

Aferição da concentração sérica de ácido siálico em novilhas da raça nelore expostas e não expostas à samambaia (*Pteridium aquilinum*)

Mensuration of sialic acid seric level in nelore cattle exposed and non-exposed to bracken fern (*Pteridium aquilinum*)

Mariana Itimura de Camargo¹; Nelson Parizotto Junior²;
Marcos Coelho de Carvalho³; Wilmar Sachetin Marçal^{4*}

Resumo

A *Pteridium aquilinum* é uma planta tóxica, disseminada em vários países do mundo, cuja ingestão continua resulta em doenças com impacto negativo à pecuária bovina. No Paraná, esta presente em 105 dos 399 municípios do Estado. Por essa razão tem-se buscado por meios de controle epidemiológico da intoxicação, já que em algumas localidades do Paraná a planta está disseminada em muitas áreas utilizadas para cria e recria de bovinos. Assim sendo, as instituições de pesquisa do Estado têm buscado meios de diagnóstico precoce, sobretudo da forma clínica Hematúria Enzoótica dos Bovinos. Biomarcadores têm sido utilizados na rotina médica, há anos, para o diagnóstico e controle pós-operatório de pacientes com neoplasias. O número de publicações nesta linha na medicina de animais de companhia tem sido crescente, porém, o tema ainda é pouco estudado como parte da abordagem diagnóstica de bovinos de corte. No caso específico da Hematúria Enzoótica dos Bovinos, estudos prévios comprovaram que a mucina, substância presente no muco vesical, é produzida em quantidades consideráveis na superfície das células tumorais. Estudos prévios apontaram uma relação entre a produção excessiva de mucoproteína em animais com hemangioma de bexiga e a concentração plasmática do ácido siálico, comprovando que o ácido siálico é uma substância associada ao processo inflamatório do desenvolvimento tumoral, o que sugere a possibilidade de seu uso como biomarcador tumoral.

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

Abstract

The *Pteridium aquilinum* is one toxic plant present in several countries of the world. The chronic ingestion causes diseases to livestock with negative economics repercussion. In Paraná state the *Pteridium aquilinum* is present in 105 out 399 municipal districts existents. The high occurrence of the plant in many areas of the Paraná state and the wrong utilization of these areas for cattle breed increase the importance of research that look for means that epidemic control of intoxication. Because that research institutions in the Paraná state have looking for means to advance in diagnosis methods, especially to cattle suffering from Bovine Enzootic Hematuria. The biomarkers have been used in the diagnosis and postoperative follow-up of tumor in the human beings in a routinely bases for years. Researches about this subject were crescent in the medicine of companion animals, however still incipient about cattle. Specifically in the Bovine Enzootic Hematuria were verified that mucin, a substance present

¹ Graduanda em Medicina Veterinária pela UEL, Bolsista PIBIQ/CNPq . E-mail: mari_itimura@hotmail.com.

² Graduando em Medicina Veterinária pela UEL, Bolsista IC/UEL

³ Mestrando do Programa em Ciência Animal da UEL

⁴ Docente-Orientador UEL

* Autor para correspondência

in the mucus from the mucosal surface of bladder, is produced by tumoral cells in reasonable accounts. Previous reports verified one relationship between the excessive mucus protein production by the bladder with hemangioma and high plasmatic concentration of the sialic acid. This suggests that sialic acid is associated with inflammatory response of the tumoral growth, and might be used such as tumoral biomarker.

Key words: *Pteridium aquilinum*, sialic acid, biomarker, cattle

Introdução

A samambaia (*Pteridium aquilinum*) é um dos principais vegetais tóxicos existentes, com ampla distribuição mundial, incluindo o Brasil. No Paraná é uma das plantas tóxicas que mais causa prejuízos econômicos à pecuária bovina. A planta ocorre em 105 dos 399 municípios do estado (POLACK, 1990; FERREIRA, 1996). Embora em algumas fazendas as pastagens sejam renovadas, a samambaia ainda persiste, em proporções que variam de brotos quase imperceptíveis a arbustos bem desenvolvidos (OLIVEIRA; MATSUMOTO; PRIMAVESI, 1998).

Por conta dos prejuízos econômicos que a samambaia causa a atividade pecuária, tem-se pesquisado meios de controle epidemiológico, visto que a planta esta disseminada em varias localidades do Paraná nas quais muitos pecuaristas utilizam as áreas infestadas como pastagem para cria e recria.

O diagnostico precoce é importante para o desenvolvimento de programas de controle da planta, assim como de medidas para redução dos prejuízos causados pela intoxicação crônica. Por conta disso as instituições de pesquisa do Estado buscam formas de antecipar o diagnóstico, sobretudo da forma clínica de Hematúria Enzoótica Bovina.

Na medicina, há anos os biomarcadores têm sido utilizados na rotina de diagnóstico e no controle pós-operatório de pacientes com neoplasias. Na medicina veterinária, é crescente o número de estudos sobre a utilização de biomarcadores em medicina de animais de companhia, porém, esta tecnologia de diagnóstico ainda é pouco difundida na bovinocultura. Todavia, no caso da Hematúria Enzoótica dos Bovinos, estudos prévios apontaram que a mucina, uma mucoproteína presente no muco da bexiga, é produzida na superfície de células tumorais em quantidades consideráveis. O estudo realizado por

Singh, Joshi e Ray (1980) apontou a existência de relação entre a produção excessiva de mucoproteína em animais com hemangioma de bexiga e a concentração plasmática de ácido siálico, comprovando que o ácido siálico é uma substancia importante associada ao processo inflamatório do desenvolvimento tumoral. Makimura e Usui (1990) observaram também uma relação entre a concentração sérica do ácido siálico e o aumento da contagem de neutrófilos em bovinos com doenças inflamatórias. Manohar et al. (1993) relataram haver uma importante associação entre a concentração sérica do ácido siálico livre, ou ligado a lipídios, com o carcinoma etmoidal em bovinos, sugerindo também a participação do ácido siálico no processo inflamatório e desenvolvimento tumoral.

Localizados nas posições terminais de glicoconjugados da superfície celular, o ácido siálico está envolvido em processos biológicos fundamentais, mas em funções diferentes daquelas normalmente atribuídas a carboidratos, como o amido e o glicogênio por exemplo, que armazenam energia; ou como componentes de blocos estruturais, como quitina e celulose (DAWRA et al., 1988). Exemplos do envolvimento dos ácidos siálicos em processos biológicos incluem as funções de mediadores na adesão inter-celulares e na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus, entre outras (SHERBLOM et al., 1988).

Comparar a concentração plasmática ácido siálico em novilhas sujeitas à intoxicação pela samambaia com aquelas encontrados em novilhas sadias, é a fase inicial de uma pesquisa que visa levantar informações sobre a adequação do emprego do ácido siálico como biomarcador para o diagnostico precoce da Hematúria Enzoótica dos Bovinos e gerar produtos para mensuração desse açúcar.

Material e Métodos

Seleção dos animais

Neste estudo foram avaliados dois grupos distintos de novilhas da raça Nelore. O grupo controle (G1) foi composto por 29 novilhas sadias, nascidas em propriedade rural isenta de samambaia e sem histórico de ocorrência de hematúria, situada no município de Amaporã, estado do Paraná. O segundo grupo (G2) foi 28 composto por novilhas, nascidas e criadas em propriedade rural com pastagens infestadas pela *Pteridium aquilinum*, situada no município de São Jerônimo da Serra. Os animais de ambos os grupos tinham de 16 a 24 meses de idade. Nas propriedades os animais foram selecionados para comporem os grupos de forma aleatória.

Colheita do material

Foram colhidas amostras de 10 mL de urina, durante micção espontânea estimulada por leve massagem vulvar. As amostras foram submetidas a exame físico, químico, e análise do sedimento. No exame físico caracterizou-se o volume, a cor, o aspecto, o odor e a densidade. O exame químico foi realizado por meio de tiras reagentes (Combur test), analisando-se conteúdo de proteína, urobilinogênio e hemoglobina. A análise do sedimento urinário foi realizada para pesquisa de microhematúria, detectada pela presença de eritrócitos na urina (MARÇAL et al., 2002).

As urinálises foram realizadas seguindo a técnica descrita por Addis, citada por Levinson e McFate (1969) e Vallada (1981). As amostras foram centrifugadas a 1800 rpm durante cinco minutos, em seguida foi desprezado o sobrenadante (9mL), restando 1mL de urina mais os sedimentos. Foi

realizada em seguida, a homogeneização e o preenchimento da câmara de *Neubauer* e realizada, utilizando microscópio óptico em aumento de 400X, a contagem das células presentes no quadrante central da câmara (MARÇAL et al., 2001).

O sangue para mensuração do ácido siálico foi coletado da veia coccígena, por meio de agulhas descartáveis e tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Após dessorar, os materiais foram colocados dentro de caixas de isopor com crioprotetores, para manutenção das estruturas organolépticas. Em alguns casos houve a necessidade centrifugar as amostras a 3000 rpm, por cinco minutos, para obtenção do soro. O armazenamento foi feito em tubos do tipo *Ependorf*, que foram alocados em freezer em temperatura inferior a -30°C.

A quantificação do ácido siálico no soro foi feita por espectrofotometria, utilizando equipamento Espectronic Hélios α , Computadorizado, Duplo Feixe Termoestabilizado pertencente ao Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina-PR. A metodologia de análise foi feita com base nas descrições de Singh, Joshi e Ray (1980), considerando o método do tiobarbitúrico (ATROSHI; SANKARI; WESTERMARCK, 1990).

Resultados

No exame físico e análise do sedimento da urina foi constatado que todas as novilhas do G2 apresentavam hematúria ou microhematúria, enquanto nenhum dos animais do grupo controle (G1) apresentava tais alterações. Os resultados das determinações da concentração sérica de ácido siálico obtidos em cada grupo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de registro dos animais do G1 (novilhas saudias, não expostas à samambaia) e G2 (novilhas com microhematúria ou hematúria e expostas a samambaia), e respectivas concentrações séricas, média e desvio padrão da média.

| Valores de acido siálico sérico | | | |
|---|----------------------|--|----------------------|
| Novilhas saudias, não expostas a samambaia (G1) (n = 29) | | Novilhas expostas a samambaia (G2) (n = 28) | |
| n. | Acido siálico (mg/L) | n. | Acido siálico (mg/L) |
| 145 | 1,080 | 102 | 1,123 |
| 190 | 0,286 | 112 | 0,436 |
| 179 | 0,601 | 121 | 0,751 |
| 197 | 0,157 | 129 | 0,493 |
| 83 | 0,400 | 130 | 1,115 |
| 229 | 0,486 | 133 | 0,179 |
| 22 | 0,543 | 136 | 0,894 |
| 99 | 0,715 | 140 | 0,515 |
| 192 | 0,965 | 142 | 0,787 |
| 111 | 0,622 | 147 | 0,608 |
| 82 | 0,450 | 149 | 0,451 |
| 242 | 0,694 | 151 | 0,851 |
| 216 | 0,143 | 153 | 0,708 |
| 204 | 0,536 | 154 | 0,665 |
| 198 | 0,515 | 156 | 0,658 |
| 230 | 0,622 | 157 | 0,522 |
| 110 | 0,329 | 160 | 0,529 |
| 193 | 0,565 | 163 | 1,073 |
| 191 | 0,629 | 165 | 0,551 |
| 243 | 0,665 | 166 | 0,422 |
| 222 | 0,586 | 168 | 0,651 |
| 144 | 0,157 | 170 | 0,572 |
| 131 | 0,672 | 173 | 0,243 |
| 109 | 0,315 | 174 | 0,279 |
| 150 | 0,944 | 177 | 0,586 |
| 98 | 0,551 | 178 | 0,293 |
| 194 | 0,508 | 180 | 0,572 |
| 35 | 0,665 | 115 | 1,008 |
| 12 | 0,579 | | |
| Media | 0,551 ^a | | 0,625 ^a |
| Desvio padrão | 0,224 | | 0,255 |

^a diferença sem significância estatística (P = 0,242)

Discussão

A utilização de biomarcadores no diagnóstico e controle de doenças neoplasias em bovinos tem sido pouco estudada e difundida. Para tal, é necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam o estudo do envolvimento do ácido siálico com tais doenças envolvendo as espécies destinadas a exploração pecuária. A consolidação do ácido siálico como biomarcador de doenças neoplásicas é de fundamental importância, para o desenvolvimento de

produtos comerciais para uso rotineiro de mensuração deste açúcar, como metodologia viável e de emprego prático.

Neste sentido, visando avaliar a exigüidade de método laboratorial para dosagem e utilização do ácido siálico como biomarcador, procedeu-se a um ensaio para a padronização laboratorial da técnica e para determinar a concentração sérica deste açúcar, no soro de novilhas clinicamente saudias, e comparar estes valores com os verificados no soro de animais

da mesma faixa etária, porém expostas a samambaia, e que se observou que apresentavam hematúria ou microhematúria.

Pela mensuração bioquímica do ácido siálico o grupo controle apresentou média de 0,551mg/L, enquanto que no grupo de novilhas com microhematúria/hematúria a média foi ligeiramente superior, de 0,625mg/L. Esses resultados são semelhantes aos reportados por Singh, Joshi e Ray (1980) e Makimura e Usui (1990). Todavia, os valores numéricos são diferentes dos apresentados por estes autores, por fatores que deverão ser esclarecidos em ensaios de padronização metodológica.

A dosagem bioquímica da concentração do ácido siálico no soro de bovinos mostrou-se exequível e passível de ser utilizada como técnica laboratorial rotineira para auxílio diagnóstico e estudos epidemiológicos. Ainda assim, a validade de seu uso como biomarcador para a espécie em questão, necessita de outras avaliações, haja vista que as médias dos dois grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P = 0,242$). Porém, há que ser considerado que o número de animais dos grupos pode ter influenciado o resultado. Além disso, não foi possível avaliar se os critérios de inclusão nos grupos (exposição ou não a samambaia e presença ou não de hematúria), dentre os animais utilizados, apresentavam relação direta com a presença ou não processo inflamatório ou de neoplasia vesical. Assim, ensaios posteriores deverão elucidar outros aspectos referentes ao estudo deste tema.

Mensurar e padronizar a técnica de mensuração da concentração do ácido siálico no soro sanguíneo dos bovinos criados no estado do Paraná é um passo importante na busca do diagnóstico precoce tanto da Hematúria Enzoótica como também de outras doenças neoplásicas ou inflamatórias que acometem os bovinos, visto que estas enfermidades ainda representam expressiva parcela de perdas econômicas na pecuária paranaense.

Conclusão

Com base nos resultados preliminares obtidos, os autores concluíram que a técnica laboratorial empregada é factível, passível de utilização na rotina clínica, e que os valores de ácido siálico mensurados no sangue de novilhas com microhematúria/hematúria foram superiores aos encontrados nas novilhas sadias.

Estas informações certamente nortearão ensaios e pesquisas complementares para se viabilizar o uso do ácido siálico como biomarcador tumoral para utilização na medicina veterinária.

Referências

- ATROSHI, F.; SANKARI, S.; WESTERMARCK, T. Sialic acid behaviour during inflammatory disease in cattle with special reference to bovine mastitis. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL CLINICAL BIOCHEMISTRY, 4., 1990, Davis. *Proceedings...* Davis: University of California, 1990. p. 254.
- DAWRA, R. K.; SHARMA, O. P.; VAID, J.; KRISHNA, L. Erythrocyte membrane alterations in enzootic bovine hematuria. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, Westbury, v. 61, n. 3, p. 421-424, 1988.
- FERREIRA, J. C. V. *O Paraná e seus municípios*. Maringá: Memória Brasileira, 1996.
- LEVINSON, S. A.; McFATE, R. P. *Clinical laboratory diagnosis*. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1969.
- MAKIMURA, S.; USUI, M. Correlation between haptoglobin and sialic acid or mucoprotein in diseased bovine serum. *Japanese Journal of Veterinary Science*, Tokyo, v. 52, n. 6, p. 1245-1250, 1990.
- MANOHAR, B. M.; SUNDARARAJ, A.; NAGARAJAN, B.; SHANMUGAM, V. Biochemical markers in the diagnosis of ethmoid carcinoma in cattle. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v. 70, n. 1, p. 14-16, 1993.
- MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; MONTEIRO, F. A. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná – Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 27-32, jul./dez. 2001.

_____. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Abbeerden angus. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 77-81, 2002.

OLIVEIRA, G. P.; MATSUMOTO, T.; PRIMAVESI, A. C. Ocorrência de intoxicação causada por samambaia (*Pteridium aquilinum*) na região nordeste do Paraná. *Comunicado Técnico Embrapa*, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 1-9, out. 1998.

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

SHERBLOM, A. P.; BHARATHAN, S.; HALL, P. J.; SMAGULA, R. M.; MOODY-CE; ANDERSON, G. W. Bovine serum sialic acid: age-related changes in type and content. *International Journal of Biochemistry*, Oxford, v. 20, n. 10, p. 1177-1183, 1988.

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

VALLADA, E. P. Exame quantitativo do sedimento urinário. In: _____. *Manual de exames de urina*. 3.ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1981. p. 89-95.