoptose. A desregulação da homeostase que causa alterações no DNA pode causar um distúrbio no equilíbrio dos melanócitos, levando ao desenvolvimento do melanoma (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2005). A expressão de moléculas (carboidratos) na superfície celular que regula as interações célula-célula também está associada com o desenvolvimento do melanoma (LI; HERLYN, 2000), sendo que a expressão anormal de carboidratos pode ser relacionada com a capacidade de confundir o sistema imune contra as células tumorais, assim como, pelo comportamento invasivo das células, favorecendo desta forma, a progressão do tumor (ROSETE et al, 2008).

O desenvolvimento do melanoma maligno é caracterizado por uma série de transições. É originado da proliferação celular anormal dos melanócitos, o que dá origem a um nevo melanocítico dentro da epiderme que pode apresentar vários graus de displasia (GAGGIOLI; SAHAI, 2007). O espalhamento inicial de melanócitos displásicos é quase sempre lateral e dentro ou muito próximo da epiderme, nessa fase o crescimento é radial (RGP do inglês: *radial growth phase*) e apresenta um bom prognóstico. No entanto, a próxima fase, fase de crescimento vertical (VGP do inglês: *vertical growth phase*), mostra pronunciada invasão na derme e é clinicamente mais perigosa. A passagem para a VGP está associada com o potencial metastático. As células penetram na membrana basal, ocorre um aumento da vascularização para que as células possam se espalhar para sítios distantes (metástases) (GAGGIOLI; SAHAI, 2007). As diferentes fases são demonstradas na Figura 7.

O termo metástase refere-se ao movimento de células, ou seja, migração de células cancerígenas para partes do corpo distantes do tumor primário. As metástases ocorrem em certos órgãos mais que outros, porque dependem da origem do tumor primário. Por exemplo, no melanoma a metástase ocorre preferencialmente para o cérebro, pulmão, fígado e pele, enquanto as células do câncer de próstata tendem a metastatizar para os ossos (MURAKAMI; CARDONES; HWANG, 2004).

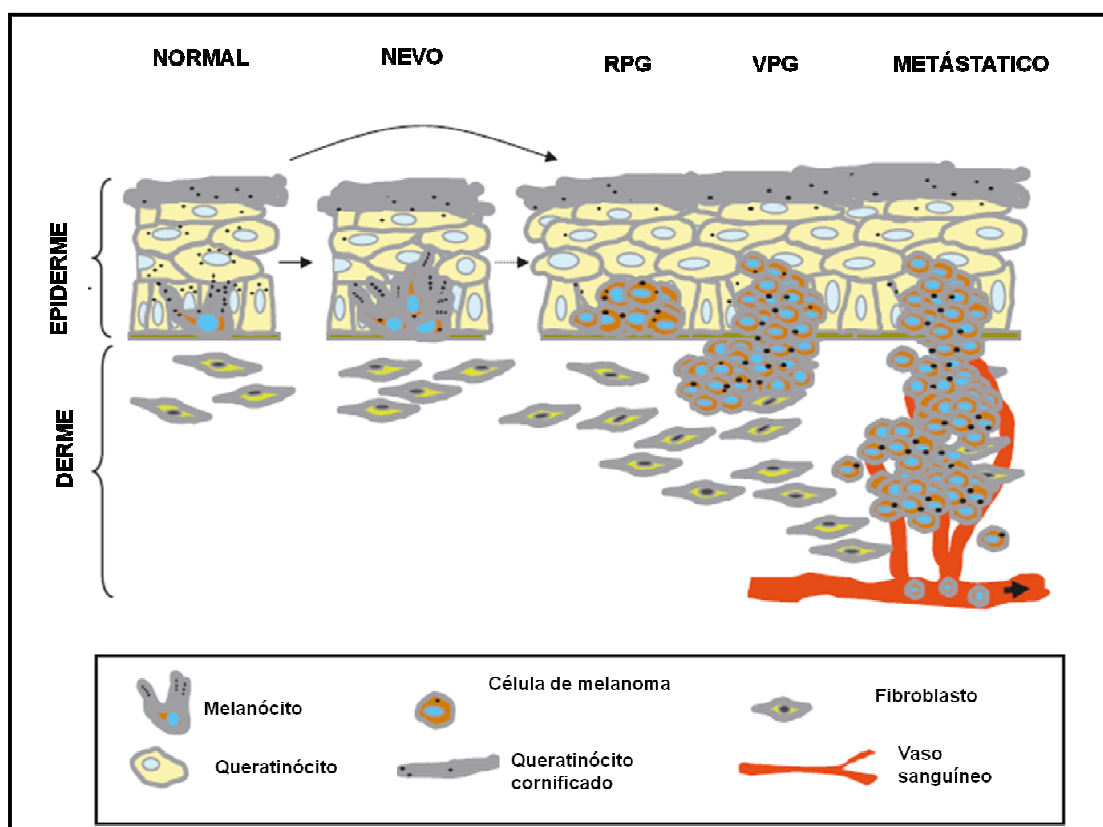


Figura 7. Desenvolvimento do melanoma metastático. Progressão de um melanócito para um melanoma maligno. O desenvolvimento do nevo é relativamente frequente, mas a transição de nevo para melanoma maligno é relativamente rara. A sequência de transformação demonstrada é: tecido normal, nevo e melanoma, este com três fases: RPG – fase de crescimento radial; VPG – fase de crescimento vertical e melanoma metastático (Adaptado de GAGGIOLI; SAHAI, 2007).

Para um tumor estabelecer uma doença distante são necessárias cinco etapas interdependentes: 1) transformação do tumor; 2) dissociação (separação e invasão local); 3) intravasamento e disseminação; 4) estase, adesão e extravasamento; e 5) proliferação e crescimento. A conclusão de todas as etapas em ordem sequencial é necessária para que a metástase realmente ocorra (NGUYEN, 2004).

A transformação do tumor, processo pelo qual as alterações genóticas e fenotípicas ocorrem, é um passo limitante no processo de metástase, ocorrem alterações básicas de funções até alterações avançadas que impedem as defesas imunes do hospedeiro. Embora muitos tumores são inicialmente monoclonais, as células que metastatizam diferem do tumor inicial porque adquirem adaptações especializadas que lhe conferem a capacidade metastática (NGUYEN, 2004).

As células malignas transformadas separam-se do tumor inicial para que ocorra o espalhamento para órgãos distantes. A dissociação é composta de dois processos, a degradação da matriz extracelular e a motilidade celular dirigida. A intravasação local progressiva permite a entrada das células tumorais na circulação sistêmica. Para ganhar a corrente circulatória e se disseminar, o tumor forma ligações com a circulação através da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). As células tumorais que estão na corrente circulatória parecem inofensivas, a menos que elas parem (estase e adesão) e saiam (extravasem) da circulação sistêmica. A saída ocorre através de pequenas lesões no endotélio ou quando as células chegam a finos capilares, como por exemplo, no pulmão. A regulação do crescimento em sítios secundários, assim como as variações do microambiente e as características do tumor determinam se a proliferação e o crescimento do tumor (metástase) irão ou não ocorrer (NGUYEN, 2004).

Vários tumores, assim como o melanoma, expressam AS e ácido polissialílico, um homopolímero linear de ligações α -2,8 e, um aumento dos níveis de AS parece estar correlacionado com o potencial metastático destes tumores (MÜNSTER-KÜHNEL et al, 2004). O AS tem sido fortemente implicado na agregação plaquetária mediada por células tumorais, na aderência de células endoteliais e matriz extracelular (ECM), migração, invasão e potencial metastático (CHANG et al, 2006).

Malykh e colaboradores (2001) sugerem que glicoconjugados sializados parecem estar envolvidos na biologia tumoral e que padrões de uma glicosilação alterada como, altas quantidades de ácido polissialílico nas moléculas de adesão de células neuronais (N-CAMs), aumento de ligações α 2,6 de ácido siálico com a galactose e a expressão de antígeno sialil-Tn são muito comuns em neoplasias humanas e animais.

As caderinas (E e N-caderina – epidermal e neuronal), glicoproteínas presentes na superfície das moléculas que promovem a adesão célula-célula, são cálcio-dependentes e estão relacionadas com o desenvolvimento do melanoma. A perda da E-caderina, que promove a adesão entre queratinócitos e melanócitos normais, e o aparecimento de N-caderina desempenha um papel fundamental na biologia no melanoma. A E-caderina é a molécula que regula a interação entre melanócitos e queratinócitos, desta forma, melanócitos que não expressam E-caderina não são

regulados pelos queratinócitos. A N-caderina é expressa nas células tumorais para que ocorra a adesão com N-caderinas, expressas em fibroblastos e células endoteliais, promovendo a adesão, migração e invasão das células tumorais (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001).

Quando são encontradas metástases, o prognóstico é ruim e as opções de tratamento são limitadas (DUNCAN, 2009). Mas quando é detectado precocemente o melanoma pode ser tratado com excisão, com grande margem de segurança, apresentando altas taxas de cura (MATZKE; BEAN; ACKERMAN, 2009). O diagnóstico do melanoma cutâneo primário em estágios iniciais é um desafio para os clínicos, pois está intimamente relacionado com a possibilidade de cura da doença (LANGLEY et al, 2007) e esse diagnóstico depende de um bom desempenho clínico por parte do médico (VERSTERGAARD; MENZIES, 2008).

Para melhorar a detecção precoce do melanoma várias estratégias vem sendo utilizadas, incluindo a educação dos pacientes sobre a importância da realização do auto-exame da pele, iniciando campanhas de rastreio em massa, criando clínicas especializadas em câncer de pele e desenvolvendo ferramentas de diagnóstico através de tecnologias avançadas (TERUSHKIN; HALPERN, 2009).

Atualmente, a realização do auto-exame na pele é o modo mais eficiente de detectar um melanoma precocemente, verificando o aparecimento de novas lesões (manchas) e a mudança de lesões já existentes. Entretanto, aproximadamente 6 % dos melanomas não apresentam as características ABCDs clássica (A: Assimetria; B: Bordas Irregulares; C: Cores Variadas; D: Diâmetro > 6 mm) e, desta forma, o diagnóstico é tardio (MATZKE; BEAN; ACKERMAN, 2009). Além disso, não existem ensaios moleculares para o diagnóstico diferencial, uma vez que os marcadores imunohistoquímicos (por exemplo, S100, HMB-45, MART-1, e MITF) tem pouca utilidade em distinguir os nevos de melanomas (KASHANI-SABET et al, 2009).

Segundo a literatura, quando se tem uma lesão suspeita, a indicação é a realização de uma biópsia. Se o melanoma é realmente encontrado, outros testes são necessários para determinar se existe a invasão de outras áreas do corpo, ou seja, metástases (ACS, 2009).

2.3 Ácido Siálico e HSV-1

Os herpesvirus pertencem a grande família *Herpesviridae*, são vírus DNA (ácido desoxirribonucléico) envelopados divididos em três subfamílias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae*, podendo infectar uma série de hospedeiros, como mamíferos, pássaros e répteis (KELLY et al, 2009), mas somente oito infectam humanos. Os herpesvirus humanos da subfamília dos *Alfaherpesvirus* são *herpes simplex vírus tipo 1 e 2* (HSV-1 e HSV-2) e vírus varicela zoster (VZV); os vírus da subfamília *Betaherpesvirus* são citomegalovirus (CMV) e *Herpesvirus humano 6 e 7* (HHV-6 e HHV-7); e os *gamaherpesvirus* são Epstein Barr (EBV) e *Herpesvirus humano 8* ou *Herpesvirus* do Sarcoma de Kaposi (HHV-8/ KSHV) (HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008).

O HSV é um DNA-vírus de grandes dimensões (150 - 250 nm) que apresenta quatro componentes básicos; a estrutura helicoidal de DNA em dupla hélice, envolvida por capsídeo icosaédrico com 100 a 110 nm de diâmetro circundado por substância amorfa (tegumento) e membrana lipídica mais externa (envelope). O envelope, que envolve o capsídeo, contém glicoproteínas que são projetadas e, desta forma fornecem determinantes antigênicos dos membros individuais dos grupos (MACKIE, 2003). Um modelo da estrutura viral é demonstrado na Figura 8.

A transmissão do HSV ocorre através do contato das superfícies mucosas ou das soluções de continuidade da pele com secreções infectadas, onde o vírus encontra uma célula, na qual ele se liga para promover a sua entrada na mesma (DECMAN et al, 2005). A ligação do vírus na célula do hospedeiro ocorre através da ligação das glicoproteínas do envelope viral (gB, gC, gD, gH, gL) com receptores da superfície da célula (mediador de entrada de herpesvirus (HVEM), nectina 1 e nectina 2 (SPEAR, 2004). O estudo de Teuton e Brandt (2007) mostra que a gC, gD e gH são sializadas, e evidenciam essas glicoproteínas em manter a infectividade viral.

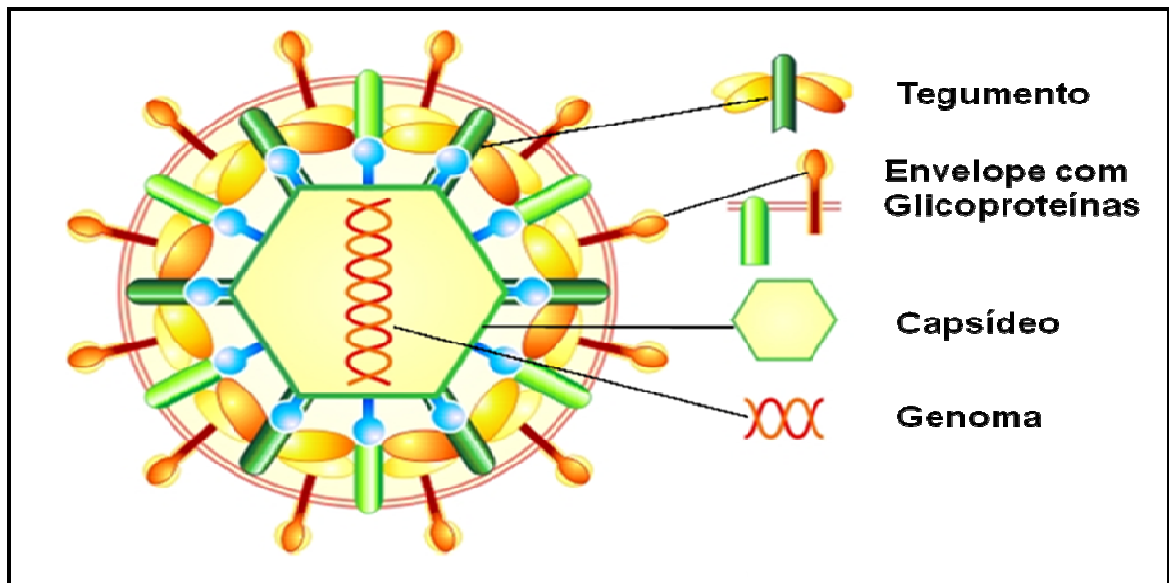


Figura 8. Estrutura viral do *Herpesvirus*. O víon é composto por um capsídeo icosaédrico que armazena o núcleo com o material genético. O capsídeo é cercado por proteínas do tegumento amórfico e um envelope onde são encontradas as glicoproteínas (Adaptado de LEE, 2008).

A infecção do HSV é iniciada pela ligação da glicoproteína viral C (gC) ou glicoproteína B (gB) com o sulfato de heparano presente na superfície das glicoproteínas da célula hospedeira (TEUTON; BRANDT, 2007). Depois de ser adsorvido na célula hospedeira, a gD pode se ligar a um dos receptores celulares, provocando a fusão do envelope viral com a membrana da célula e a entrada do capsídeo e do tegumento dentro do citoplasma. A fusão da membrana com o envelope requer a ação de outras glicoproteínas virais, gB e o heterodímero gH-gL (SPEAR, 2004). O processo de infecção é demonstrado na Figura 9.

A replicação viral inicia na epiderme, após a ligação do vírus com a membrana da célula do hospedeiro (LUPI, 2000), o espalhamento da infecção não ocorre através da via hematogênica ou linfática e sim através do contato célula-célula (SPEAR, 2004).

Todos os membros da família *Herpesviridae* possuem a habilidade de estabelecer infecção latente nas células do hospedeiro, sendo que o *Herpes Simplex Virus* tipo 1 e 2 e o vírus da varicela zoster (todos da subfamília Alfa) estabelecem latência em nervos (KELLY et al, 2009). Durante a infecção primária, o HSV-1 invade os nervos da superfície da mucosa infectada. Os vírus são transportados por fluxo axonal retrogrado até o núcleo neuronal do gânglio sensorial (DECMAN et al, 2005).

Após um breve período de replicação em algumas células nervosas o vírus estabelece uma infecção latente. O genoma funcional viral é mantido no núcleo das células nervosas sem produção viral (DECMAN et al, 2005). Geralmente a infecção latente é estabelecida nos gânglios trigeminal (HSV-1), cervical, ou lombossacral (HSV-2) (SIMMONS, 2002).

A latência, pelo menos em humanos, não é mantida indefinidamente. Assim, em algumas pessoas a ocorrência da reativação é responsável por episódios, nos quais as manifestações clínicas surgem novamente (lesões), já em outras, a manifestação é clinicamente assintomática ou subclínica (DAHESHIA; FELDMAN, ROUSE, 1998; KIMBERLIN; WHITLEY, 2005). A reativação faz com que o HSV-1 seja transportado por fluxo axonal anterógrado até os sítios periféricos (DECMAN et al, 2005). Uma grande variedade de estímulos pode ser capaz de desencadear uma reativação. Em modelos experimentais, estímulos como exposições a altas temperaturas e a luz UV, irritação, imunossupressão podem levar a reativação das lesões (DAHESHIA; FELDMAN, ROUSE, 1998).

A resposta imune contra o HSV é complexa e multifatorial, pois o vírus tem muitos mecanismos de escape do sistema imune (CHEW; TAYLOR, MOSSMAN, 2009). Esses mecanismos incluem: (1) ligação e inativação de moléculas do complemento pela gC, presente no envelope viral; (2) ligação e inativação de imunoglobulinas pelas glicoproteínas virais (gE e gI), presentes no envelope viral; (3) escape da apresentação de antígenos virais do complexo maior de histocompatibilidade (MHC); (4) inibição da maturação de células dendríticas e (5) inibição da indução e atividade de interferons tipo I (WAKIMOTO et al, 2003).

A resposta do organismo hospedeiro contra o HSV envolve mecanismos da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa. O sistema imune inato é responsável por limitar a propagação do vírus e a disseminação inicial célula-célula (NOVAK; PENG, 2005). De acordo com Reske (2009) o sistema imunológico inato é considerado como uma linha de defesa simples e inespecífica, entretanto, estudos sugerem que apesar de sua inespecificidade, a resposta imune inata pode definir se ocorre ou não a infecção.

A resposta imune inata contra o HSV-1 inclui a produção e a secreção de uma variedade de citocinas e quimiocinas, fatores importantes na resposta imune e na proteção contra infecções virais, pois são responsáveis pela ação das células imunes inatas que atuam limitando a infecção inicial do tecido, anulando a propagação do vírus, e iniciando a apresentação de antígenos para ativar linfócitos T e B (RESKE, 2009).

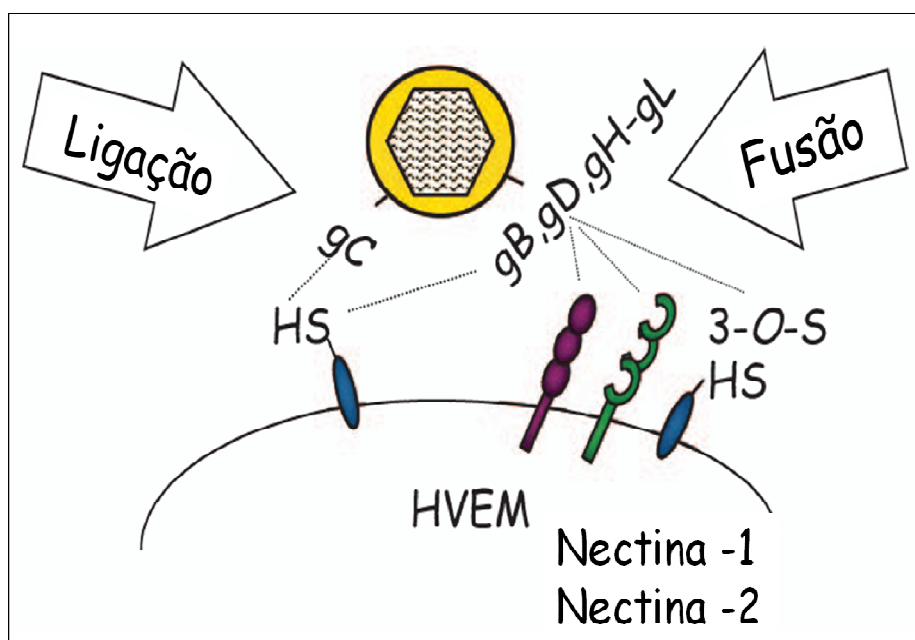


Figura 9. Ligação e fusão do vírus (HSV-1) com a célula hospedeira. A infecção é iniciada pela ligação da glicoproteína viral C (gC) ou glicoproteína B (gB) com o sulfato de heparano presente na superfície das glicoproteínas da célula hospedeira. Após, ocorre a fusão da membrana da célula hospedeira com o envelope viral através da gB e o heterodímero gH-gL. Legenda: HS – sulfato de heparano; HVEM – mediador de entrada de herpesvírus; 3-O-S HS – sítios específicos de sulfato de heparano gerados por 3-O-sulfotransferases; gC, gB, gD, gH-gL – glicoproteínas virais (Adaptado de SPEAR, 2004).

In vivo, vários tipos de células contribuem para a resposta imune inata contra o HSV. As células *Natural Killer* (NK) desempenham um papel importante tanto na produção de citocinas, como no reconhecimento e na morte de células infectadas pelo vírus. Além disso, o papel das células dendríticas plasmacitóides (pDCs) na resposta anti-HSV tem sido descrita, pois elas são as principais produtoras de IFN α (CHEW; TAYLOR, MOSSMAN, 2009). Os macrófagos agem na defesa inicial como células fagocitárias e como células apresentadoras de antígenos. Macrófagos não infectados, presentes no local da infecção, são responsáveis pela secreção de fator de necrose

tumoral α (TNF α) e IFN tipo I, sendo o TNF α o mediador para o recrutamento de células para o local da infecção (RESKE, 2009).

A imunidade inata possui duas funções primárias, sendo a primeira destruir microrganismos patogênicos e a segunda, determinar o tipo e a iniciação da resposta imune adaptativa. A resposta imune inata contra o HSV inclui: (1) ativação da cascata do complemento; (2) ativação de macrófagos, recrutamento, ativação e maturação de células NK, precursores de DC e (3) produção e secreção de uma variedade de citocinas e quimiocinas que conduzem as atividades citadas acima. O objetivo dessa resposta é limitar a infecção inicial do tecido, evitando a propagação viral e, iniciando a maturação de células dendríticas que então ativam linfócitos T específicos e a maturação de linfócitos B (WAKIMOTO et al, 2003).

Apesar da resposta primária, composta principalmente pela ação das células dendríticas e das células NK, o vírus escapa dessa resposta inicial e chega aos nervos, onde essas células não podem atuar. Nesse estágio, inicia a ação da resposta adaptativa, caracterizada por linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (NANDAKUMAR et al, 2008). A resposta imune adquirida é antígeno específica oferecendo uma proteção mais eficiente contra os patógenos e proteção contra a re-exposição ao mesmo patógeno (NOVAK; PENG, 2005; RESKE, 2009).

Anticorpos e células T CD8⁺ específicas para HSV e células infectadas sugerem uma função importante para a resposta imune adaptativa na eliminação viral (RESKE, 2009). Apesar da proteção dos anticorpos, a imunidade celular tem um papel crucial, especificamente células T CD8⁺ contribuem para a manutenção da latência e da propagação viral (CHEW; TAYLOR, MOSSMAN, 2009).

O *Herpes Simplex Virus* tem a capacidade de persistir no hospedeiro (infecção latente), e, desta forma a lesão pode ser reativada (MENDELSON et al, 2006) visto que nenhuma das alternativas antivirais disponíveis atualmente eliminam a infecção primária e a reativação (TEUTON; BRANDT, 2007).

O HSV-1 apresenta manifestações ulcerativas mais frequentes na mucosa oral (TEUTON; BRANDT, 2007), já o HSV-2 causa infecções genitais (HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008). O *Herpes Simplex Virus 1 e 2* são patógenos humanos (MÜNSTER-KÜHNEL et al, 2004), que apresentam manifestações clínicas geralmente

auto-limitadas em indivíduos imunocompetentes com exceção de crianças e idosos (TEUTON; BRANDT, 2007). As lesões causadas pelo HSV-1 podem variar entre lesões circunscritas a uma região da pele e lábios, gengivoestomatite primária, infecção ocular (queratite herpética) (FATAHZADEH; SCHWATRZ, 2007). No entanto, podem ocorrer doenças graves, incluindo cegueira e HSV neonatal (TEUTON; BRANDT, 2007). As manifestações clínicas das infecções por HSV dependem da porta de entrada no organismo, da condição imune do hospedeiro e se a infecção é primária ou recorrente (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

O manejo dessas manifestações exige o reconhecimento rápido e preciso dos patógenos causadores da doença, sendo que os testes diagnósticos usados incluem teste de Tzanck, histopatologia, imunofluorescência, microscopia eletrônica, detecção de antígeno e anticorpo, cultura viral e reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem sido utilizada para confirmar o diagnóstico clínico (OZCAN et al, 2007).

O padrão ouro para detecção de HSV é a cultura viral, este teste é 100 % específico para HSV-1 e HSV-2, mas a sensibilidade depende do estágio da lesão e do tempo de coleta da amostra e também pode variar de 75 % na primoinfecção à 50 % nas recorrências. Neste teste são visualizados efeitos citopáticos depois de 2 a 3 dias de cultivo, demonstrando células alargadas, refrativas e arredondadas que se desprendem da garrafa de cultura. Ocasionalmente podem ser observadas células gigantes (SINGH; PREIKSAITIS; ROMANOWSKI, 2005).

Uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o DNA do HSV no líquido cefalorraquidiano (LCR) é mais rápido e mais sensível que a cultura viral e é o teste de diagnóstico de escolha para a encefalite causada por herpesvirus e também pode ser usado para rapidamente confirmar infecções em outros locais (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

As infecções por HSV podem ter tratamentos paliativos, sendo que o tratamento de infecções primárias orais e genitais em pacientes saudáveis é usualmente feito com aciclovir, valaciclovir e famciclovir oralmente por 7 a 10 dias. Já o tratamento para doença recorrente pode ser episódico (tratamento ao primeiro sintoma) por 1 a 5 dias afim de diminuir os sintomas ou supressivo (diário) para prevenir recorrências. O tratamento de doenças severas como herpes neonatal ou encefalite pode ser feito com

aciclovir intravenoso (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

2.4 Marcadores

De acordo com Sacks e colaboradores (2004), biomarcador é uma característica medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas frente a uma intervenção terapêutica.

Os marcadores bioquímicos em oncologia são moléculas que podem ser detectadas em maior ou menor quantidade do que o normal no sangue, urina ou tecidos do corpo de pessoas com certos tipos de câncer. Um marcador tumoral pode ser produzido pelo próprio tumor, pelo tecido normal circundante, em resposta à presença do tumor ou de metástases (VOORZANGER-ROUSSELOT; GARNERO, 2007).

Um marcador tumoral pode ser definido como uma molécula que indica a provável presença de um câncer ou que fornece informações sobre o comportamento do mesmo. Os marcadores tumorais são potencialmente úteis para detectar precocemente a malignidade, auxiliar no diagnóstico de malignidade, determinar o prognóstico do câncer, prever a eficácia terapêutica, monitoramento após remoção cirúrgica do tumor primário e monitoramento de malignidade avançada (DUFFY, 2007).

Alguns marcadores sorológicos como a proteína S100 e atividade inibitória de melanoma (MIA do inglês *melanoma inhibitory activity*) foram detectados e estão sendo aplicados em pacientes com melanoma. No entanto, eles não provaram ser completamente confiáveis para detecção da doença residual mínima e de sinais precoces de recorrência. Mas por enquanto, mesmo sendo pouco confiáveis, tem sido relatado que são os marcadores séricos mais sensíveis e, portanto, são atualmente utilizados no acompanhamento de pacientes com melanoma (HOFMANN et al, 2009).

O diagnóstico de infecções herpéticas em pacientes com sintomas clássicos é realizado através da coleta de material da lesão com auxílio de um swab, onde a cultura viral e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são os testes recomendados. Se as lesões típicas não estiverem presentes, os testes sorológicos podem ser úteis (STRAND, 2007).

Dentre os testes sorológicos que detectam anticorpos estão o ensaio de imunofluorescência, Western Blot e ELISA. O Western Blot para glicoproteína viral G (gG) é considerado padrão ouro, mas é demorado e o ELISA é menos sensível (BURBELO et al, 2009).

2.5 Métodos para Dosagem de Ácido Siálico

O ácido siálico tem sido utilizado como um marcador de diversos processos inflamatórios. Estudos realizados por Taniuchi e colaboradores (1981) demonstram que níveis elevados de AS no soro se deve as glicoproteínas sializadas envolvidas na fase aguda de processos inflamatórios, tais como glicoproteína alfa-1, haptoglobina, proteína C-reativa, entre outras.

O AS também tem sido utilizado como um marcador tumoral em alguns tipos de câncer, incluindo próstata, ovário, mama, cólon e melanoma (CROOK, 1993), justificando o grande interesse na determinação do AS (SPIRIDAKI; SISKOS, 1996). Na literatura são reportados diversos métodos para a determinação da concentração de AS em glicoconjugados. A determinação da concentração pode ser realizada por vários métodos, entre eles podemos citar: colorimétrico (SVENNERHOLM, 1957; WARREN, 1959), fluorimétrico (MATSUNO; SUZUKI, 2008), enzimático (TANIUCHI et al, 1981) e cromatográfico (DIAMANTOPOULOU et al, 1999).

Os métodos enzimáticos para a determinação de AS no soro são simples e específicos, mas podem não identificar ou subestimar a concentração total. Já os métodos cromatográficos tem alto custo, como e o caso da cromatografia gasosa com detector de massa e, não permite a aplicação em pequenos laboratórios (SPIRIDAKI; SISKOS, 1996). Na maioria das metodologias fluorimétricas ocorrem interferências, como reações cruzadas devido à baixa especificidade com o AS (CROOK, 1993).

Os métodos colorimétricos mais utilizados são o resorcinol e o tiobarbitúrico (CROOK, 1993) e entre esses, o mais utilizado é o periodato/tiobarbitúrico (BHAVANANDAN; RINGLER; GOWDA, 1998), sendo específico e sensível (JOURDIAN; DEAN; ROSEMAN, 1971).

O método colorimétrico periodato/tiobarbitúrico para a dosagem do AS envolve a

hidrólise das ligações sialosídicas na presença de um ácido forte, formando um pré-cromógeno (MATOO; ROSEMAN, 1997), e, após a adição do ácido tiobarbitúrico, torna-se um cromóforo de cor vermelha que absorve em um comprimento de onda de 549 nm (ROMERO et al, 1997). Para a realização da leitura da absorbância, a solução final corada é extraída com ciclohexanona (WARREN, 1959).

Wongkham e colaboradores (2003), através da metodologia periodato/tiobarbitúrico, determinaram a quantidade de AS no soro e em amostras do tumor de pacientes com câncer das vias biliares, onde o conteúdo de AS no tumor foi de 59,4 nmol/mg de proteína, significativamente maior que 34,8 nmol/mg de proteína encontrado no soro. Valores séricos maiores que 2,33 mmol/L foram considerados anormais.

Akçay e colaboradores (2001) também utilizaram a mesma metodologia para determinar a quantidade de AS no soro de pacientes com câncer de laringe e pacientes normais, sendo que a quantidade mais baixa foi encontrada no grupo controle com média de 519 µg/mL e a mais alta em pacientes com doença em estágio IV com média de 928,6 µg/mL (foram analisados controles, estágio II (665,2 µg/mL), III (807,1 µg/mL), e IV (928,6 µg/mL)), neste estudo, o ácido siálico pode ser relacionado com o estágio da doença.

Castro e colaboradores (2009) utilizaram o método tiobarbitúrico para medir o nível sérico de AS em pacientes com câncer de pulmão, comparando com doenças pulmonares obstrutivas, asma e controle. Além do AS livre no soro, eles determinaram a quantidade de AS total após hidrólise ácida da amostra e a quantidade de AS ligado a glicoproteínas a partir da diferença entre AS total e AS livre. Os resultados obtidos demonstraram que em pacientes com câncer de pulmão, todas as formas de AS estavam aumentadas. Já nos outros grupos, somente a fração de AS livre não foi significativamente aumentada em pacientes com doenças benignas e desta forma concluem que o AS total e o ligado a glicoproteínas são marcadores altamente sensíveis para câncer de pulmão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Materiais

- Ácido Fosfórico Orto 85 % PA – Nuclear;
- Ácido Tiobarbitúrico – Sigma Aldrich;
- Ácido Sulfúrico – F. MAIA;
- Ácido Dimetilsulfóxido – Nuclear;
- Acrodisc estéril – Millex;
- Arsenito de Sódio – Vetec;
- Corante Azul Tripán 0,4 % – GIBCO;
- Ciclo-hexanona – Vetec;
- Cloreto de Potássio – Vetec;
- Cloreto de Sódio – Nuclear;
- DMEM (Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco) – GIBCO;
- Fosfato de Potássio monobásico anidro – Nuclear;
- Fosfato de Sódio bibásico anidro – Nuclear;
- Garrafas para cultura de células – TPP;
- Sal Sulfato de Gentamicina – Sigma Aldrich;
- Ácido N-acetilneuramínico – Sigma Aldrich;
- Periodato de sódio (META) – Nuclear;
- Placas para cultura de células com poços de fundo chato – TPP;
- Sistema de filtração à vácuo – TPP;
- Soro fetal bovino (SFB) – GIBCO;
- Sulfato de Sódio Anidro – Vetec;
- Tripsina 0,5 % EDTA – GIBCO;
- Tubos cônicos para centrifugação 15 e 50 mL – TPP;
- Xilasina – Syntec;
- Quetamina – Syntec.

3.1.2 Equipamentos

- Agitador de tubos - P56 – Phoenix;
- Autoclave Vertical – Phoenix;
- Balança analítica AX 200 – Shimadzu;
- Capela de fluxo laminar vertical – Pachane Pa 310;
- Banho Maria – Novatécnica;
- Câmara de Neubauer – Optik Labor;
- Centrífuga refrigerada – NT 815 Novatécnica;
- Bomba à vácuo – Primatec;
- Espectrofotômetro UV-VIS 1650 PC – Shimadzu;
- Estufa de CO₂ – Laboven;
- Freezer -80°C – Sanyo;
- Máquina de gelo – Eurfrigor;
- Microcentrífuga refrigerada – NT 805 Novatécnica;
- Microscópio invertido – Nikon Eclipse TS100;
- Microscópio óptico – Olympus CX 31.

3.2 ANIMAIS

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram utilizados para o experimento de melanoma e a linhagem BALB/c foi utilizada para o experimento com vírus. Os animais tinham idade entre 8 e 12 semanas e peso entre 25 e 30 gramas. Foram adquiridos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e mantidos no Biotério do Centro Universitário Franciscano, acondicionados em gaiolas com tampa de aço inoxidável (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) e maravalha, água e comida *ad libitum*, em ambiente com temperatura, umidade e ciclo de claro-escuro controlados.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Animais da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus Erechim e aprovado sob o número 047/PGA/09, conforme ANEXO I. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas para experimentação animal elaboradas pela Sociedade Brasileira de

Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

3.3 CÉLULAS E VÍRUS

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas linhagens de células tumorais de melanoma murino B16F10, células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano) e *Herpes Simplex Virus* 1 linhagem KOS com uma titulação de 10^5 PFU/mL provenientes da Universidade do Tennessee - EUA. Todos os procedimentos com células foram realizados em capela de fluxo laminar (Pachane Pa 310), em ambiente estéril.

3.4 PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA E REAGENTES.

3.4.1 Meio DMEM suplementado com 10 % SFB

O meio DMEM foi suplementado com 10 % de SFB, previamente desativado e gentamicina (50 mg/L) afim de evitar contaminações. A mistura foi submetida à filtração a vácuo com o auxílio de uma bomba. O meio estéril foi identificado e armazenado à 8°C até o momento do uso. A desativação do soro bovino fetal foi realizada em banho-maria, primeiramente à 37°C até o descongelamento, em seguida foi mantido por 15 minutos à 37°C. A solução foi mantida à 56°C por um período de 30 minutos com inversões a cada 10 minutos, permanecendo após, mais 30 minutos à temperatura ambiente. Após a desativação, alíquotas de 50 mL da solução foram transferidas para tubos do tipo falcon e congeladas à -20°C, até o momento do uso.

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Manutenção das Culturas

As células foram mantidas em meio DMEM (Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10 % de SFB (Soro Fetal Bovino), contendo 50 mg/L de gentamicina e incubadas até formação de monocamada confluyente em estufa (Laboven) à 37°C com 5 % de CO₂, umidade de 95 % e pH entre 7,2 e 7,5.

No momento em que as células atingiam a confluência eram lavadas com tripsina, para descolar da superfície da garrafa, centrifugadas com meio de cultura e recultivadas com DMEM, suplementado com 10 % de SFB.

3.5.2 Contagem de Células

Para a realização da contagem das células utilizadas nesse estudo, após a centrifugação e homogeneização do pellet, foi colocado 50 µL da suspensão de células e 50 µL de azul tripan, sendo esta mistura homogeneizada, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico (Nikon) com aumento de 200x.

3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS VERO E B16F10

Para a contagem de células Vero e B16F10, 1×10^3 células foram incubadas em cada poço de uma placa com 24 poços com 2 mL de meio DMEM, suplementado com 10 % de SFB. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5 % de CO₂ por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada período de incubação, as células foram desprendidas dos poços com o auxílio de uma pipeta automática com uma ponteira. As células desprendidas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga, submetidas a centrifugação e o procedimento de contagem foi realizado conforme descrito no item 3.5.2. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

3.7 INDUÇÃO DO TUMOR EM CAMUNDONGOS C57BL/6 COM CÉLULAS B16F10

O modelo de melanoma murino em camundongos C57BL/6 tem sido utilizado porque as células B16F10 são cultivadas em laboratório, crescem rapidamente e são facilmente transplantadas em animais, servindo para estudos da fisiopatologia e metástases do câncer de pele (JUNQUEIRA JR., 1997; JUNQUEIRA JR., 2005).

Como existem vários trabalhos que relacionam a concentração de ácido siálico nos modelos de metástase em camundongos C57BL/6 (LEYON; LINI; KUTAN, 2005; CHANG et al, 2006), neste trabalho não foram avaliadas a presença de metástases, modelo no qual as células B16F10 são administradas por via intravenosa, na veia

caudal dos animais (LEYON; LINI; KUTAN, 2005). A concentração de AS foi determinada no início do processo tumoral.

No estudo, os camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos em 3 grupos de 5 animais (n=5). O primeiro grupo foi tratado com 2×10^5 células B16F10 em 100 μ L de meio DMEM. O segundo grupo foi tratado com 2×10^5 células Vero em 100 μ L de meio DMEM e o terceiro grupo foi considerado como controle.

Os animais do primeiro e do segundo grupo foram anestesiados com quetamina/xilasina (21 μ L de quetamina; 4,5 μ L de xilasina e 74,5 μ L de PBS estéril), permitindo a depilação de parte das duas coxas para a administração das células. As células foram administradas por via subcutânea com seringa e agulha de insulina.

Todos os animais foram observados diariamente e as coletas de sangue de todos os grupos foram realizadas no primeiro, quarto, oitavo e décimo quinto dia após a indução do tumor e a administração de células Vero. Ao final dos experimentos com células Vero e B16F10 os animais foram sacrificados e as coxas dos mesmos foram retiradas com auxílio de um bisturi para a análise morfológica e histológica do tumor e controle (Vero). As amostras retiradas, após a análise externa e da obtenção das imagens, foram fixadas em formol tamponado 10 % por 24 horas e encaminhadas para processamento histológico no laboratório de Patologia da Universidade de Santa Maria (UFSM). Os cortes histológicos foram submetidos à coloração por Hematoxilina – Eosina e analisados por microscopia de luz no mesmo laboratório.

A comparação morfológica da coxa dos animais que receberam os dois tipos de células foi realizada para avaliar o potencial tumorigênico das células B16F10 e verificar a diferença no comportamento das células quando administradas *in vivo*. As células Vero foram utilizadas como controle, por serem não tumorais.

3.8 INFECÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS BALB/c COM HSV-1

Os camundongos da linhagem BALB/c foram divididos em 2 grupos de 6 animais (n=6). O primeiro grupo foi tratado com 100 μ L de 10^2 PFU (Unidade Formadora de Placa) de vírus em PBS (Salina Tamponada com Fosfato) estéril e administrados por via intraperitoneal com seringa e agulha de insulina. O segundo grupo não recebeu

tratamento e foi considerado como controle.

Os animais foram acompanhados diariamente e as coletas de sangue foram realizadas no primeiro, quarto, oitavo e décimo quinto dia após o início do experimento, pois segundo Prabhakaran e colaboradores (2005), o décimo quarto dia é o pico da infecção herpética.

Em um outro experimento, camundongos da linhagem BALB/c foram divididos em 2 grupos de 6 animais. O primeiro grupo foi tratado com 100 μ L de 10^2 PFU de vírus em PBS estéril e administrados por via intraperitoneal com seringa e agulha de insulina. O segundo grupo não recebeu tratamento e foi considerado como controle. No grupo tratado foram realizadas coletas de sangue 30, 60, 120 e 1440 minutos após a infecção e no grupo controle apenas uma coleta foi realizada.

3.9 COLETAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas com uma pipeta Pasteur através de punção venosa do plexo venoso retro orbital dos animais e as quantidades variavam entre 100 e 300 μ L. Após todas as coletas o soro foi separado por microcentrifugação, à 1500 RPM (rotações por minuto) por 12 minutos, e armazenado a -20°C , até o momento da análise. Após o décimo quinto dia, todos os animais, tanto do experimento com melanoma como com vírus, foram sacrificados por deslocamento cervical. O mesmo sacrifício foi realizado para os animais do experimento com vírus.

3.10 DOSAGENS DO ÁCIDO SIÁLICO

A dosagem do AS foi realizada segundo a técnica de Warren (1959) com algumas modificações.

3.10.1 Preparação dos Reagentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION)

3.10.1.1 Reagente Periodato

Foram pesados 4,28 g de Meta-periodato de sódio e colocado em um béquer, em seguida foram adicionados 38 mL de água destilada. O periodato foi dissolvido por aquecimento. Após completa dissolução, foi mantida a temperatura ambiente até seu resfriamento e então adicionou-se 62 mL de ácido ortofosfórico 85 %. A mistura homogeneizada foi armazenada em frasco âmbar, protegida da luz e mantida a temperatura ambiente.

3.10.1.2 Reagente Arsenito

Foram pesados 10 g de meta arsenito de sódio, 7,1 g de sulfato de sódio anidro e colocado em um béquer, em seguida foram adicionados 100 mL de água destilada. A mistura foi dissolvida por aquecimento. Após a dissolução, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e então foram adicionados 0,3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A solução final foi transferida para um frasco do tipo duran e mantida a temperatura ambiente.

3.10.1.3 Reagente Ácido Tiobarbitúrico

Foram pesados 35,5 g de sulfato de sódio anidro, 3 g de ácido tiobarbitúrico e colocado em um béquer. A seguir foram adicionados 500 mL de água destilada. A dissolução ocorreu um banho fervente e após o resfriamento a solução foi mantida a temperatura ambiente em frasco do tipo duran.

3.10.2 CURVA ANALÍTICA

Para construção da curva analítica foi pesado 154,75 mg de Ácido N-Acetilneuramínico, sendo o volume completado para 25 mL com água destilada em um

balão volumétrico finalizando em uma concentração de 2 mM. A partir desta solução padrão, a curva analítica foi construída nas concentrações de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mM (SPYRIDAKI; SISKOS, 1996).

As amostras foram analisadas por espectroscopia na região do visível em espectrofotômetro (Shimadzu). As leituras das absorbâncias dessas soluções foram efetuadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, no comprimento de onda de 549 nm. O ajuste do zero foi realizado com água destilada. O procedimento foi realizado em triplicata. Na tabela 2 encontram-se as diluições e as concentrações finais de Ácido N- Acetilneuramínico empregadas na curva analítica.

As absorbâncias médias, correspondentes a três determinações para cada concentração de Ácido N-Acetilneuramínico, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (mM/mL) no eixo das abscissas.

Tabela 2. Concentração referente à curva analítica do Ácido N- Acetilneuramínico, determinada por espectrofotometria na região do visível, no comprimento de onda de 549 nm. As concentrações finais encontram-se expressas em mM/mL.

Balão (10 mL)	Solução padrão (mL)	Diluyente (mL)	Concentração (mM/mL)
1	0,0625	9,9375	0,0125
2	0,1250	9,8750	0,025
3	0,2500	9,7500	0,05
4	0,5000	9,5000	0,1
5	1,0000	9,0000	0,2
6	2,0000	8,0000	0,4
7	4,0000	6,0000	0,8

A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Os valores experimentais foram tratados estatisticamente, através da análise de variância - ANOVA.

3.10.3 DOSAGEM DO ÁCIDO SIÁLICO

Em uma estante foram colocados tubos de ensaio referentes ao número de amostras que foram analisadas. Primeiramente foram pipetados 200 µL da amostra, em seguida, 100 µL da solução de periodato. Os tubos foram agitados e deixados por 30

minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente arsenito em cada um dos tubos, os quais foram agitados até o desaparecimento da cor marrom amarelada. Foram adicionados 3 mL do reagente ácido tiobarbitúrico em cada amostra e os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 15 minutos, retirados e colocados em banho de gelo por 5 minutos. Após o resfriamento, alíquotas de 2 mL foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ciclo-hexanona. Os tubos foram agitados e centrifugados por 5 minutos a 2000 RPM. A fase superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta e transferida para cubeta de quartzo a fim de efetuar leitura da absorbância a 549 nm em espectrofotômetro. A água foi usada como branco para calibrar o aparelho.

A concentração de AS foi então calculada por interpolação de valores de absorbância na curva de calibração obtida com diluição seriada.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão da média. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do software StateSoft® (StateSoft. Software, 1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de Calibração do ácido siálico

A Tabela 3 apresenta as absorvâncias, média, Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR) correspondente à concentração de AS relativas a cada uma das diluições do padrão.

Tabela 3. Valores referentes às absorvâncias, média \pm Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR) para a construção da curva de calibração do AS (Neu5Ac) por espectrofotometria na região do visível a 549 nm (n=3).

CONCENTRAÇÃO (mM/mL)	ABSORVÂNCIAS			MÉDIA \pm DP	DPR
0,0125	0,072	0,065	0,054	0,063667 \pm 0,0090	14,25200
0,025	0,095	0,068	0,086	0,083000 \pm 0,0137	16,56353
0,05	0,161	0,103	0,169	0,144333 \pm 0,0360	24,95509
0,1	0,312	0,268	0,300	0,293333 \pm 0,0227	7,753965
0,2	0,528	0,532	0,582	0,547333 \pm 0,0300	5,497337
0,4	1,086	1,029	1,123	1,079333 \pm 0,0473	4,387271
0,8	2,107	2,150	2,128	2,128333 \pm 0,0215	1,010271

DP = Desvio Padrão; DPR = Desvio Padrão Relativo.

A Figura 10 apresenta a curva de calibração e a equação da reta, sendo as mesmas obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para o AS.

A equação da reta para o método foi: $y = 2,6339x + 0,0226$; onde x é a concentração em mM/mL e y a absorvância, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9999. A curva de calibração do AS (Figura 10) apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), não havendo desvio significativo da linearidade ($p > 0,05$). De acordo com os resultados, os dados mostram que a curva de calibração pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa de AS, conferindo desta forma, a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

Na Tabela 4 encontram-se descritos os valores obtidos, tratados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA).

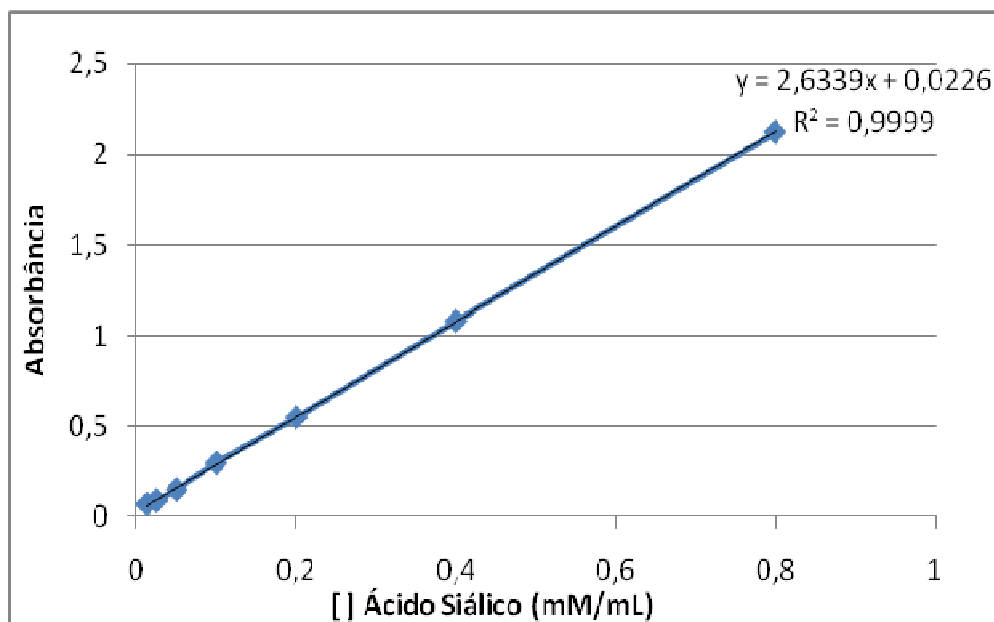


Figura 10– Representação gráfica da curva de calibração do Ácido Siálico, obtida por espectrofotometria na região do visível, $\lambda = 549 \text{ nm}$, ($n=3$).

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) correspondente as absorbâncias obtidas na determinação da curva de calibração do Ácido Siálico.

FONTES DE VARIACÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Entre amostras	4	0,4837767	0,1209442	121,29457*	4,53
Regressão linear	1	0,4830194	0,4830194	484,4188*	5,99
Desvio de linearidade	3	0,0007573	0,0002524	0,25316**	4,76
Resíduo	6	0,0059827	0,0009971		
Total	14	0,489759333			

* Significativo para $p < 0,05$; ** Não significativo para $p > 0,05$; gl: grau de liberdade.

4.2 Contagem das células B16F10 e células Vero *in vitro*

A Figura 11 mostra os resultados obtidos após a contagem das células em cultura, onde é observado que o número de células B16F10 foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) após 24, 72 e 96 horas quando comparado ao número de células Vero. No período de 48 horas não houve diferença significativa.

Após 24 horas de incubação o número de células B16F10 foi de $5,66 \times 10^3$ células/ 100 μL e o de Vero foi de 3×10^3 células/ 100 μL . Em 48 horas o número de células B16F10 foi de $14,33 \times 10^3$ células/ 100 μL e o de Vero $13,33 \times 10^3$ células/ 100 μL ,

nas 72 horas o número de células B16F10 foi de $44,66 \times 10^3$ células/ 100 μ L e o de Vero $35,33 \times 10^3$ células/ 100 μ L. No último período analisado, o número de células B16F10 foi de 82×10^3 células/ 100 μ L e de Vero $59,33 \times 10^3$ células/ 100 μ L.

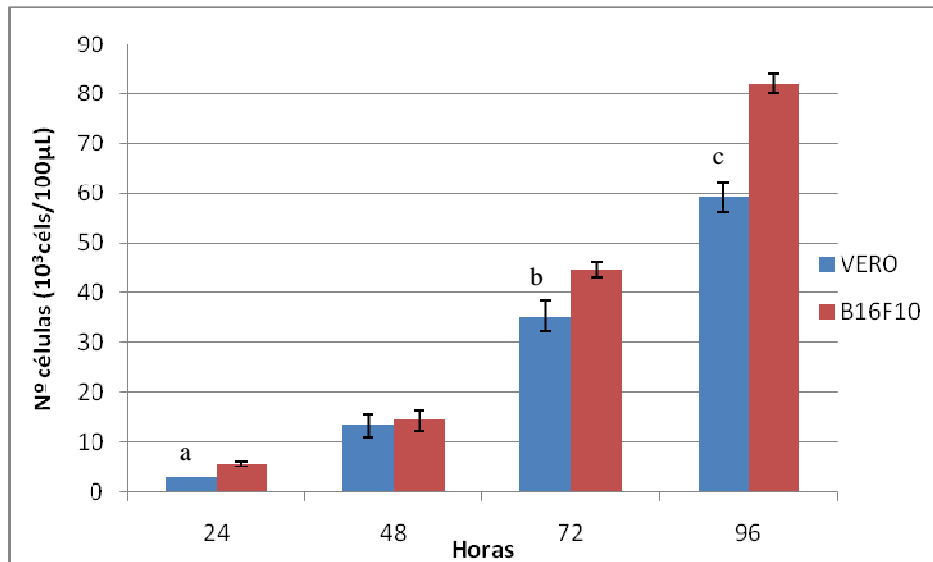


Figura 11 Comparação entre o número de células em diferentes horas entre células Vero e células B16F10. ^a $p < 0,05$ quando comparado com B16F10 em 24 horas; ^b $p < 0,05$ quando comparado com células B16F10 em 72 horas; ^c $p < 0,05$ quando comparado com células B16F10 em 96 horas; (n=3).

As células mostraram um perfil de crescimento esperado. Entretanto, podemos sugerir que a diferença estatística entre o número de células Vero e B16F10 por pertencerem a linhagens diferentes ou também pelo número experimental pequeno (n=3). Essas células apresentam o mesmo comportamento *in vitro*, porém, segundo Mayrhofer e colaboradores (2009), quando realizados estudos *in vivo* as células Vero não apresentam características tumorigênicas, pois se trata de uma linhagem de células estáveis de rim de macaco não tumorais. Já as células B16F10, são caracterizadas por induzir a proliferação celular descontrolada, bem como a metástase, característica do melanoma (JUNQUEIRA JR., 1997).

4.3 Resultados da indução do tumor

4.3.1 Análise morfológica e histológica

As Figuras 12 e 13 mostram a diferença entre os animais tratados por via subcutânea, com 100 μL de células Vero (2×10^5) na coxa esquerda e com 100 μL de células B16F10 (2×10^5) na coxa direita. A Figura 12 mostra a coxa esquerda de um camundongo após 24 horas da administração de células Vero, apresentando um aspecto normal, onde não se observou alterações visíveis a olho nu. Após 24 horas da administração das células B16F10, observou-se a presença de uma mancha com bordas irregulares, com pigmento de coloração escura, indicando a presença de melanina (Figura 13).



Figura 12. Coxa esquerda normal, após 24 horas da administração de células Vero.



Figura 13. Tumor na coxa direita do camundongo 24 horas após a administração das células B16F10.

A Figura 14 mostra o aspecto morfológico das coxas dos camundongos após 15 dias da administração das células Vero (A) e B16F10 (B). A Figura 14A mostra um aspecto normal e sem alterações visíveis a olho nu. Na Figura 14B, observa-se a morfologia do tumor, que se apresenta de forma arredondada ou ovóide, superfície

multinodular irregular definida por uma fina cápsula (indicada pela seta na Figura 14B).

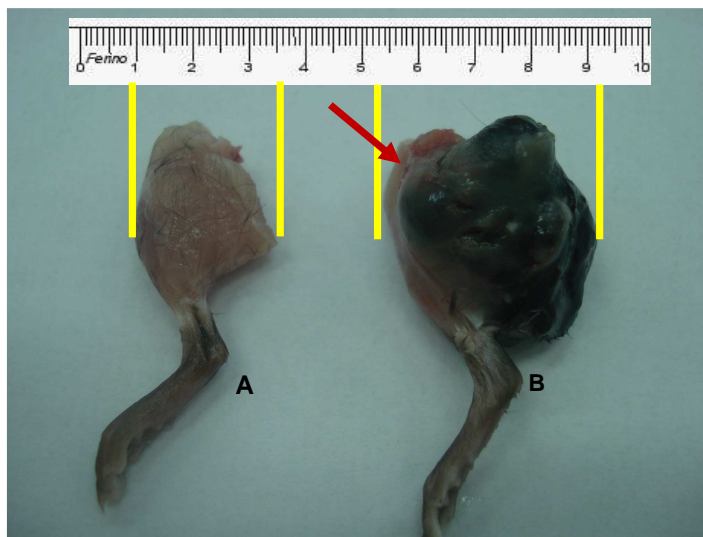


Figura 14. Coxas de camundongos 15 dias após a administração de células Vero (A) e células B16F10 (B).

Estas mesmas características morfológicas foram observadas por Conesa e colaboradores (2009), utilizando o modelo experimental de melanoma murino com administração de 10^6 células B16F10 em 200 μ L de meio de cultura, por via subcutânea na região inguinal esquerda.

Vários trabalhos citam diferentes quantidades de células administradas nos animais, que variam de acordo com o modelo utilizado e o objetivo do trabalho. Guruvayoorappan e Kuttan (2007) utilizaram 10^6 células para induzir metástase pulmonar em camundongos C57BL/6, por via endovenosa caudal. Conesa e colaboradores (2009) utilizaram 10^6 células por via subcutânea e 10^5 células por via endovenosa na veia caudal no modelo metastático. Já o estudo de Parlakian e colaboradores (2010), utilizaram administração de 5×10^5 células B16F10 por via endovenosa na veia caudal e 10^3 células B16F10 por via intraperitoneal para analisar o número de metástases em determinados órgãos. Zhao e colaboradores (2010) administraram por via subcutânea 10^5 células B16F10 na coxa direita dos camundongos, para avaliar o efeito de uma citocina adicionada em células B16F10 e sua capacidade de ativar uma resposta anti-tumoral. Em nosso estudo, foram administradas 2×10^5 células por via subcutânea com o objetivo de analisar a

concentração de ácido siálico no início do processo tumoral com uma concentração menor de células B16F10 e relacionar com a concentração de AS no início da lesão.

A análise histológica, realizada por microscopia de luz em cortes das coxas dos animais tratados com células Vero (grupo Controle) e células B16F10, são apresentadas na Figura 15. Na Figura 15A verifica-se a presença musculatura normal, da coxa de um camundongo 24 horas após a administração das células Vero.

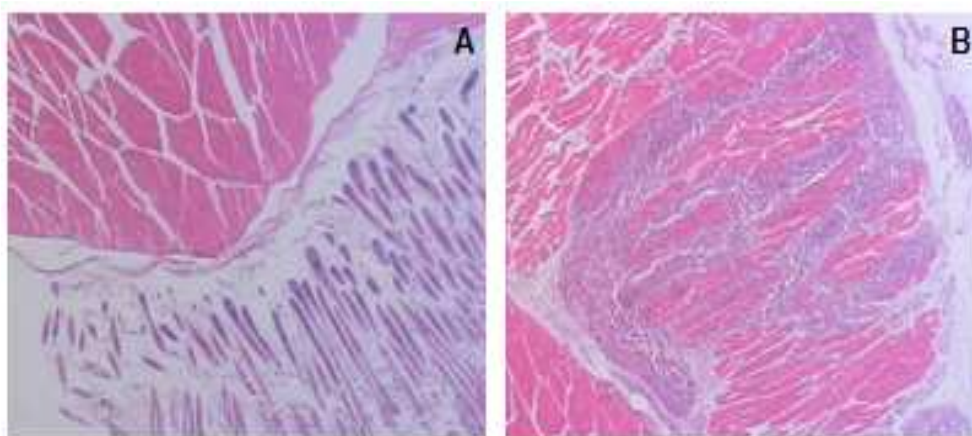


Figura 15. Fotomicrografia da coxa do camundongo tratado com células Vero (A) e células B16F10 (B). Aumento de 10x.

O corte histológico do grupo tratado com células Vero, não mostrou morfologia alterada, e não foram observados comprometimentos estruturais ou proliferação celular que indique um processo tumoral. Desta forma, nota-se que essas células não tem a capacidade de induzir a formação tumoral.

A Figura 15B mostra a fotomicrografia da coxa de um camundongo tratado com células B16F10 após 24 horas, onde pode se observar agregados de células epitelióides e pigmento de melanina intracitoplasmático. A diferença histológica demonstrada na Figura 15A e B confirmam o potencial tumorigênico das células B16F10.

Na Figura 16A observam-se grupos compactos de melanócitos arredondados ou poligonais, com citoplasma amplo e claro, cromatina irregular e a migração de melanócitos da epiderme (ep) para a derme (der) e para os folículos pilosos. Na Figura 16C observam-se grupos de melanócitos com citoplasma amplo e claro, núcleos hipercromáticos (indicados pela seta na Figura 16C), moderado grau de polimorfismo, núcleos vacuolizados (indicados pelo asterisco na Figura 16B), nucléolos eosinofílicos e proeminentes, e mitoses atípicas (indicadas pela seta na Figura 16B).

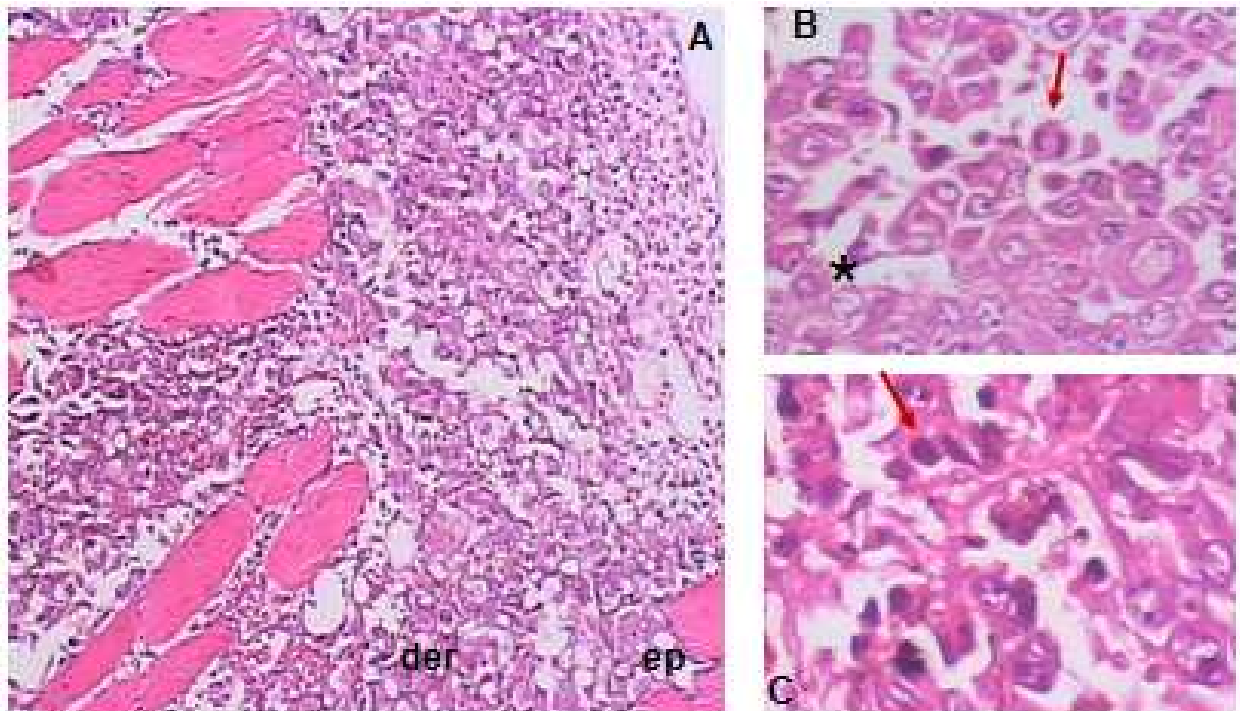


Figura 16. Fotomicrografia característica de melanoma subcutâneo. A – aumento de 100x; B – mitoses atípicas (indicada pela seta, aumento de 400x), e núcleos vacuolizados (indicado pelo *, aumento de 400x) e C – condensação de cromatina (indicada pela seta, aumento de 400x).

Na Figura 16C, também se observa grande quantidade de grânulos de melanina dispersos no citoplasma, circundados por delicada rede de reticulina. A presença dos grânulos de pigmento de coloração marrom é devido a um aumento da melanina no citoplasma e entre as células, o que confirma o diagnóstico de neoplasia de células melanocíticas. Nos cortes histológicos realizados neste trabalho, não foram observados vasos sanguíneos.

O estudo de Novak e colaboradores (2003), após a administração subcutânea de 10^6 células B16F10 em camundongos C57BL/6, realizaram cortes histológicos aproximadamente 30 dias após a administração das células, e observaram pequenas áreas necróticas e células com variados graus de condensação de cromatina.

Conesa e colaboradores (2009), também realizaram análises microscópicas, em modelo experimental de melanoma murino em camundongos, com administração de 10^6 células B16F10 em 200 μ L de meio de cultura, por via subcutânea na região inguinal esquerda. As análises histológicas foram realizadas no vigésimo primeiro dia

após a indução do tumor. Foi observada a presença de núcleos volumosos com nucléolos eosinofílicos, e não foi relatada a presença de mitoses atípicas.

O mesmo padrão histológico observado em melanoma murino com a administração de células B16F10, por via subcutânea em camundongos C57BL/6, é também observado em humanos. O estudo que demonstra essas mesmas características histológicas, foi realizado por Hamodat e Alhumidi (2009) através da análise histológica de pacientes com melanoma na fase metastática e também evidenciaram a presença de células com núcleos hipercromáticos, nucléolos proeminentes e a presença de mitoses.

4.3.2 Análise bioquímica do ácido siálico em modelo de melanoma murino em camundongos C57BL/6

Os dados apresentados na Figura 17 mostram as diferenças das concentrações de AS nos três grupos experimentais estudados em diferentes dias. Os resultados são expressos como as médias das concentrações de cada grupo. No primeiro dia ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de AS no soro dos animais com Melanoma (30 %), quando comparado com o grupo Controle. Entretanto, os animais tratados com as células Vero não apresentaram diferenças significativas em relação ao Controle. As concentrações de ácido siálico do grupo com Melanoma no quarto, oitavo e décimo quinto dia são aumentadas com relação ao grupo Controle, entretanto não há diferença significativa.

A diferença significativa na concentração de AS no primeiro dia entre o grupo com Melanoma e o grupo Controle pode estar relacionada com mudanças na composição das glicoproteínas responsáveis pelas moléculas de adesão celular, que apresentam resíduos de AS. Esses dados sugerem o envolvimento do AS no início do processo tumoral, mesmo utilizando concentrações inferiores de células B16F10 (2×10^5 células/ 100 μ L), quando comparada a outros trabalhos que utilizam 10^6 células, e relacionam o aumento da concentração de AS no processo metastático e não no início da lesão.

O estudo realizado por Leyon e colaboradores (2005) em modelo de metástase em camundongos C57BL/6, através da administração de 10^6 células B16F10 em 50 μ L de PBS por via intravenosa, demonstrou que a concentração de AS estava aumentada no grupo com melanoma (113,0 μ g/mL) quando comparada ao grupo controle (25,1 μ g/mL). A dosagem foi realizada vinte e um dias após a administração das células B16F10, através do método tiobarbitúrico.

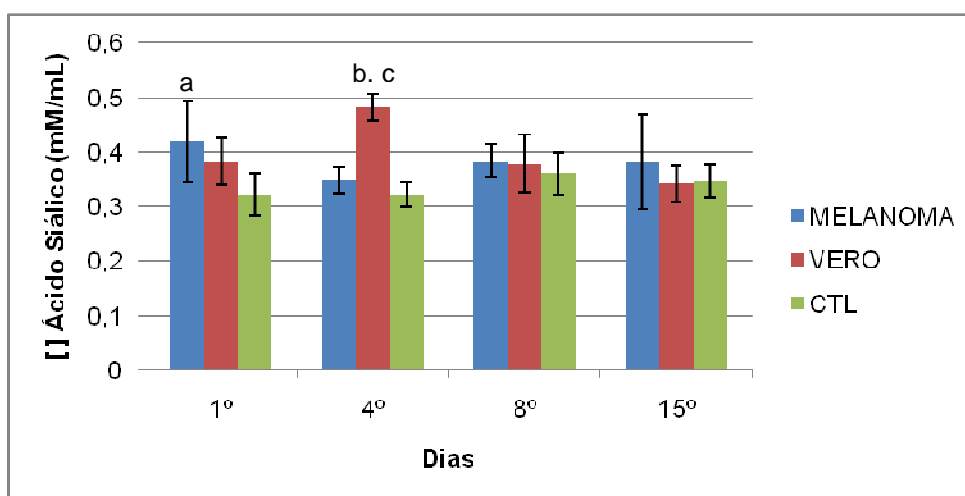


Figura 17. Comparação da concentração de AS em camundongos com melanoma, células Vero e controle. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com Melanoma; ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; (n=5).

Outro trabalho que demonstra o envolvimento do AS em processos tumorais é o estudo de Chang e colaboradores (2006) que avaliou o efeito da Soyasaponina I, um composto que inibe a enzima sialiltransferase, promovendo uma diminuição das ligações glicosídicas $\alpha 2,3$ com o AS nas células B16F10, para isso, 1×10^6 células/mL em PBS foram previamente tratadas com o composto. Após, 2×10^5 células em 200 μ L foram administradas em camundongos C57BL/6 por via intravenosa (modelo de metástase). Os animais foram sacrificados no décimo quarto dia após a administração das células e a média do número de metástases dos animais foi avaliada. Os autores observaram que os animais que receberam as células tratadas com o composto apresentaram um número menor de metástases (111 para a concentração de 25 μ M e 47 para a concentração de 75 μ M) em relação ao grupo que recebeu células não tratadas (192 metástases). Portanto, os pesquisadores sugerem que a concentração de

AS está intimamente relacionada com o processo de metástase.

Um estudo em humanos, realizado por Vural e colaboradores (1999), avaliou a concentração de AS em indivíduos com carcinoma de células basais, queratose actínica e indivíduos saudáveis, e demonstraram que a concentração de AS está relacionada com o estágio e a progressão do tumor, sendo que quanto maior a concentração de AS, maior é a malignidade.

O aparecimento de um aumento tumoral após 15 dias da administração das células e a falta de diferença significativa na concentração de ácido siálico entre o grupo com Melanoma e o grupo Controle pode ser devido à baixa expressão ou a perda de moléculas de adesão das células tumorais, que segundo Johnson (1991), pode ocorrer quando as células perdem as conexões com as células vizinhas, e assim, perdem alguns controles regulados pelo contato celular, invadindo os tecidos conectivos, sistema vascular e linfático para atingir o local de formação de metástase em um órgão distante.

Outra consideração importante é que em casos de melanoma ocorre a perda da E-caderina e as ligações ocorrem através da N-caderina (HAASS; HERLYN, 2005). Ciolczyk-Wierzbicka e colaboradores (2002) caracterizaram os oligossacarídeos componentes da N-caderina de diferentes linhagens de melanoma *in vitro*, demonstrando que os N-glicanos da N-caderina são diferentes nas linhagens celulares de melanoma metastático de uma maneira a tornar as células mais invasivas. Mas em camundongos, o perfil dessas moléculas é diferente do perfil de humanos, refletindo em uma organização estrutural diferente (LI; HERLYN, 2000), o que também pode explicar a diferença não significativa no quarto, oitavo e décimo quinto dia.

Com a migração dos melanócitos da epiderme para a derme, observada no primeiro dia após a administração das células B16F10, evidenciada pela análise histológica (Figura 16A, página 66) pode-se justificar o aumento do AS no início do processo tumoral, pois nessa fase ainda existe um aumento da expressão de E-caderina, mas quando o tumor é invasivo existe a expressão de N-caderina (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001), e as concentrações de AS do grupo com Melanoma não são aumentadas, no quarto, oitavo e décimo quinto dia, com relação ao grupo Controle, pois nessa fase as células perdem a capacidade de aderir umas as

outras, porque diminui a expressão de E-caderina. Portanto pode-se sugerir que a diminuição da concentração de AS ocorre quando diminui a expressão de E-caderina e aumenta N-caderina.

Em relação às concentrações de AS do grupo com células Vero, observou-se um aumento na concentração de ácido siálico de 34 % quando comparado ao grupo com Melanoma e 42 % quando comparado ao grupo Controle no quarto dia após a administração das células. Esse aumento pode ser devido à resposta imune dos animais por se tratar de células epiteliais de rim de macaco administradas em camundongos.

Não foram encontrados trabalhos que relacionem o aumento das concentrações de AS no início do melanoma, apenas o aumento na fase metastática. Portanto, este é o primeiro trabalho que sugere o envolvimento do AS no início do processo do melanoma, provavelmente devido a adesão das células na fase de proliferação anormal dos melanócitos que ocorre na epiderme, onde se localizam essas células (TOBIN; BYSTRYN, 1996).

4.4 Análise bioquímica do ácido siálico em modelo de infecção herpética com HSV-1 em camundongos Balb/c

A Figura 18 mostra a concentração de AS em diferentes dias do grupo tratado, com administração intraperitoneal de 10^2 PFU de HSV-1, e o grupo controle. Os resultados foram expressos como as médias das concentrações. Como podemos observar a concentração de AS, no primeiro dia após a infecção no grupo tratado (0,385107 mM/mL) está aumentada 25 % com relação ao controle (0,307908 mM/mL), sendo esta diferença significativa ($p < 0,05$), mesmo com a administração de uma baixa quantidade de vírus nos animais. Esse aumento pode estar relacionado com a biologia do vírus, através da fusão de glicoproteínas do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. Não foram encontrados estudos que relacionem a concentração de AS no início da infecção herpética, sendo este, o primeiro estudo que demonstra o envolvimento do AS no modelo utilizado.

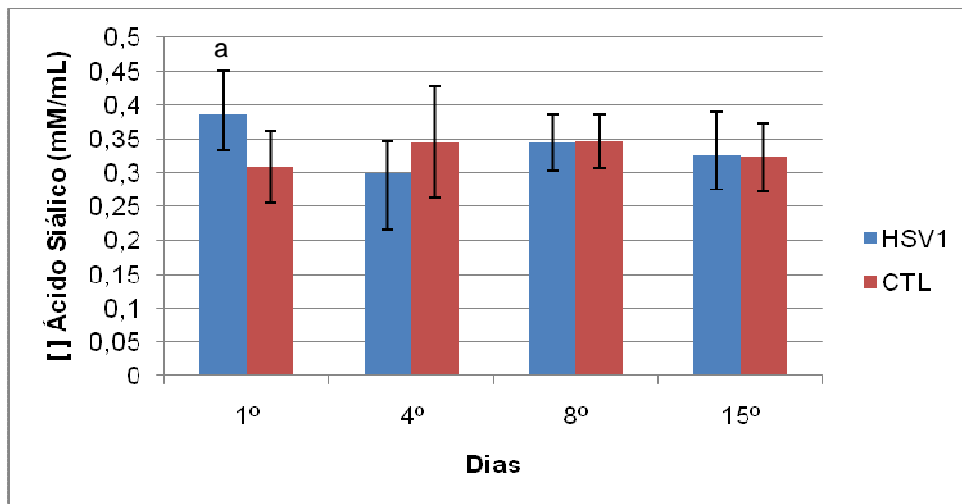


Figura 18. Comparação da concentração de ácido siálico do grupo infectado com vírus (HSV-1) e controle (CTL) nos diferentes dias do experimento. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; (n=6).

De acordo O'Donnell e colaboradores (2010) sabe-se que o processo de entrada do HSV-1 ocorre através da ligação com o sulfato de heparano (receptor expresso na superfície e na matriz extracelular) com as glicoproteínas virais gB ou gC. Esta ligação permite que a gD se ligue aos receptores celulares promovendo a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, permitindo a liberação do capsídeo e das proteínas do tegumento viral no citoplasma da célula.

Devido a sua localização terminal em glicoproteínas e glicolipídios, o AS é o sítio de ligação de muitos organismos patogênicos (VARKI, 2008). Alguns membros dos *poliomavirus*, *rotavirus*, *ortomixovirus* e *adenovirus* se ligam ao AS presente na superfície celular do hospedeiro (DUGAN; GASPAROVIC; ATWOOD, 2008).

O estudo de Schwegmann-Webels e Herrler (2006) mostra que em algumas infecções causadas por *coronavirus*, o AS (9-O-Acetilado) serve como um receptor determinante da infecção. Nestes casos, assim como em infecções causadas pelo *Influenza*, os vírus produzem uma enzima que cliva a ligação entre o AS e as glicoproteínas da célula do hospedeiro, permitindo desta forma a entrada do vírus na célula.

No estudo de Rossi e Paltrinieri (2009), foi realizada a dosagem de AS, utilizando um kit comercial, com o objetivo de utilizar o AS no diagnóstico de infecção por *coronavirus* felino (FCoV) em gatos. No estudo não houve diferença significativa na

concentração de AS entre os grupos experimentais (grupo A = controle soronegativo; grupo B = controle soropositivo; grupo C = peritonite infecciosa felina; D = tumor e E = inflamação) demonstrando que o mesmo não pode ser utilizado no diagnóstico dessa doença.

O trabalho de Teuton e Brandt (2007) evidenciou a presença de AS em uma ou mais glicoproteínas virais e que essas são críticas para manter a infectividade do HSV-1. Outra evidência é que as glicoproteínas virais possuem ligações $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$, mas a infectividade é mantida através das ligações $\alpha 2,6$, possibilitando desta forma, a identificação de tratamentos para a prevenção da infecção por HSV-1.

A partir dos resultados obtidos com o experimento realizado em 15 dias e da observação do aumento significativo nas primeiras 24 horas após a infecção, avaliamos o envolvimento do ácido siálico a partir de 30 minutos após a infecção com HSV-1.

Os dados apresentados na Figura 19 mostram a concentração de AS em camundongos infectados com 10^2 PFU de HSV-1, administrados intraperitonealmente, seguido de coletas de sangue do grupo infectado em 30, 60, 120 e 1440 minutos após a infecção e do grupo controle.

Os resultados das concentrações de AS demonstram uma redução significativa ($p < 0,05$) de 23 % na concentração de 30 minutos quando comparada com 120 minutos. Os dados foram expressos como as médias das concentrações.

A diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de AS entre 30 minutos e 120 minutos após a infecção, demonstra o envolvimento do AS na entrada do vírus na célula.

Segundo Atanasiu e colaboradores (2007), a ligação das glicoproteínas virais do HSV com receptores na membrana plasmática da célula hospedeira promove a fusão das membranas. Esta fusão requer o rompimento das membranas lipídicas e desta forma o material viral entra na célula hospedeira.

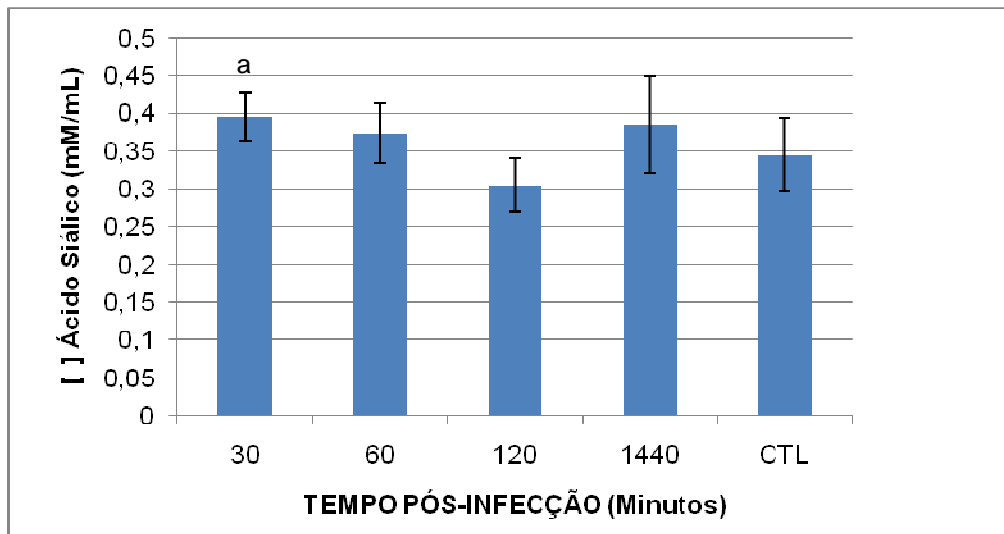


Figura 19. Comparação da concentração de ácido siálico do grupo infectado com vírus (HSV-1) e controle (CTL) em diferentes minutos após a infecção. ^a $p < 0,05$ quando comparado com 120 minutos após a infecção; (n=6).

De acordo com Nicola e Straus (2004), *in vitro* a entrada do HSV-1 nas células Vero é rápida e pode ocorrer em 30 minutos. Após o HSV penetrar na membrana plasmática, o capsídeo é liberado no citosol, em seguida, os microtúbulos impulsionam o capsídeo para a região nuclear. Os dados referentes ao tempo de infecção também foram observados por Hazrati e colaboradores (2006), em uma infecção *in vitro* por HSV-1 em células Vero. Os vírus e as células são mantidos à 4°C para que ocorra apenas a adsorção, em seguida são lavadas para retirar o excesso de vírus que não se ligaram as células, e logo após são submetidas a incubação de 30 minutos à 37°C, que é o período e a temperatura requerida para que o vírus penetre nas células.

Portanto, a diferença da concentração de ácido siálico entre 30 e 120 minutos indica que o ácido siálico pode estar envolvido no processo de entrada do HSV-1 nas células. Pois em 120 minutos, os vírus já penetraram nas células e a concentração de ácido siálico diminui. O mesmo pode ser observado no experimento anterior, que mesmo sem diferença significativa entre as concentrações de ácido siálico entre o primeiro e quarto dias após a infecção ocorre uma diminuição no quarto dia, sugerindo desta forma, que os novos vírus formados após a replicação estão penetrando em outras células.

4.5 Método Tiobarbitúrico para dosagem de ácido siálico

O método para dosar o AS no soro de camundongos, nos dois modelos experimentais empregados neste estudo (tumoral e viral), se mostrou sensível e capaz de detectar as quantidades de AS na curva de calibração, iniciando com 0,0125 mM/mL, que corresponde a quantidade de 3,86 µg/mL de AS.

De acordo com Crook e colaboradores (2001) o AS pode ser determinado pelo método tiobarbitúrico, tanto no plasma como no soro. Um estudo realizado por Guruvayoorappan e Kuttan (2007), avaliou o efeito antimetastático da amentoflavona em modelo de melanoma metastático, através da administração de 10^6 células B16F10 em camundongos C57BL/6 pela via endovenosa na veia lateral caudal dos animais. As concentrações de AS foram determinadas no soro através do método tiobarbitúrico. Os animais do grupo controle apresentaram 23,9 µg/mL de AS, enquanto que os animais do grupo tratado apresentaram 4,8 µg/mL, o nível basal de animais normais foi de 0,95 µg/mL.

Outro estudo que determinou os níveis séricos de AS pelo método tiobarbitúrico foi realizado por Balaji e colaboradores (2009). Através das concentrações de AS e outras dosagens realizadas foram avaliados o efeito antimetastático e antiproliferativo da fração metanólica de *Jatropha curcas*, após a indução de metástase em camundongos C57BL/6, através da administração de 5×10^5 células B16F10 na veia caudal lateral dos animais. O nível basal de AS dos camundongos usados no estudo foi de 25 µg/mL, nos animais do grupo controle (não receberam tratamento) a concentração de AS foi de 150 µg/mL, já nos animais que receberam o extrato da planta nas concentrações de 100 mg/Kg e 200 mg/Kg foi de 70 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente e a concentração de AS no soro dos camundongos que receberam uma droga utilizada em casos de câncer, a Doxorubicina, foi de 30 µg/mL.

Com relação às dosagens de AS em infecções virais, Oladele e colaboradores (2002), analisaram as concentrações séricas de AS livre em galinhas infectadas com o vírus da Doença de Newcastle da família *Paramyxoviridae*. Para determinar quais os animais estavam infectados, foram realizados testes de inibição da hemaglutinação. As dosagens de AS foram realizadas através do método tiobarbitúrico, sendo que os

animais infectados apresentaram 0,129 mg/mL de AS e os animais aparentemente saudáveis 0,041 mg/mL.

Outro estudo que relacionou concentrações de AS e doença viral, foi realizado em galinhas vacinadas e não vacinadas contra a doença de Newcastle. A dose da vacina foi administrada como recomendava o fabricante. As dosagens de AS realizadas através do método tiobarbitúrico revelaram que os animais vacinados apresentaram níveis elevados de AS (0,075 mg/mL) quando comparado com animais não vacinados (0,031 mg/mL), porque a vacina induziu a produção da enzima neuraminidase, a qual cliva o AS presente na superfície dos eritrócitos (OLADELE et al. 2007). Não foram encontrados artigos que utilizem o método tiobarbitúrico para determinar as concentrações de AS em infecções com HSV-1.

No estudo realizado por Uhlendorff e colaboradores (2009), foram avaliadas as alterações da enzima neuraminidase para o surgimento da pandemia da gripe. Monocamadas de células Cos 7 em placas de cultura foram incubadas com substratos que contém ácido siálico. O AS liberado foi determinado pelo método tiobarbitúrico e a partir desses dados a atividade da enzima neuraminidase foi calculada. Os resultados mostraram que mudanças funcionais e genéticas da neuraminidase representam um indicador da adaptação permanente do vírus da gripe aviária para infectar humanos.

4.6 Perspectivas Futuras

- ❖ Realizar estudos imunohistoquímicos no modelo tumoral para ver a expressão das Caderinas;
- ❖ Dosar marcadores tumorais;
- ❖ Dosar a enzima neuraminidase nos modelos estudados;
- ❖ Realizar dosagens de AS em humanos com infecção herpética e melanoma e comparar com o estudo realizado;
- ❖ Realizar dosagens de citocinas e anticorpos no modelo viral e comparar com as concentrações de AS.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que a metodologia empregada para a dosagem do ácido siálico se mostrou válida, sensível e capaz de detectar concentrações de ácido siálico no soro de 3,86µg/mL.

De acordo com os resultados encontrados no modelo tumoral, a análise histológica da coxa dos camundongos realizados após 24 horas da administração de células B16F10 demonstrou grupos compactos de melanócitos arredondados ou poligonais, com citoplasma amplo e claro, cromatina irregular, núcleos hipercromáticos e vacuolizados, nucléolos eosinofílicos e mitoses atípicas. Sendo essas características de células tumorais. Após a realização das dosagens de AS podemos sugerir o envolvimento do mesmo no início do processo tumoral, devido ao aumento significativo da concentração de AS no grupo com melanoma quando comparado ao grupo controle. Nos outros dias analisados a concentração de AS foi maior no grupo com tumor quando comparada ao grupo controle, mas não demonstrou diferença significativa. Desta forma, através de mais estudos o ácido siálico poderá ser sugerido como possível marcador no início do melanoma.

Em relação à infecção causada pelo HSV-1, os resultados desse estudo demonstraram um aumento significativo da concentração do AS no grupo infectado com HSV-1, em relação ao grupo controle após 30 minutos e 24 horas da infecção viral. Estes resultados sugerem o envolvimento do AS na biologia viral, ou podem estar relacionados com a entrada do vírus na célula hospedeira.

Entretanto, novos estudos devem ser realizados para comprovar o envolvimento do AS durante o processo de fusão viral com a membrana celular do hospedeiro, para que o mesmo possa ser considerado como um biomarcador da infecção herpética, ou ser usado como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de impedir ou inibir o processo de entrada do vírus na célula.

Estudos futuros são necessários para investigar a concentração de AS em indivíduos com infecção herpética causadas pelo HSV-1, bem como em pacientes em estágio inicial do melanoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACS – American Cancer Society. How Is Melanoma Diagnosed? Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_3X_How_is_melanoma_diagnosed_50.asp?rnav=cri> Acesso em: 11 de Dezembro de 2009.

AKCAY, F.; TAYSI, S.; USLU, C.; DOGRU, Y.; G. K. Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Total Sialic Acid in Serum of Patients with Laryngeal Cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology.** v.31, n.12, p.584-588, 2001.

ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. **Chemical Reviews.** v.102, n.2, p.439-469, 2002.

ATANASIU, D.; WHITBECK, J.C.; CAIRNS, T.M.; REILLY, B.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. **PNAS.** v.104, n.47, p.18718-18723, 2007.

AZZAZY, H.M.E.; MANSOUR, M.M.H.; KAZMIERCZAK, S.C. Nanodiagnostics: A New Frontier for Clinical Laboratory Medicine. **Clinical Chemistry.** v.52, n.7, p.1238-1246, 2006.

BALAJI, R.; REKHA, N.; DEECARAAN, M.; MANIKANDAN, L. Antimetastatic and antiproliferative activity of methanolic fraction of *Jatropha curcas* against B16F10 melanoma induced lung metastasis in C57BL/6. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v.3, n.11, p.547-555, 2009.

BHAVANANDAN, V.P.; RINGLER, N.J.; GOWDA, D.C. Identification of the glycosidically bound sialic acid in mucin glycoproteins that reacts as “free sialic acid” in the Warren assay. **Glycobiology.** v.8, n.11, p.1077-1086, 1998.

BI, S.; BAUM, L.G. Sialic acids in T cell development and function. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1790, p.1599-1610, 2009.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research.** v.61, p.73-81, 2004.

BULAI, T.; BRATOSIN, D.; ARTENIE, V.; MONTREUIL, J. Uptake of sialic acid by human erythrocyte. Characterization of a transport system. **Biochimie.** v.85, p.241-244, 2003.

BURBELO, P.D.; HOSHINO, Y.; LEAHY, H.; KROGMANN, T.; HORNUNG, R.L.; IADAROLA, M.J.; COHEN, J.I. Serological Diagnosis of Human Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 infections by Luciferase Immunoprecipitation System Assay. **Clinical and Vaccine Immunology.** v.16, n.3, p.366-371, 2009.

BUSCHIAZZO, A.; AMAYA, M.F.; CREMONA, M.L.; FRASCH, A.C.; ALZARI, P.M. The Crystal Structure and Mode of Action of Trans-Sialidase, a Key Enzyme in *Trypanosoma cruzi* Pathogenesis. **Molecular Cell**. v.10, p.757-768, 2002.

BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P.M. Structural insights into sialic acid enzymology. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.12, p.1-8, 2008.

BYRNE, B.; DONOHOE, G.G.; O'KENNEDY, R. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. **Drug Discovery Today**. v.12, n.7/8, p.319-326, 2007.

CALIFANO, J.; NANCE, M. Malignant Melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**. v.17, p.337-348, 2009.

CASTRO, J.; RODRÍGUEZ, M.C.; MARTÍNEZ-ZORZANO, V. S; LLANILLO, M.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J. Platelet linoleic acid is a potential biomarker of advanced non-small cell lung cancer. **Experimental and Molecular Pathology**. v.87, p.226-233, 2009.

CHANG, W. W.; YU, C. Y.; LIN, T. W.; WANG, P. H.; TSAI, Y. C. Soyasaponin I decreases the expression of α 2,3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.341, p.614-619, 2006.

CHEN, H.; BLUME, A.; ZIMMERMANN-KORDMANN, M.; REUTTER, W.; HINDERLICH, S. Purification and characterization of *N*-acetylneuraminic acid-9-phosphate synthase from rat liver. **Glycobiology**. v.12, n.2, p.65-71, 2002.

CHEW, T.; TAYLOR, K.E.; MOSSMAN, K.L. Innate and Adaptive Immune Responses to Herpes Simplex Virus. **Viruses**. v.1, p.979-1002, 2009.

CIOLCZYK-WIERZBICKA, D.; GIL, D.; HOJA-LUKOWICZ, D.; LITYNSKA, A.; LAIDLER, P. Carbohydrate moieties of N-cadherin from human melanoma cell lines. **Acta Biochimica Polonica**. v.49, n.4, p.991-998, 2002.

CONESA, C.M.; SANCHEZ, N.A.; ORTEGA, V.V.; REVERTE, J.G.; CARPE, F.P.; ARANDA, M.C. *In vitro* and *in vivo* effect of IFN α on B16F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). **Biomedicine e Pharmacotherapy**. v.63, p.305-312, 2009.

CROOK, M. The Determination of Plasma or Serum Sialic Acid. **Clinical Biochemistry**. v.26, n.1, p.31-38, 1993.

CROOK, M.A.; PICKUP, J.C.; LUMB, P.J.; GEORGINO, F.; WEBB, D.J; FULLER, J.H. Relationship Between Plasma Sialic Acid Concentration and Microvascular and Macrovascular Complications in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**. v.24, n.2, p.316-322, 2001.

CROCKER, P.R.; VARKI, A. Siglecs in the immune system. **Immunology**. v.103, n.2, p.137-145, 2001.

CROCKER, P.R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signaling. **Current Opinion in Structural Biology**. v.12, p.609-615, 2002.

CROCKER, P.R.; PAULSON, J.C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews**. v.7, p.255-266, 2007.

CROCKER, P.R.; REDELINGHUYS, P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. **Biochemical Society Transactions**. v.36, p.1467-1471, 2008.

CROSS, A.S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; HELD, T.K.; DRYSDALE, B.E.; GRANGE, P.A.; CASSELS, F.J.; WANG, L.X.; STAMATOS, N.; FARESE, A.; CASEY, D.; POWELL, J.; BHATTACHARJEE, A.K.; KLEINBERG, M.; GOLDBLUM, S.E. Recruitment of Murine Neutrophils *in Vivo* through Endogenous Sialidase Activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, n.6, p.4112-4120, 2003.

DAHESHIA, M.; FELDMAN, L.T.; ROUSE, B.T. Herpes simplex virus latency and the immune response. **Current Opinion in Microbiology**. v.1, p.430-435, 1998.

DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1572, p.285-293, 2002.

DECMAN, V.; FREEMAN, M.L.; KINCHINGTON, P.R.; HENDRICKS, R.L. Immune Control of HSV-1 Latency. **Viral Immunology**. v.18, n.3, p.466-473, 2005.

DIAMANTOPOULOU, S.; STAGIANNIS, K.D.; VASILOPOULOS, K.; BARLAS, P.; TSEGENIDIS, T.; KARAMANOS, N.K. Importance of high-performance liquid chromatographic analysis of serum N-acetylneuraminic acids in evaluating surgical treatment in patients with early endometrial cancer. **Journal of Chromatography B**. v.732, n.2, p.375-381, 1999.

DIMATOS, D.C.; DUARTE, F.O.; MACHADO, R.S.; VIEIRA, V.J.; VASCONCELLOS, Z. A.A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R.D.; Melanoma Cutâneo no Brasil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v.38, p.14-19, 2009.

DOBEN, A.R.; MACGILLIVRAY, D.C. Current Concepts in Cutaneous Melanoma: Malignant Melanoma. **Surgical Clinics of North America**. v.89, p. 713-725, 2009.

DUFFY, M.J. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. **European Journal of Internal Medicine**. v.18, n.3, p.175-184, 2007.

DUGAN, A.S.; GASPAROVIC, M.L.; ATWOOD, W.J. Direct Correlation Between Sialic Acid Binding and Infection of Cells by Two Human Polyomaviruses (JC Virus and BK

Virus). **Journal of Virology**. v.82, n.5, p.2560-2564, 2008.

DUNCAN, L. McD. The classification of cutaneous melanoma. **Hematology Oncology Clinics of North America**. v.23, p.501-513, 2009.

EASH, S.; TAVARES, R.; STOPA, E.G.; ROBBINS, S.H.; BROSSAY, L.; ATWOOD, W.J. Differential Distribution of the JC Virus Receptor- Type Sialic Acid in Normal Human Tissues. **American Journal of Pathology**. v.164, n.2, p.419-428, 2004.

ERBACHER, A.; GIESEKE, F.; HANDGRETINGER, R.; MÜLLER, I. Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. **Human Immunology**. v.70, p.308-312, 2009.

FARAKHZAD, O.C.; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.58, p.1456-1459, 2006.

FARIA, J.B.L. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v.23, n.2, p.121-129, 2001.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R.A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.57, n.5, p.737-763, 2007.

FÁTIMA, A.; BAPTISTELLA, L. H. B.; PILLI, R. A.; MODOLO, L. V. Ácidos Siálicos – Da Compreensão do seu Envolvimento em Processos Biológicos ao Desenvolvimento de Fármacos Contra o Agente Etiológico da Gripe. **Química Nova**. v.28, n.2, p.306-316, 2005.

FERRARI JÚNIOR, N. M.; MULLER, H.; RIBEIRO, M.; MAIA, M.; SANCHES JÚNIOR, J. A. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. **São Paulo Medical Journal**. v.126, n.1, p.41-47, 2008.

FUSTER, M.M.; ESKO, J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature Reviews**. v.5, n.1649, p.526-542, 2005.

GAGGIOLI, C.; SAHAI, E. Melanoma invasion – current knowledge and future directions. **Pigment Cell Research**. v.20, p.161-172, 2007.

GENNIS, R. B. **Biomembranes** Molecular Structure and function. New York, NY: Springer-Verlag, 1989.

GODING, C.R. Melanocytes: The new Black. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, p.275-279, 2007.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. Effect of Amentoflavona on the Inhibition of Pulmonary Metastasis Induced by B16F10 Melanoma Cells in C57BL/6 Mice.

Integrative Cancer Therapies. v.6, n.2, p.185-197, 2007.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research.** v.18, n.3, p.150-159, 2005.

HALPERN, A.C.; LIEB, J.A. Early melanoma diagnosis: a success story that leaves room for improvement. **Current Opinion in Oncology.** v.19, p.109-115, 2007.

HAMODAT, M; ALHUMIDI, A. Malignant Melanoma of the Gall Bladder, A case report and Literature Review. **The Internet Journal of Pathology.** v.9, n.2, p.1-14, 2009.

HAZRATI, E.; GALEN, B.; LU, W.; WANG, W.; OUYANG, Y.; KELLER, M.J.; LEHRER, R.I.; HEROLD, B.C. Human {alpha}- and beta-Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Immunology.** v.177, p.8658-8666, 2006.

HELDWEIN, E.E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v.65, p.1653-1668, 2008.

HOFMANN, M.A.; GUSSMANN, F.; FRITSCHKE, A.; BIESOLD, S.; SCHICKE, B.; KÜCHLER, I.; VOIT, C.; TREFZER, U. Diagnostic value of melanoma inhibitory activity serum marker in the follow-up of patients with stage I or II cutaneous melanoma. **Melanoma Research.** v.19, n.1, p.17-23, 2009.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: www.inca.gov.br, acesso em 15 de Outubro de 2009.

JACOBS, T.; ERDMANN, H.; FLEISCHER, B. Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Cell Biology.** v.89, p.113-116, 2010.

JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. **Cancer and Metastasis Reviews.** v.10, p.11-22, 1991.

JOURDIAN, G.W.; DEAN, L.; ROSEMAN, S. The Sialic Acids. A Periodate-Resorcinol Method for the Quantitative Estimation of Free Sialic Acids and Their Glycosides. **The Journal of Biological Chemistry.** v.246, n.2, p.430-435, 1971.

JUNQUEIRA JR., G.; BRAGA, L.M.G.M.; MOTTA, M.S.; PILLA, H.S. Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v.72, n.5, p.487-489, 1997.

JUNQUEIRA JR., G.; **Modelo experimental de metastases pulmonares de melanoma murino B16F10 em camundongos C57BL/6N com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico.** Tese de

Doutorado. UFRGS. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia, 2005.

KASHANI-SABET, M.; RANGEL, J.; TORABIAN, S.; NOSRATI, M.; SIMKO, J.; JABLONS, D.M.; MOORE, D.H.; HAQQ, C.; MILLER III, J.R.; SAGEBIEL, R.W. A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi. **PNAS**. v.106, p.6268-6272, 2009.

KELLY, B.J.; FRAEFEL, C.; CUNNINGHAM, A.L.; DIEFENBACH, R.J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**. v. 145, n.2, p.173-186, 2009.

KELM, S.; PELZ, A.; SCHAUER, R.; FILBIN, M.T.; TANG, S.; DE BELLARD, M.E.; SCHNAAR, R.L.; MAHONEY, J.A.; HARTNELL, A.; BRADFIELD, P.; CROCKER, P.R. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. **Current Biology**. v.4, n.11, p.965-972, 1994.

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**. v.11, n.2, p.11R-18R, 2001.

KIMBERLIN, D.W.; WHITLEY, R.J. Neonatal herpes: What Have We Learned. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. v.16, n.1, p.7-16, 2005.

KLOSE, A.; WILBRAND-HENNES, A.; ZIGRINO, P.; WEBER, E.; KRIEG, T.; MAUCH, C.; HUNZELMANN, N. Contact of high-invasive, but not low-invasive, melanoma cells to native collagen I induces the release of mature cathepsin B. **International Journal of Cancer**. v.118, n.11, p.2735-2743, 2006.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Bases Patológicas das Doenças. Robbins & Cotran. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LANGLEY, R.G.B.; WALSH, N.; SUTHERLAND, A.E.; PROPPEROVA, I.; DELANEY, L.; MORRIS, S.F.; GALLANT, C. The Diagnostic Accuracy of in vivo Confocal Scanning Laser Microscopy Compared to Dermoscopy of Benign and Malignant Melanocytic Lesions: A Prospective Study. **Dermatology**. v.215, n.4, p.365-372, 2007.

LEE, H.C. **Comparative roles of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) viral glycoproteins in cytoplasmic virion egress**. Master Thesis. Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª ed., São Paulo, SP: Sarvier, 2006.

LEYON, P.V.; LINI, C.C.; KUTTAN, G. Inhibitory effect of *Boerhaavia diffusa* on experimental metastasis by B16F10 in C57BL/6 mice. **Life Sciences**. v.76, p.1339-

1349, 2005.

LI, G.; HERLYN, M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. **Molecular Medicine Today**. v.6, n.4, p.163-169, 2000.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells. **Cancer Research**. v.61, p.3819-3825, 2001.

LIN, J.Y.; FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**. v.445, n.22, p.843-850, 2007.

LOPEZ, P.H.H.; SCHNAAR, R.L. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. **Current Opinion in Structural Biology**. v.19, n.5, p.1-9, 2009.

LUPI, O. Herpes Simplex. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.75, n.3, p.261-275, 2000.

MACKIE, P.L. The classification of viruses infecting the respiratory tract. **Paediatric Respiratory Reviews**. v.4, n.2, p.84-90, 2003.

MALYKH, Y. N.; SCHAUER, R.; SHAW, L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. **Biochimie**. v.83, n.7, p.623-634, 2001.

MATOO, R.L.; ROSEMAN, S. Quantitative Determination of Sialic Acid in the Monosialoganglioside, GM₁, by the Thiobarbituric Acid Method. **Analytical Biochemistry**. v.246, n.1, p.30-33, 1997.

MATSUNO, K.; SUZUKI, S. Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. **Analytical Biochemistry**. v.375, n.1, p.53-59, 2008.

MATZKE, T.J.; BEAN, A.K.; ACKERMAN, T. Avoiding Delayed Diagnosis of Malignant Melanoma. **The Journal for Nurse Practitioners – JNP**. v.5, n.1, p.42-46, 2009.

MAYRHOFER, J.; COULIBALY, S.; HESSEL, A.; HOLZER, G.W.; SCHWENDINGER, M.; BRÜHL, P.; GERENCER, M.; CROWE, B.A.; SHUO, S.; HONG, W.; TAN, Y.J.; DIETRICH, B.; SABARTH, N.; SAVIDIS-DACHO, H.; KISTNER, O.; BARRETT, P.N.; FALKNER, F.G. Nonreplicating Vaccinia Virus Vectors Expressing the H5 Influenza Virus Hemagglutinin Produced in Modified Vero Cells Induce Robust Protection. **Journal of Virology**. v.83, n.10, p.5192-5203, 2009.

MENDELSON, E.; ABOUDY, Y.; SMETANA, Z.; TEPPERBERG, M.; GROSSMAN, Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). **Reproductive Toxicology**. v.21, n.4, p.350-382, 2006.

MENON, L.G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. **Cancer Letters**. v.141, p.159-165, 1999.

MÜNSTER-KÜHNEL, A. K.; TIRALONGO, J.; KRAPP, S.; WEINHOLD, B.; RITZ-SEDLACEK, V.; JACOB, U.; GERARDY-SCHAHN, R. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. **Glycobiology**. v.14, n.10, p.43-51, 2004.

MUKARAMI, T.; CARDONES, A.R.; HWANG, S.T. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **Journal of Dermatological Science**. v.36, p.71-78, 2004.

NANDAKUMAR, S.; WOOLARD, S.N.; YUAN, D.; ROUSE, B.T.; KUMARAGURU, U. Natural Killer Cells as Novel Helpers in Anti-Herpes Simplex Virus Immune Response. **Journal of Virology**. v.82, n.21, p.10820-10831, 2008.

NGUYEN, T.H. Mechanisms of Metastasis. **Clinics in Dermatology**. v.22, p.209-216, 2004.

NICOLA, A.V.; STRAUS, S.E. Cellular and Viral Requirements for Rapid Endocytic Entry of Herpes Simplex Virus. **Journal of Virology**. v.78, n.14, p.7508-7517, 2004.

NILSSON, E.C.; JAMSHIDI, F.; JOHANSSON, S.M.C.; OBERSTE, M.S.; ARNBERG, N. Sialic Acid is a Cellular Receptor for Coxsackievirus A24 Variant, an Emerging Virus with Pandemic Potential. **Journal Virology**. v.82, n.6, p.3061-3068, 2008.

NOVAK, E.M.; METZGER, M.; CHAMMAS, R.; COSTA, M.; DANTAS, K.; MANABE, C.; PIRES, J.; OLIVEIRA, A.C.; BYDLOWSKI, S.P. Downregulation of TNF- α and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. **Gene Therapy**. v.10, n.23, p.1992-1997, 2003.

NOVAK, N.; PENG, W.M. Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. **Clinical and Experimental Immunology**. v.142, n.3, p.405-410, 2005.

O'DONNELL, C.D.; KOVACS, M.; AKHTAR, J.; VALGY-NAGY, T.; SHUKLA, D. Expanding the role of 3-O sulfated heparin sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. **Virology**. v.397, n.2, p.389-398, 2010.

OLADELE, S.B.; ABDU, P.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N.; USEH, N.M. Preliminary Report on Neuraminidase, Erythrocyte Surface and Free Serum Sialic Acid Concentrations in the Serum of Healthy and Newcastle Disease Virus-Infected Chickens. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**. v.55, n.4, p.265-268, 2002.

OLADELE, S.B.; ABDU, P.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N. Survey for Serum Neuraminidase, Free and Erythrocyte Surface Sialic Acid from Chickens Vaccinated Against Newcastle Disease and the Unvaccinated Chickens Reared under Semi-

Intensive Management System. **International Journal of Poultry Science**. v.6, n.12, p.933-936, 2007.

ORTOLANI-MACHADO, C.F.; FREITAS, P.F.; FARACO, C.D. Melanogenesis in dermal melanocytes of Japanese Silky chicken embryos. **Tissue and Cell**. v.41, p.239-248, 2009.

OZCAN, A.; SENOL, M.; SAGLAN, H.; SEYHAN, M.; DURMAZ, R.; AKTAS, E.; OZEROL, I.H. Comparison of the Tzanck test and polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous herpes simplex and varicella zoster virus infections. **International Journal of Dermatology**. v.46, p.1177-1179, 2007.

PARLAKIAN, A.; GOMAA, I.; SOLLY, S.; ARANDEL, L.; MAHALE, A.; BORN, G.; MARAZZI, G.; SASSOON, D. Skeletal Muscle Phenotypically Converts and Selectively Inhibits Metastatic Cells in Mice. **PLOS One**. v.5, n.2, p.1-14, 2010.

PRABHAKARAN, K.; SHERIDAN, B.S.; KINCHINGTON, P.R.; KHANNA, K.M.; DECMAN, V.; LATHROP, K.; HENDRICKS, R.L. Sensory Neurons Regulate the Effector Functions of CD8⁺ T Cells in Controlling HSV-1 Latency Ex Vivo. **Immunity**. v.23, p.515-525, 2005.

RESKE, A. **The innate immune response to HSV-1: glycoprotein mediated activation of dendritic cells**. Doctoral Thesis. University College London, 2009.

ROMERO, E.L.; PARDO, M.F.; PORRO, S.; ALONSO, S. Sialic acid measurement by a modified Aminoff method: A time-saving reduction in 2-thiobarbituric acid concentration. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v.35, n.2, p.129-134, 1997.

ROSETE, P.G.; ATZÍN, J.A.; SALDAÑA, A.K.; ESPINOSA, B.; URREA, F.J.; VÁSQUEZ, N.A.; LASCURAIN, R. Comportamiento tumoral y glicosilación. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**. v.21, n.4, p.280-287, 2008.

ROSSI, G.; PALTRINIERI, S. Total sialic acid: An acute phase reactant in cats with a possible role in feline coronavirus infection. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.73, n.2, p.144-150, 2009.

RUTISHAUSER, U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**. v.9, n.1, p.26-35, 2008.

SACKS, S.L.; GRIFFITHS, P.D.; COREY, L.; COHEN, C.; CONNINGHAM, A.; DUSHEIKO, G.M.; SELF, S.; SPRUANCE, S.; STANBERRY, L.R.; WALD, A.; WHITLEY, R.J. Introduction: Is viral shedding a surrogate marker for transmission of genital herpes? **Antiviral Research**. v.63S1, p.S3-S10, 2004.

SCHAUER, R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. **Zoology**. v.107, p.49-64, 2004.

SCHAUER, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**. v.19, p.1-8, 2009.

SCHMIDT, M.; VOUTETAKIS, A.; AFIONE, S.; ZHENG, C.; MANDIKIAN, D.; CHIORINI, J.A. Adeno-Associated Virus Type 12 (AAV12): a Novel AAV Serotype with Sialic Acid- and Heparan Sulfate Proteoglycan-Independent Transduction Activity. **Journal of Virology**. v.82, n.3, p.1399-1406, 2008.

SCHWEGMANN-WEBELS, C.; HERRLER, G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. **Glycoconjugate Journal**. v.23, p.51-58, 2006.

SIMMONS, A. Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**. v.186, p.S71-S77, 2002.

SINGH, A.; PREIKSAITIS, J.; ROMANOWSKI, B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. **Canadian Journal of Infectious Disease & Medical Microbiology**. v.16, n.2, p.92-98, 2005.

SOUZA, R.J.S.P.; REZENDE, M.L.; DUARTE, E.M.; MATTEDI, A.P.; CORRÊA, M.P. Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no Estado de São Paulo – Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.84, n.3, p.237-243, 2009.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**. v.6, n.5, p.401-410, 2004.

SPYRIDAKI, M.H.E.; SISKOS, P.A. An improved spectrophotometric method for the determination of free, bound and total N-acetylneuraminic acid in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**. v.327, n.3, p.277-285, 1996.

STRAND, A. Diagnosis of genital herpes: the role and place of HSV testing in clinical practice. **European Clinics in Obstetrics and Gynaecology**. v.2, n.4, p. 181-189, 2007.

SUZUKI, Y.; ITO, T.; SUZUKI, T.; HOLLAND JR, R.E.; CHAMBERS, T.M.; KISO, M.; ISHIDA, H.; KAWAOKA, Y. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. **Journal of Virology**. v.74, n.24, p.11825-11831, 2000.

SVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acid. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.24, p.604-611, 1957.

TANIUCHI, K.; CHIFU, K.; HAYASHI, N.; NAKAMACHI, Y.; YAMAGUCHI, N.; MIYAMOTO, Y.; DOI, K.; BABA, S.; UCHIDA, Y.; TSUKADA, Y.; SUGIMORI, T. A new enzymatic method for the determination of sialic acid in serum and its application for a marker of acute phase reactants. **Kobe Journal of Medical Sciences**. v.27, n.3, p.91-102, 1981.

TANNER, M.E. The enzymes of sialic acid biosynthesis. **Bioorganic Chemistry**. v.33, p.216-228, 2005.

TERUSHKIN, V.; HALPERN, A.C. Melanoma Early Detection. **Hematology Oncology Clinics of North America**. v.23, n.3, p.481-500, 2009.

TEUTON, J. R.; BRANDT, C. R. Sialic Acid on Herpes Simplex Virus Type 1 Envelope Glycoproteins Is Required for Efficient Infection of Cells. **Journal of Virology**. v.81, n.8, p.3731-3739, 2007.

THIES, A.; SCHACHNER, M.; MOLL, I.; BERGER, J.; SCHULZE, H.J.; BRUNNER, G.; SCHUMACHER, U. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. **European Journal of Cancer**. v.38, p.1708-1716, 2002.

TOBIN, D.J.; BYSTRYN, J.C. Different Populations of Melanocytes Are Present in Hair Follicles and Epidermis. **Pigment Cell Research**. v.9, p.304-310, 1996.

ULLOA, F.; REAL, F. X. Differential Distribution of Sialic Acid in α 2,3 and α 2,6 Linkages in the Apical Membrane of Cultured Epithelial Cells and Tissues. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.49, n.2, p.501-509, 2001.

UHLENDORFF, J.; MATROSOVICH, T.; KLENK, H.D.; MATROSOVICH, M. Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. **Archives of Virology**. v.154, p.945-957, 2009.

VARELLA, R. B.; PIRES, I. L.; SARAIVA, C. A.; GUIMARÃES, A. C. C.; GUIMARÃES, M. A. A. M. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.41, n.4, p.257-262, 2005.

VARKI, N.M.; VARKI, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. **Laboratory Investigation**. v.87, p.851-857, 2007.

VARKI, A. Sialic acids in human health and disease. **Trends in Molecular Medicine**. v.14, n.8, p.351-360, 2008.

VARKI, A.; CROCKER, P.R. **Essentials of Glycobiology**. I - Type Lectins. 2^a ed. Nova York, NY: Cold Spring Harbor, 2009.

VESTERGAARD, M. E.; MENZIES, S. W. Automated Diagnostic Instruments for Cutaneous Melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v.27, p.32-36, 2008.

VOORZANGER-ROUSSELOT, N.; GARNERO, P. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses. **Cancer Treatment Reviews**. v.33, p.230-

283, 2007.

VON GUNTEN, S.; BOCHNER, B.S. Basic and Clinical Immunology of Siglecs. **Annals of New York Academy of Sciences**. v.1143, p.61-82, 2008.

VURAL, P.; CANBAZ, M.; SELÇUKI, D. Total and Lipid-Bound Sialic Acid Levels in Actinic Keratosis and Basal Cell Carcinoma. **Turkish Journal of Medical Sciences**. v. 29, p. 419-423, 1999.

WAKIMOTO, H.; JOHNSON, P.R.; KNIPE, D.M.; CHIOCCA, E.A. Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. **Gene Therapy**. v.10, p.983-990, 2003.

WANG, F.L.; CUI, S.X.; SUN, L.P.; QU, X.J.; XIE, Y.Y; ZHOU, L.; MU, Y.L.; TANG, W.; WANG, Y.S. High expression of α 2,3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. **Cancer Detection and Prevention**. v.32, n.5, p.437-447, 2009.

WANG, P.H. Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. **Journal of Cancer Molecules**. v.1, n.2, p.73-81, 2005.

WANG, B. Sialic Acid Is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. **Annual Review of Nutrition**. v.29, p.177-222, 2009.

WARREN, L. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. **The Journal of Biological Chemistry**. v.234, n.8, p.1971-1975, 1959.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**. v.357, p.1513-1518, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO ANIMAL INFLUENZA MANUAL**. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5.

WONGKHAM, S.; BHUDHISAWASHI, V.; CHAU-IN, S.; BOONLA, C.; MUISUK, K.; KONGKHAM, S.; WONGKHAM, C.; BOONSIRI, P.; THUWAJIT, P. Clinical significance of serum total sialic acid in cholangiocarcinoma. **Clinica Chimica Acta**. v.327, p.139-147, 2003.

YANG, R.Y.; RABINOVICH, G.A.; LIU, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v.10, n.17, p.1-24, 2008.

ZHAO, F.; DOU, J.; WANG, J.; CHU, L.; TANG, Q.; WANG, Y.; LI, Y.; CAO, M.; HU, W.; HU, K.; HE, X. F.; GU, N. Investigation on the anti-tumor efficacy by expression of GPI-anchored mIL-21 on the surface of B16F10 cells in C57BL/6 mice. **Immunobiology**. v.215, p.89-100, 2010.

ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
Reconhecida pela Portaria Ministerial nº 708 de 19/05/92 - D.O.U. de 21/05/92
Mantida pela FuRI - Fundação Regional Integrada - CNPJ 96.216.841/0007-03
- URI - Campus de Erechim -

Erechim, 12 de setembro de 2009.

Prezado Senhor

O Comitê de ética em pesquisa da URI – Campus de Erechim, aprovou o projeto de pesquisa registrado sob o número 047/PGA/09, “**ESTUDO DO ÁCIDO SIÁLICO COMO MARCADOR TUMORAL E VIRAL**”, sob responsabilidade do pesquisador DANIELE FERRARI DA ROSA.

Lembramos que um relatório anual, do projeto em andamento, devera ser apresentado ao Comitê de Ética em 20 de novembro de 2010.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Silvana Souza Roman', is written over a horizontal line.

Silvana Souza Roman
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – URI – Campus de Erechim

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](#)