

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**EFEITOS DA INCLUSÃO DE *GRACILARIA VERMICULOPHYLLA* NA
DIETA DE BORREGAS BORDALEIRAS DO ENTRE-DOURO E MINHO E
CHURRAS GALEGAS BRAGANÇANAS NAS RESPOSTAS
PRODUTIVA E IMUNITÁRIA**

Joana Pedro Ferreira Carvalho Portal Oliveira

Orientadora

Prof.^a Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita

Coorientadores

Prof.^o Doutor Manuel João Rua Vilanova

Prof.^o Doutor António José Mira da Fonseca

Porto 2015

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**EFEITOS DA INCLUSÃO DE *GRACILARIA VERMICULOPHYLLA* NA
DIETA DE BORREGAS BORDALEIRAS DO ENTRE-DOURO E MINHO E
CHURRAS GALEGAS BRAGANÇANAS NAS RESPOSTAS
PRODUTIVA E IMUNITÁRIA**

Joana Pedro Ferreira Carvalho Portal Oliveira

Orientadora

Prof.^a Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita

Coorientadores

Prof.^o Doutor Manuel João Rua Vilanova

Prof.^o Doutor António José Mira da Fonseca

Porto 2015

O trabalho que agora se apresenta foi realizado com o apoio de fundos do Programa Operacional de Fatores de Competitividade (COMPETE) e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) no âmbito dos projetos EXPL/CVT-NUT/0286/2013 e UID/QUI/50006/2013.

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Resumo

O presente ensaio teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão da macroalga *Gracilaria vermiculophylla* na dieta de borregas em crescimento, de duas raças autóctones, nas respostas produtiva e imunológica adquirida. O ensaio envolveu dez borregas da raça Churra Galega Bragançana e dez borregas da raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho, e teve a duração de nove semanas. Os animais foram alimentados com uma dieta constituída por feno prado natural suplementado com uma mistura de matérias-primas sem inclusão de alga ou com inclusão de alga a 12,5%. Todos os animais foram imunizados duas vezes com proteína de membrana de *Neospora caninum* juntamente com o adjuvante CpG (citosina-fosfato-guanina), intervaladas quinze dias. A resposta celular foi determinada *in vitro* através da avaliação da proliferação celular por citometria de fluxo de células mononucleares de sangue periférico e de células dos gânglios linfáticos parotídeo e mesentérico, e por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) a produção de citocinas (interleucina-10 e interferão-gama) pelas mesmas. A resposta humoral foi avaliada *in vitro* por ELISA através da determinação dos títulos de imunoglobulinas M e G em soro e a imunoglobulina A em saliva. Foi também avaliado o efeito da dieta na quantidade de antioxidantes presentes no plasma. Constatou-se que a inclusão da alga na dieta provocou a diminuição da ingestão de alimento e, conseqüentemente, uma redução do ganho médio diário de peso vivo. Porém, a inclusão da alga na dieta sugeriu promover a resposta celular a estímulos específicos e a produção de citocinas anti-inflamatórias (interleucina-10). Verificou-se que não influenciou os níveis de imunoglobulinas e de antioxidantes plasmáticos. Aferiu-se existir elevada variabilidade nas respostas entre as duas raças e entre animais da mesma raça. Embora os efeitos positivos da inclusão da alga sobre a imunidade sejam aparentes, são necessários mais estudos para elucidar esta relação e para fornecer respostas previsíveis.

Palavras-Chave: antioxidantes, citocinas, *Gracilaria vermiculophylla*, imunização intranasal, imunoglobulinas, ovinos

Abstract

This trial aimed to evaluate the effect of dietary inclusion of the seaweed *Gracilaria vermiculophylla* on the productive and acquired immune response of growing lambs. The trial involved ten female lambs of Churra Galega Bragançana breed and ten lambs of Bordaleira do Entre-Douro e Minho breed, and lasted for nine weeks. The animals were fed a diet consisting of natural hay meadow supplemented with a mixture of raw materials without the inclusion of seaweed or including 12.5% of seaweed. All animals received two immunizations with membrane protein of *Neospora caninum* with CpG adjuvant (cytosine-phosphate-guanine) spaced fifteen days. The cellular response was analysed *in vitro* by assessing the cell proliferation by flow cytometry of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The production of cytokines (interleukin-10 and interferon-gamma) by the PBMC and cells of parotid and mesenteric lymph nodes was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The humoral response was evaluated *in vitro* by ELISA by titrated antigen-specific antibodies immunoglobulin M and G in serum and immunoglobulin A in saliva. It was also tested the effect of diet in plasma antioxidants amounts. It was found that the dietary inclusion of seaweed promoted a decrease in feed intake and consequently decreased average daily weight gain. Although, the inclusion suggested to promote the cellular response to specific stimuli and the production of anti-inflammatory cytokines (interleukin-10). It was shown that diet with seaweed didn't influence the levels of immunoglobulins and plasma antioxidants. A high variability in responses between the two breeds and between animals of the same breed was observed. Although the positive effects of inclusion of seaweed on immunity are apparent, further research is needed to elucidate this relationship and to provide predictable responses.

Keywords: antioxidants, cytokines, *Gracilaria vermiculophylla*, lambs, immunoglobulins, intranasal immunization

Agradecimentos

Sendo este trabalho o último passo de um percurso de seis anos tão fugaz, mas ao mesmo tempo tão intenso, não poderia deixar de incluir nele um agradecimento especial a todos os que, à sua maneira, para ele contribuíram e me acompanharam ao longo desta caminhada. Deste modo, agradeço:

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Prof.^a Doutora Rita Cabrita, por me ter possibilitado este estágio, por toda a orientação, disponibilidade, atenção, paciência e apoio prestado ao longo do mesmo.

Aos meus coorientadores, Prof. Doutor António Mira da Fonseca e Prof. Doutor Manuel Vilanova, pela formação que me deram durante o percurso académico, bem como conselhos, instruções e orientações fornecidas ao longo deste trabalho.

À Prof.^a Doutora Carla Mendonça e ao Prof. Doutor Paulo Cortez, pela formação que me deram durante o percurso académico e pela disponibilidade e apoio prestado ao longo deste trabalho.

À Raquel, ao Cláudio e ao Pedro pela simpatia, boa disposição, disponibilidade e ajuda imprescindível nos trabalhos realizados no Campus Agrário de Vairão.

À Alexandra Correia e ao Pedro Ferreirinha pela simpatia, disponibilidade, paciência em esclarecer as minhas dúvidas e pela ajuda imprescindível nos trabalhos realizados no laboratório.

À Sílvia Azevedo e à Margarida Maia pela simpatia, boa disposição, disponibilidade e prestabilidade ao longo deste trabalho.

À Encarnação, Joana Alves, Tânia e Virgínia pela boa receção no laboratório, boa disposição e prestabilidade.

A todos os Professores da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Técnica de Lisboa, e do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto, que contribuíram decisivamente para a minha formação académica, profissional e pessoal.

Aos colegas e amigos com quem tive todo o prazer em trocar experiências e saberes ao longo destes seis anos.

À família pelo apoio e pelo incentivo incondicionais dados para enfrentar os desafios que foram surgindo ao longo deste percurso e por toda a paciência demonstrada.

Índice

	Pág.
Resumo	iii
Abstract	viii
Agradecimentos	ix
Lista de Abreviaturas	xiv
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. Macroalgas.....	2
2.2. Propriedades/atividades biológicas das macroalgas	4
3. Trabalho Experimental	7
3.1. Objetivos	7
3.2. Materiais e Métodos	7
3.2.1. Animais e alojamento	7
3.2.2. Dietas experimentais.....	8
3.2.3. Tratamentos médico-veterinários	9
3.2.4. Amostragem.....	9
3.2.5. Análises químicas	10
3.2.6. Parasitas	10
3.2.7. Isolamento de parasitas	10
3.2.8. Extração das proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i>	11
3.2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de detergente aniônico dodecil sulfato de sódio	11
3.2.10. Imunização.....	11
3.2.11. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico.....	12
3.2.12. Análise da proliferação de células mononucleares do sangue periférico.....	12
3.2.13. Culturas de células isoladas dos gânglios parotídeos e mesentéricos	13

3.2.14.	Deteção de anticorpos específicos para antígenos de membrana de <i>Neospora caninum</i> por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	13
3.2.15.	Deteção de citocinas por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	13
3.2.16.	Análise da capacidade antioxidante total.....	14
3.2.17.	Análise da peroxidação lipídica	14
3.2.18.	Análise estatística.....	14
3.3.	Resultados e Discussão	15
3.3.1.	Dietas experimentais	15
3.3.2.	Ingestão voluntária e crescimento	16
3.3.3.	Parâmetros hematológicos	18
3.3.4.	Proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i>	18
3.3.5.	Proliferação celular	19
3.3.6.	Citocinas interleucina-10 e interferão-gama.....	23
3.3.7.	Imunoglobulinas A, M e G.....	26
3.3.8.	Antioxidantes plasmáticos totais.....	26
3.3.9.	Peroxidação lipídica.....	28
4.	Considerações finais	29
5.	Bibliografia	30
6.	Anexos	37

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	4
Figura 2. Cronograma das tarefas realizadas durante o ensaio experimental.....	7
Figura 3. Efeito da raça no peso vivo das borregas, ao longo do ensaio	18
Figura 4. Efeito da dieta no peso vivo das borregas, ao longo do ensaio.....	18
Figura 5. Perfil de migração eletroforética das proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i>	18
Figura 6. Análise da proliferação celular por citometria de fluxo	19
Figura 7. Percentagem de células com pelo menos uma divisão celular após estimulação com concanavalina A, em relação às células não estimuladas.	20
Figura 8. Percentagem de células com pelo menos uma divisão celular após estimulação com proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i> , em relação às células não estimuladas	22
Figura 9. Percentagem de células com pelo menos uma divisão celular após estimulação com proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i> , em relação às células não estimuladas	22
Figura 10. Concentração de citocina interleucina-10, nos sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico cultivadas durante 72 horas estimuladas com concanavalina A.....	24
Figura 11. Concentração de citocina interleucina-10, nos sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico cultivadas durante 72 horas estimuladas com proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i>	24
Figura 12. Concentração de citocina interferão-gama, nos sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico cultivadas durante 72 horas estimuladas com concanavalina A.....	25

Índice de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Composição ponderal das misturas de matérias-primas utilizadas no ensaio experimental.....	8
Tabela 2. Composição química das misturas de matérias-primas e do feno de prado natural fornecidos durante o ensaio.....	16
Tabela 3. Efeito da raça e da dieta na ingestão voluntária e no ganho médio diário de peso vivo.....	17
Tabela 4. Efeito da raça, da dieta e do período na proliferação celular e produção de citocinasinterleucina-10 e interferão-gama de células mononucleares de sangue periférico e células dos gânglios quando estimuladas com concanavalina A, proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i> e taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>	21
Tabela 5. Efeito da raça, da dieta e do período na concentração sérica de imunoglobulinas A e M, e concentração plasmática de antioxidantes totais.	27
Tabela 6. Efeito da raça, da dieta e do período nos parâmetros hematológicos.....	37

Lista de Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ADF	Fibra de detergente ácido
ADL	Lenhina de detergente ácido
ADLom	Lenhina de detergente ácido isenta de cinza
ALGA	Dieta com 12,5% de inclusão de <i>Gracilaria vermiculophylla</i> na mistura de matérias-primas
BEDM	Bordaleira do Entre-Douro e Minho
BSA	Albumina sérica bovina
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CGB	Churra Galega Bragançana
Cl	Cloro
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
CONT	Dieta sem inclusão de <i>Gracilaria vermiculophylla</i> na mistura de matérias-primas
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
EDTA	Ácido etileno di-amina tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FBS	Soro bovino fetal
GB	Gordura bruta
GLM	Modelo linear (<i>Generalized Linear Model</i>)
GMD	Ganho médio diário de peso vivo
Hepes	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
HRP	Avidina conjugada com peroxidase

IFN- γ	Interferão gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA-TBA	Malondialdeído-ácido tiobarbitúrico
MEM	Meio mínimo essencial (<i>Minimum essential medium</i>)
mM	Milimolar
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N	Azoto
Na	Sódio
NcMP	Proteínas de membrana de <i>Neospora caninum</i>
NcT	Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>
NDF	Fibra de detergente neutro
NDFom	Fibra de detergente neutro isenta de cinza
nM	Nanomoles
ODN	Oligodesoxinucleótidos
p	Probabilidade
PB	Proteína bruta
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PO	Via oral (latim: <i>per os</i>)
PV	Peso vivo

PV ^{0,75}	Peso vivo metabólico
RPMI	Meios <i>Rosweel Park Memorial Institute</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SC	Subcutâneo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de detergente aniônico dodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TST	<i>Tris Saline Tween 20</i>

1. Introdução

As macroalgas são organismos eucariotas fotossintéticos multicelulares que, de acordo com a sua pigmentação, são classificados em vermelhas (*Rhodophyta*), castanhas (*Phaeophyta*) e verdes (*Chlorophyta*) (McHugh 2003, Gupta & Abu-Ghannam 2011). Apesar de maioritariamente utilizadas para consumo humano e extração de hidrocoloides (Guiry 2015a), o seu uso como potencial fonte de compostos nutracêuticos e farmacêuticos tem aumentado (Mendes 2012), dado o seu teor em metabolitos biologicamente ativos (Ely *et al.* 2004).

O uso de macroalgas na alimentação animal, embora existente de forma natural em algumas regiões específicas (Allen *et al.* 2001), tem vindo a ser avaliado de modo crescente, sobretudo sob duas perspetivas: como recurso alimentar alternativo e como potencial promotor do sistema imunitário. Com efeito, a alta dependência da União Europeia em fontes proteicas importadas de países terceiros tem motivado a procura de fontes alternativas produzidas localmente que permitam assegurar o fornecimento de proteína e energia a um custo inferior. Adicionalmente, o crescente interesse público e legislativo relativamente à tendência para evitar a utilização de “produtos químicos”, como os antibióticos, na produção animal (Breithaupt 2007), assim como a preocupação com as antibiorresistências, exigem a busca de alternativas. As macroalgas, constituem um recurso natural que possui compostos biologicamente ativos, que podem estimular/fortalecer o sistema imunitário dos animais (aspeto particularmente importante em animais de alta produção) evitando a utilização excessiva de compostos químicos (*e.g.*, antibióticos; Bansemir *et al.* 2006, Wang *et al.* 2009, Katayama *et al.* 2011).

Neste sentido, foi realizado um ensaio com o objetivo de determinar o efeito da inclusão da macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, na dieta de borregas em crescimento, de duas raças autóctones, nas respostas produtiva e imunológica adquirida. Pretendeu-se avaliar quantitativamente a resposta imunológica humoral e celular de borregas alimentadas com duas dietas diferentes (com e sem alga), bem como analisar o efeito da dieta na quantidade de oxidantes/antioxidantes presentes no plasma.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Macroalgas

A produção de plantas aquáticas, nomeadamente as algas marinhas, alcançou os 24,9 milhões de toneladas em 2012, dos quais 23,8 milhões de toneladas (96%) advêm da aquacultura (FAO 2014). Os doze principais países produtores são: China, França, Reino Unido, Japão, Chile, Filipinas, Coreia, Indonésia, Noruega, Estados Unidos da América (EUA), Canadá e Irlanda. A captura de algas selvagens não mudou muito nos últimos doze anos, mas a aquacultura (incluindo a aquacultura integrada) está a aumentar incessantemente (Anónimo 2015).

A indústria de algas, a nível mundial, fornece uma ampla variedade de produtos que têm um valor total anual estimado em 5 a 5,5 mil milhões de euros. Os produtos alimentares destinados ao consumo humano contribuem com cerca de 4,5 mil milhões de euros (McHugh 2003). Substâncias como os hidrocolóides, extraídos das algas, são responsáveis por uma grande parte dos restantes milhões de euros, enquanto diversos usos menores, tais como produtos farmacêuticos e cosméticos, tratamento de efluentes de esgotos, fertilizantes do solo, biomassa para combustível e aditivos para alimentação animal, compõem o remanescente (McHugh 2003, Hasan & Chakrabarti 2009).

As algas são um grupo vasto de organismos aquáticos que apresentam elevada diversidade morfológica e estrutural. A complexidade de formas deste grupo de organismos é grande, sendo possível encontrar desde espécies unicelulares, flagelados microscópicos até algas marinhas gigantes com mais de cinquenta metros de comprimento. A sua reprodução e distribuição, uma vez que não têm flores nem sementes, realizam-se por esporos assexuados que são estruturas mais simples do que as sementes (Walford 1958). Apesar de não possuírem raízes, encontram-se ancoradas ao substrato por uma estrutura discóide e absorvem, através dos seus filamentos, diretamente da água, os nutrientes minerais de que necessitam (Walford 1958, Seenivasan *et al.* 2010). Tal como as plantas terrestres, as algas possuem clorofila, pelo que utilizam a energia da luz solar para realizar a fotossíntese e sintetizarem hidratos de carbono, proteínas e lípidos a partir de água, dióxido de carbono (CO₂) e outros compostos químicos inorgânicos (Lee 2008). Embora sejam encontradas no meio terrestre húmido, é nas águas doces e marinhas que as algas são mais abundantes, crescendo sobre rochas, corais mortos, seixos e outras plantas (Walford 1958, Seenivasan *et al.* 2010).

Existem, principalmente, dois tipos de algas: as macroalgas, organismos multicelulares macroscópicos polifiléticos eucariontes que ocupam maioritariamente a zona litoral, e as microalgas, organismos unicelulares microscópicos polifiléticos procariontes e eucariontes que

são encontrados em *habitats* bentônicos e litorais, bem como ao longo do oceano como fitoplâncton (McHugh 2003, Gupta & Abu-Ghannam 2011).

Já foram identificadas cerca de 9500 espécies de macroalgas. Estas podem ser classificadas em três grupos distintos, de acordo com a coloração: (i) algas verdes (ca. 1500 espécies); (ii) algas castanhas (ca. 1800 espécies); e (iii) algas vermelhas (ca. 6200 espécies) (Maehre *et al.* 2014, Guiry 2015a). Estes grupos são referidos pelos botânicos como *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae* e *Rhodophyceae*, respetivamente (McHugh 2003).

As algas castanhas são geralmente grandes, desde algas marinhas gigantes com mais de cinquenta metros de comprimento, passando por espécies espessas de dois a quatro metros de comprimento, até espécies menores de trinta a sessenta centímetros de comprimento. As algas castanhas são amplamente distribuídas, mas são mais abundantes em mares temperados e frios. As algas vermelhas são usualmente menores, variando de poucos centímetros até cerca de um metro de comprimento. Em geral, surgem em águas mais profundas do que as algas castanhas, estendendo-se desde a zona intertidal até cento e trinta metros de profundidade. Estas são também amplamente distribuídas, contudo são mais abundantes em climas temperados. As algas verdes são, também, pequenas, com uma diversidade de tamanho semelhante às algas vermelhas, e encontram-se distribuídas maioritariamente em água doce (Walford 1958, McHugh 2003, Guiry 2015a).

Dado que no estudo que agora se apresenta, foi utilizada uma macroalga pertencente ao filo *Rhodophyta* (algas vermelhas), serão apenas detalhadas as características deste filo. Este é um dos mais antigos grupos de algas eucariotas, tendo sido identificadas até há data mais de 6000 espécies (Walford 1958, Oliveira & Bhattacharya 2000, Guiry 2015b). As espécies do filo *Rhodophyta* contêm uma variedade de pigmentos, incluindo a clorofila a, as ficobiliproteínas, a ficocianina azul, os carotenos, a luteína, a zeaxantina e a ficoeritrina vermelha, sendo este último o que lhe confere a coloração vermelha, uma vez que reflete a luz no comprimento de onda correspondente à cor vermelha e absorve o correspondente à cor azul (Gupta & Abu-Ghannam 2011, Lopes 2014). Ao contrário dos outros filios, e graças aos seus pigmentos fotossintéticos que absorvem a luz no comprimento de onda correspondente à cor azul, estas algas têm a capacidade de viver abaixo de duzentos metros de profundidade no oceano (Lopes 2014).

Este filo contém um grande grupo de espécies que predominam nas áreas de plataformas costeiras e continentais das regiões tropical, temperada e de água fria (McHugh 2003). As algas vermelhas são ecologicamente significativas como produtores primários, prestadoras de *habitat* estrutural para outros organismos marinhos e desempenham um papel importante no estabelecimento primário e manutenção dos recifes de coral (Freshwater 2000). Algumas delas são economicamente importantes como fornecedoras de alimentos e géis. Por esta razão, a

aquacultura extensiva e a recolha natural de algas vermelhas ocorre em inúmeras áreas do mundo (Freshwater 2000).

A família *Gracilariaceae*, pertencente ao filo *Rhodophyta* (Ordem *Gracilariales*, Classe *Florideophyceae*), inclui os géneros *Ceramianthemum*, *Congracilaria*, *Corallopsis*, *Curdiea*, *Flagellaria*, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *Hydropuntia*, *Melanthalia*, *Plocaria*, *Polycavernosa*, *Sarcocladia* e *Tyleiophora*. Dentro do género *Gracilaria* estão compreendidas cerca de 173 espécies, entre as quais se encontra a alga em estudo, *Gracilaria vermiculophylla* (Figura 1), também conhecida como *Gracilaria asiatica*, que foi identificada pela primeira vez em 1967 por Papenfuss (Guiry 2015b). É uma macroalga cartilaginosa cilíndrica de forma irregular que pode crescer até cinquenta centímetros de comprimento. A sua cor varia de castanho a vermelho-escuro e a cinzento, dependendo da disponibilidade de luz solar, podendo ser confundida com algumas algas castanhas. Pode ser muito ou pouco ramificada consoante o seu crescimento e o facto de estar ou não ancorada. Esta espécie possui um órgão de fixação em forma de disco, compacto, encrostado, fino e achatado contra o substrato. O talo apresenta textura muito dura e elástica, sendo subdicotómico ou irregularmente ramificado (Rueness 2005, Nyberg & Wallentinus 2009).



Figura 1. *Gracilaria vermiculophylla* (Guiry 2015b).

Esta alga é perene e tolerante a condições de stresse, uma vez que é capaz de crescer numa elevada gama de temperaturas (5-35°C), de intensidades de luz e de salinidade (Rueness 2005). As condições ótimas de crescimento são entre 15-25°C, sendo também tolerante a outras condições de stresse, como sedimentação, dessecação e baixa disponibilidade de nutrientes (Rueness 2005, Nyberg & Wallentinus 2009). Verificou-se, em laboratório, que esta alga possui a capacidade de sobreviver na escuridão completa durante mais de cinco meses (Nyberg & Wallentinus 2009).

Encontra-se distribuída ao longo das costas leste e oeste do Oceano Atlântico, sendo encontrada a partir da costa da Dinamarca até à costa de Marrocos, surgindo também ao largo das costas dos EUA e México, bem como no Mar Báltico, no Japão e no Leste Asiático. Esta alga pode ser encontrada em baías, lagoas, estuários e portos, nas zonas intertidal e sublitoral, presa na areia fina, pedras ou conchas, até quatro a cinco metros de profundidade (Guiry 2015a).

2.2. Propriedades/atividades biológicas das macroalgas

Nos últimos anos, vários estudos avaliaram a incorporação de várias espécies de macroalgas em dietas de peixes (Pereira *et al.* 2012), de aves (Zahid *et al.* 1995) e de suínos (Turner *et al.*

2002). A utilização de algas como alimento para animais tem apresentado efeitos interessantes, como sejam um aumento da concentração tecidual de iodo, alterações nas comunidades bacterianas intestinais de suínos e a acumulação de triglicéridos no pargo (McHugh 2003, Holdt & Kraan 2011).

Contudo, a complexidade da parede celular e a presença de compostos antinutricionais têm sido relacionadas com baixa digestibilidade e fraco desempenho em aves (Zahid *et al.* 1995), sugerindo que os animais ruminantes são os animais mais adequados para a utilização de macroalgas, uma vez que deverão ser capazes de digerir a parede celular devido à população microbiana do retículo-rúmen. Apesar do seu uso potencial como alimento para animais ruminantes, a investigação é escassa nestes animais. Recentemente, macroalgas e extratos de macroalgas têm vindo a ser explorados como uma nova fonte de compostos bioativos com propriedades imunomoduladoras (Bansemir *et al.* 2006, Katayama *et al.* 2011, Saker *et al.* 2001).

No homem, vários estudos mostraram que as algas vermelhas, verdes e castanhas têm potencial terapêutico, como anti-hipertensivo (Thomas & Kim 2011), antioxidante (Ruperez *et al.* 2002), anti-inflamatório, antiproliferativo (Mhadhebi *et al.* 2011), antitumoral (Lee *et al.* 2004), antiviral, antifúngico e antimicrobiano (Ozdemir *et al.* 2006, Seenivasan *et al.* 2010).

Recentemente, têm sido realizados muitos estudos em camarões com o objetivo de avaliar as potenciais propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas das algas vermelhas e castanhas. Sirirustananun *et al.* (2011) concluíram que camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com extratos da alga vermelha *Gracilaria tenuistipitata* mostram uma resposta humoral maior e contínua, sugerindo o seu papel na imunidade inata. Wongprasert *et al.* (2014) mostraram que a galactana sulfatada da alga *Gracilaria fisheri* possui atividade antiviral no camarão *Penaeus monodon*, em parte devido ao efeito imunomodulador. Kanjana *et al.* (2011), por sua vez, observaram que os extratos etanólicos desta mesma alga têm efeito imunoestimulante (celular e humoral) e atividade antimicrobiana na proteção do camarão *P. monodon* contra *Vibrio harveyi*. Já Bansemir *et al.* (2006) referem que extratos das espécies *Gracilaria* contêm metabolitos e compostos ativos com propriedades antivirais, antifúngicas e antibacterianas. Kulik (1995) refere que fucoïdanas das algas marinhas castanhas *Cladosiphon okamuranus* e *Sargassum polycystum* despoletam atividade antiviral contra o vírus da síndrome do ponto branco em camarões *Metapenaeus japonicus* e *P. monodon*, respetivamente. Sivagnanavelmurugan *et al.* (2014) concluíram que fucoïdanas de *Sargassum wightii* melhoram a imunidade inata e aumentam a resistência à infeção por *Vibrio parahaemolyticus* em *P. Monodon*. Chotigeat *et al.* (2004) provaram que o fucoïdano de *Sargassum polycystum* inibe o crescimento de agentes patogénicos de camarão tais como *V. harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Já relativamente às algas verdes, Dang *et al.* (2011) referem que o fornecimento de *Ulva lactuca* a moluscos da Califórnia melhorou a atividade antiviral e antibacteriana, e aumentou a resposta imunitária. Contudo, Samara *et al.* (2013), num estudo em borregos em crescimento, mostraram que a inclusão de *U. lactuca* não teve benefício sobre o crescimento, nas respostas termorreguladoras e no stresse oxidativo plasmático.

As algas castanhas *Laminaria spp.* têm sido avaliadas a 0,8-2,0% de inclusão, nomeadamente, como suplemento da dieta de suínos. Um estudo realizado com extratos desta alga (laminarina e fucoídano) mostrou que estes potencializam a função imunitária, tendo Katayama *et al.* (2011) colocado a hipótese de reduzir a utilização de antibióticos na produção de suínos através da utilização destes derivados. Vários estudos avaliaram o efeito da inclusão de derivados de *Laminaria spp.* na dieta de porcas gestantes no desempenho e no estado imunológico dos leitões ao desmame, tendo verificado que essa suplementação previne efeitos negativos no crescimento, o aparecimento de diarreias induzidas por *Escherichia coli* K88 (Leonard *et al.* 2011a, Heim *et al.* 2014), diminui as concentrações de *E. coli* e de *Enterobacteriaceae* no cólon (Reilly *et al.* 2008, Lynch *et al.* 2010, McDonnell *et al.* 2010, Leonard *et al.* 2011b), aumenta as concentrações circulantes de imunoglobulina G (IgG) dos leitões e a percentagem de *E. coli* fagocitada por leucócitos ao desmame (Leonard *et al.* 2010b), indicando um aumento da função imunológica celular.

A alga castanha *Ascophyllum nodosum* tem sido muito estudada para aplicação na agricultura para tratamento de pastagens de festuca infetadas com endófitos (Fike *et al.* 2001) e como suplemento e aditivo nutricional em dietas para animais de produção (Saker *et al.* 2004, Kannan *et al.* 2007). Embora o mecanismo de ação seja atualmente desconhecido, estudos mostraram que a inclusão de *A. nodosum* em dietas de bovinos e ovinos de carne melhora a saúde animal, a segurança alimentar e a qualidade da carcaça (Fike *et al.* 2001, Montgomery *et al.* 2001, Saker *et al.* 2004, Anderson *et al.* 2006, Kannan *et al.* 2007). Alguns estudos em bovinos e ovinos sugerem, ainda, que a função das células fagocíticas é influenciada pela atividade enzimática antioxidante (Fike *et al.* 2001, Saker *et al.* 2004, Archer *et al.* 2008), tendo sido mostrado que *A. nodosum* tem efeito na capacidade antioxidante do soro e na função celular de monócitos (Saker *et al.* 1998, Fike *et al.* 2001). Saker *et al.* (2001) referem que a suplementação com *A. nodosum* reduziu a toxicidade de pastagens de festuca infetadas com endófitos, através de uma melhoria da função imunitária inata via reforço da função dos monócitos. Com efeito, estudos *in vitro* (Wang *et al.* 2009) e estudos *in vivo* com bovinos (Braden *et al.* 2004) referem que a suplementação com *A. nodosum* pode limitar o crescimento de potenciais agentes patogénicos, tais como *E. coli* 0157:H7. A suplementação com *A. nodosum*, em animais em diferentes condições de produção, influencia a tolerância ao calor e a função imune celular, aumenta os níveis circulantes de antioxidantes, aumenta o tempo de vida útil e melhora características como

a cor e o marmoreio da carne (Allen *et al.* 2001, Montgomery *et al.* 2001, Saker *et al.* 2001, Saker *et al.* 2004, Anderson *et al.* 2006).

O aumento da função imunitária foi também relatado em suínos em produção intensiva (Turner *et al.* 2002, Dierick *et al.* 2009).

Apesar de estarem já descritos efeitos imunomoduladores das macroalgas, os estudos existentes são do tipo causa-efeito, não estando, ainda, esclarecido o seu mecanismo de ação.

3. Trabalho Experimental

3.1. Objetivos

Este ensaio teve como objetivo determinar o efeito da inclusão da macroalga *G. vermiculophylla* na dieta de borregas em crescimento, de duas raças autóctones, nas respostas produtiva e imunológica adquirida. Assim, pretendeu-se avaliar quantitativamente a resposta imunológica humoral e celular de borregas alimentadas com duas dietas diferentes (com e sem alga), bem como analisar o efeito da dieta na quantidade de oxidantes/antioxidantes presentes no plasma.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Animais e alojamento

O ensaio foi realizado no Campus Agrário de Vairão, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto. Todos os procedimentos foram autorizados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária e executados de acordo com a Convenção Europeia para a Proteção dos Animais Vertebrados usados para Experimentação ou Outros Fins Científicos (ETS 123), com a Diretiva n.º 86/609/CEE e o Decreto-Lei 129/92. O ensaio teve a duração de nove semanas, com início no dia 10 de março e término a 12 de maio de 2015 (Figura 2).

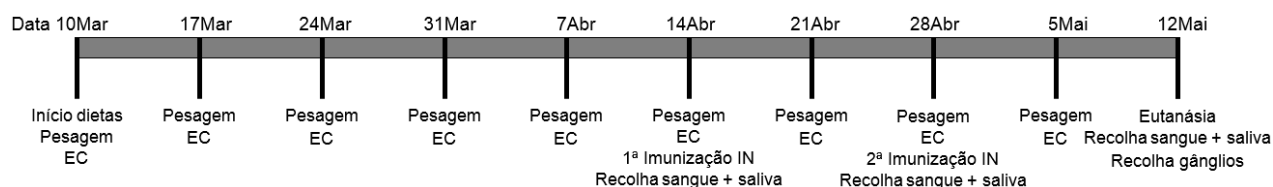


Figura 2. Cronograma das tarefas realizadas durante o ensaio experimental. EC, exame clínico IN, intranasal.

Foram utilizadas dez borregas da raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho (BEDM) e dez borregas da raça Churra Galega Bragançana (CGB), com idades compreendidas entre os três e os quatro meses e um peso vivo (PV) de $15 \pm 1,9$ kg e $19 \pm 2,6$ kg, respetivamente. As dez borregas

de cada raça foram distribuídas consoante o PV em dois grupos de cinco animais, tendo sido os resultantes quatro grupos de animais alojados em parques com cama de palha, mudada sempre que necessário, e equipados com bebedouros automáticos e comedouros para o feno e a mistura de matérias-primas. Durante o período experimental, foi realizado, semanalmente, um exame clínico aos animais no qual estes também eram pesados, sempre à mesma hora do dia.

3.2.2. Dietas experimentais

A macroalga utilizada neste ensaio, *G. vermiculophylla*, foi produzida pela empresa Algaplus (Ílhavo, Portugal) em sistema de aquacultura integrada multitrófica (sistema IMTA). Após a receção da *G. vermiculophylla*, esta foi cortada grosseiramente e colocada em estufa com ventilação forçada de ar, a 65 °C, para reduzir o teor em humidade até peso constante. A alga foi, de seguida, moída a 4 mm antes de ser incluída na mistura de matérias-primas. Foram formuladas duas dietas à base de feno de prado natural suplementado com uma mistura de matérias-primas com inclusão de alga a 12,5% (dieta experimental, ALGA) e sem alga (dieta controlo, CONT; Tabela 1). A inclusão de alga foi realizada por substituição, apenas, de luzerna desidratada, tendo-se mantido constante as quantidades das outras matérias-primas utilizadas na mistura. As dietas foram formuladas de modo a assegurar as necessidades nutricionais de borregas em crescimento (ARFC 1993).

Tabela 1. Composição ponderal das misturas de matérias-primas utilizadas no ensaio experimental.

Matérias-primas	Mistura (g/kg)	
	CONT	ALGA
Bagaço de soja, 44% PB	225	225
Farinha de milho	485	485
Luzerna desidratada	250	125
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	0	125
Sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma	10	10
Pré-mistura mineral e vitamínica ¹	30	30

¹ Composição, de acordo com o fabricante: 250.000 UI/kg de Vitamina A; 33.333 UI/kg de Vitamina D₃; 500 mg/kg de Vitamina E; 14 mg/kg de Co; 2.500 mg/kg de Fe; 40 mg/kg de I; 1.733 mg/kg de Mn; 3,33 mg/kg Se; 1.300 mg/kg de Zn; 4.000 mg/kg de Deodorase®.

As dietas foram oferecidas *ad libitum*, inicialmente uma vez por dia (9h15min). A partir da terceira semana, para garantir/promover a ingestão e evitar desperdícios provocados por alguns animais que introduziam as patas no comedouro, as misturas passaram a ser fornecidas em várias refeições ao longo do dia. Foi registada diariamente a quantidade de dieta ingerida (mistura e feno) através da pesagem dos alimentos fornecidos e recusados de cada parque. A quantidade de alimento fornecida foi ajustada diariamente de forma a garantir o fornecimento *ad libitum*. Os animais tiveram acesso contínuo a água.

3.2.3. Tratamentos médico-veterinários

Antes do início do ensaio experimental, todas as borregas foram desparasitadas via subcutânea (SC) com Doramectina (Dectomax®, Zoetis, Lisboa, Portugal) e via oral (PO) com Febendazol (Panacur®, Intervet, Lisboa, Portugal), e vacinadas SC com Enterovina® (Medinfar, Lisboa, Portugal) contra as enterotoxémias, nomeadamente a doença do rim pulposo (*Clostridium perfringens* tipo D), gangrena gasosa (*Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium sordelli*) e pasteureloses (*Pasteurella multocida* tipo I).

Na primeira semana do ensaio, ao exame clínico, alguns animais apresentaram indícios de quadro respiratório (taquipneia, ruídos pulmonares e febre), tendo sido feita uma administração metafílática intramuscular (IM) com Amoxicilina e Ácido Clavulânico (Synulox®, Zoetis, Porto Salvo, Portugal). Na semana seguinte, aos animais da raça BEDM com a dieta ALGA, foi administrada Gentamicina colírio (Gentocil®, Laboratório Edol, Linda-a-Velha, Portugal) para tratar um quadro de conjuntivite e foram realizadas zaragatoas oculares dos três animais mais afetados para análise e descarte dos agentes *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma*, tendo sido os resultados negativos (Segalab, Póvoa de Varzim). Uma vez que o quadro respiratório se agravou, na segunda semana do ensaio, foi efetuado o tratamento de todos os animais com Oxitetraciclina (Terramicina100®, Zoetis) associadas a Tilosina (Tylan®, Elanco, Lisboa, Portugal), tendo sido administrado também Carprofeno (Rimadyl®, Zoetis) aos animais mais afetados (BEDM).

3.2.4. Amostragem

A seronegatividade das borregas a *Neospora caninum* (Nc) foi confirmada por sorologia (Segalab, Póvoa de Varzim) em amostras de sangue periférico. Cinco semanas após o início do ensaio, imediatamente antes da primeira imunização, foram recolhidas amostras de sangue, na veia jugular, tendo sido utilizados, para cada animal, dois tubos heparinizados (Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) para isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC); dois tubos com EDTA (Becton, Dickinson e Company) para hemograma e obtenção de plasma para avaliar o estado oxidativo; um tubo sem anticoagulante (Becton, Dickinson and Company) para proteinograma; e um microtubo sem anticoagulante (Labbox Labware, Barcelona, Espanha) para posterior quantificação de anticorpos no soro. Procedeu-se, também, à recolha de saliva utilizando seringas de insulina (Omnifix, Melsungen, Alemanha), sem agulha acoplada, para medição de anticorpos. Estes procedimentos foram repetidos duas e quatro semanas depois, antes da segunda imunização (reforço) e da eutanásia, respetivamente. Os animais foram eutanasiados por via endovenosa (veia jugular) com Pentobarbital (Euthasol®,

Esteve, Carnaxide, Portugal), no final das nove semanas, e recolheram-se os gânglios linfáticos parotídeo direito e um mesentérico.

Semanalmente, foram recolhidas amostras (ca. 0,500 kg) de cada mistura (CONT e ALGA) e de feno, para posterior análise da composição química.

3.2.5. Análises químicas

Para a determinação da matéria seca (MS), as amostras de alimentos foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, durante 24 h.

As determinações analíticas a seguir referidas, foram realizadas nas amostras de alimentos compostas por período (1, 2, 3 e 4) e moídas num moinho equipado com crivo de 1 mm. O teor em cinza foi determinado após 3 h em mufla a 500 °C (AOAC 1990; ID 942.05). O teor em azoto (N) foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC 1990; ID 954.01). O teor em proteína bruta (PB) foi calculado como $N \text{ Kjeldahl} \times 6,25$ (AOAC 1990). A fibra de detergente neutro (NDF), a fibra de detergente ácido (ADF) e a lenhina de detergente ácido (ADL) foram determinadas de acordo com Van Soest *et al.* (1991) e Robertson e Van Soest (1981), tendo sido adicionada α -amilase durante a determinação da fração NDF; não foi utilizado sulfito de sódio. A gordura bruta (GB) foi determinada por extração com éter de petróleo utilizando um sistema *Gerhardt Soxtec 2000 automatic* (AOAC 1990; ID 920.39).

Nas amostras de misturas de matérias-primas moídas num moinho equipado com crivo de 0,5 mm, foi determinado o teor em amido pelo método enzimático (Salomonsson *et al.* 1984).

3.2.6. Parasitas

Os taquizoítos de Nc (NcT; isolado Nc-1) foram cultivados e passados em série em células VERO, mantidas em meio *Minimum Essencial Medium* (MEM) contendo sais de Earle e L-glutamina, suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS), Penicilina (200 IU/mL) e Estreptomicina (200 g/mL) (todos da Sigma, St Louis, MO, EUA), numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37 °C.

3.2.7. Isolamento de parasitas

Cultivaram-se as células VERO infetadas até se obter uma destruição de aproximadamente 70% da monocamada celular. Com o auxílio de um raspador estéril (VWR, Carnaxide, Portugal) recolheram-se os sobrenadantes e as células, centrifugaram-se as amostras a 1500×g durante 15 min a 4 °C, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em tampão fosfato salino (PBS) (Sigma). Efetuou-se a passagem da suspensão por uma agulha de 25G de forma a

lisar as células ainda intactas. De seguida, realizaram-se duas lavagens em PBS a 1500×g durante 15 min a 4 °C. O sedimento final foi ressuspendido em 3 mL de PBS e passado por uma coluna PD-10 com meio Sephadex™ G-25M (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha). Recuperam-se 6 mL de eluído da coluna (fração que continha os NcT), determinou-se a concentração de NcT num hemocítmetro, centrifugou-se a suspensão a 1500×g durante 15 min a 4 °C e congelou-se a -80 °C até utilização posterior.

3.2.8. Extração da proteína de membrana de *Neospora caninum*

Os parasitas isolados foram ressuspendidos em PBS contendo 0,75% de Triton X-114® (3 mL para cada 5×10^7 – 5×10^8 NcT; Sigma) e inibidores de proteases (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail®, Roche, Alemanha), levemente agitados no vórtex e incubados em gelo durante 10 min. Centrifugou-se a preparação a 10000×g durante 30 min a 4 °C, incubou-se o sobrenadante em banho-maria a 30 °C durante 3 min, arrefeceu-se em gelo durante 10 min e centrifugou-se novamente a 10000×g durante 30 min a 4 °C. Incubou-se o sobrenadante recuperado em banho-maria a 30 °C durante 3 min e centrifugou-se a 1000×g durante 4 min à temperatura ambiente. Desprezou-se a fase hidrofílica e adicionaram-se quatro volumes de etanol absoluto à fase detergente. Agitou-se vigorosamente a solução final no vórtex e incubou-se em gelo durante 1 h. Após a incubação, centrifugou-se a preparação a 12000×g durante 20 min a 4 °C e o precipitado (proteínas de membrana de *Neospora caninum*, NcMP) foi ressuspendido em PBS. A concentração de NcMP foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando um espectrofotómetro 6300 (Jenway, Essex, Reino Unido). As NcMP foram congeladas a -80 °C até utilização posterior.

3.2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de detergente aniónico dodecil sulfato de sódio

O perfil das NcMP foi avaliado por eletroforese de proteínas em gel de 12% poliacrilamida (Sigma) e tampão tris-glicina, em condições desnaturantes, num sistema vertical *Mighty Small II* (Hoefer Inc., Holliston, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O marcador de massas moleculares *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientif, Rockford, EUA) foi utilizado para calcular a massa molecular das diferentes bandas proteicas. O perfil de migração eletroforética foi visualizado após coloração com nitrato de prata, tal como descrito por Gromova e Celis (2006).

3.2.10. Imunização

As imunizações intranasais das borregas foram realizadas aos 35 e 49 dias de ensaio (intervalo de duas semanas), num volume final de 500 µL contendo 100 µg de NcMP e 50 µg do adjuvante

CpG-B ODN 2007 (agonista do TLR9 de suíno/bovino; InvivoGen, SD, EUA) em PBS, utilizando um pulverizador (dispositivo fornecido com a vacina RISPOVAL, Pfizer, NY, EUA) acoplado a uma seringa de 3 mL. Foi utilizado o CpG ODN 2007, dado Booth *et al.* (2007) num estudo *in vitro* em que estimularam células isoladas de gânglios cervicais superficiais e de sangue periférico de ovinos com vários CpGs, terem mostrado que, nestes animais, é este CpG o que melhor estimula uma resposta proliferativa e a produção de interferão-gama (IFN- γ).

3.2.11. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas em gradiente de diatrizoato de sódio-polissacarose (Histopaque 1077®, Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. A contagem de células foi efetuada por citometria de fluxo num citómetro EPICS XL (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA) utilizando esferas de contagem (Fluka, Sigma). Foram misturados volumes iguais de cada suspensão celular e uma suspensão de esferas de poliestireno de 10 μm de tamanho e concentração pré-definida em tampão de citometria (PBS contendo 1% de albumina do soro de bovino (BSA) e 2 mM de azida de sódio; todos da Sigma). Acertaram-se as concentrações para 2×10^6 células/mL, adicionou-se igual volume de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) a 10 μM e incubaram-se as suspensões a 37 °C, durante 7 min. De seguida, adicionaram-se cinco volumes de RPMI completo (RPMI 1640 suplementado com 50U/mL Penicilina, 50 μg /mL Estreptomicina, 1% de tampão HEPES, 10% de FBS e 5 μM 2-mercaptoetanol; todos da Sigma) frio e colocaram-se as amostras durante 5 min em gelo para estabilizar a marcação. Centrifugaram-se a 300 \times g a 4 °C, durante 10 min, ressuspenderam-se em meio RPMI completo. Repetiu-se a última operação, ressuspenderam-se as células no mesmo meio e analisaram-se, por citometria de fluxo, a concentração celular e a eficiência da marcação.

3.2.12. Análise da proliferação de PBMC

Foram realizadas culturas em triplicado com 5×10^4 PBMC/poço em placas de cultura de 96 poços com fundo redondo (Nunc), durante 72 h em atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37 °C, sem estímulo ou estimuladas com Concanalina A (ConA) (Sigma) a 2,5 μg /mL ou com NcMP a 50 μg /mL, num volume final de 200 μL . Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 300 \times g durante 10 min e recolheram-se os sobrenadantes que se guardaram a -80 °C até avaliação posterior. Efetuou-se a lavagem dos poços com tampão de citometria e analisaram-se as suspensões no citómetro de fluxo para avaliar a proliferação celular pela diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE. A percentagem de células que dividiu pelo menos uma

vez foi determinada com o programa *FlowJo* versão 10 (Tree Star Inc., Ashland, OR) e expressa como a diferença entre as contagens experimentais (estímulos ConA e NcMP) e o controle.

3.2.13. Culturas de células isoladas dos gânglios parotídeos e mesentéricos

O gânglio parotídeo direito e um dos gânglios mesentéricos de cada animal foram homogeneizados em PBS recorrendo a pinças estéreis e filtros de 100 µm. Determinou-se a concentração das suspensões unicelulares por citometria de fluxo e semearam-se 10⁵ células/poço em placas de 96 poços de fundo redondo. As células foram incubadas sem estímulo ou estimuladas com ConA a 2,5 µg/mL, NcMP a 50 µg/mL ou 10⁶ NcT morto, num volume final de 200 µL, durante cinco dias a 37 °C e 5% CO₂. As placas foram centrifugadas e os sobrenadantes congelados a -80 °C até análise posterior.

3.2.14. Deteção de anticorpos específicos para antígenos de membrana de *Neospora caninum* por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Os títulos de anticorpos IgA, IgM e IgG específicos para NcMP foram quantificados por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Revestiram-se placas de 96 poços (Maxisorp, Nunc) com 50 µL NcMP a uma concentração de 5 µg/mL em PBS e deixaram-se a incubar durante a noite, a 4 °C. Após três lavagens com solução tampão TST (150 mM NaCl, 10 nM EDTA e 0,05% Tween 20, pH 8) os poços foram saturados com solução tampão TST contendo 2% de BSA, durante 1 h à temperatura ambiente. As amostras de soro e saliva foram diluídas em série, em solução tampão TST contendo 1% de BSA, e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Foram efetuadas três lavagens com TST e procedeu-se à incubação com anticorpos policlonais anti-IgA, anti-IgG ou anti-IgM de ovino, conjugados com fosfatase alcalina (Abcam, Cambridge, UK), diluídos em solução tampão TST contendo 1% de BSA durante 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram reveladas com fosfato de p-nitrofenilo a 0,5 mg/mL (Sigma) em tampão de fosfatase alcalina (50 mM carbonato de sódio, 1 mM MgCl₂, pH 9.8), tendo a reação sido interrompida com 0,1 M EDTA, pH 8. A absorvância foi medida a 405 e 570 nm. Os valores de absorvância a 570 nm foram subtraídos aos valores medidos a 405 nm. Os títulos de anticorpos foram determinados como o recíproco do valor da diluição correspondente ao dobro do valor dos poços sem soro/saliva no caso da IgA, e do valor definido de 0,1 no caso da IgM.

3.2.15. Deteção de citocinas por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Os níveis de IFN-γ foram determinados nos sobrenadantes de culturas de PBMC e de células isoladas de gânglios parotídeo e mesentérico recorrendo a um *kit* comercial, *Bovine IFN-γ ELISA development kit* (Mabtech, Cincinatti, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de interleucina-10 (IL-10) foram determinados por ELISA utilizando o anticorpo *Mouse Anti*

Bovine Interleukin-10 (AbD Serotec, Kidlington, UK) a 2 µg/mL para revestir a placa de ELISA, o anticorpo *Mouse Anti Bovine Interleukin-10 Biotin* (AbD Serotec) a 2 µg/mL como anticorpo secundário, avidina conjugada com peroxidase (HRP) (eBioscience, San Diego, EUA) e solução TMB (eBioscience) para a revelação. Para a curva padrão de IL-10 usaram-se diluições em série que variaram entre 2000 e 37,5 pg/mL de IL-10 recombinante de bovino (AbD Serotec). A absorvância foi medida a 450 e 570 nm. Os níveis de citocinas (pg/mL) foram determinados por transformação das absorvâncias a 450 nm, após subtração dos valores de absorvância a 570 nm e dos valores dos poços sem sobrenadante, por interpolação com os valores das respectivas curvas padrão.

3.2.16. Análise da capacidade antioxidante total

A quantificação de antioxidantes totais presentes nas amostras de plasma, congeladas a -20 °C, obtidas da centrifugação das amostras de sangue recolhidas, foi determinada utilizando o *kit Total Antioxidant Assay* (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram determinados por interpolação com os valores de uma curva de referência obtidos com o antioxidante solúvel ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) e a capacidade antioxidante total foi expressa em concentração de Trolox (mM).

3.2.17. Análise da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada em amostras de plasma recorrendo ao *kit de Lipid Peroxidation Assay* (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.18. Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o programa SAS (versão 8.1, 1999-2001, SAS Institute, Inc., Carry, NY, EUA).

O ganho médio diário de PV (GMD), de cada animal, durante o ensaio, foi determinado a partir dos valores de PV semanais por análise de regressão simples. Os GMD foram analisados utilizando o procedimento GLM, incluindo, no modelo, os efeitos fixos raça, dieta, interação raça×dieta e o erro residual. Como a interação não foi significativa ($p > 0,15$) foi removida do modelo.

Os dados relativos à ingestão voluntária, ao PV, ao hemograma, ao proteinograma, à proliferação celular, à produção de citocinas e imunoglobulinas, e ao teor de antioxidantes foram sujeitos a análise de covariância utilizando o procedimento MIXED. As somas dos quadrados foram fracionadas em covariável, período (semana ou dia de recolha de sangue), raça, dieta, período×raça, período×dieta, raça×dieta e período×raça×dieta e o erro residual aleatório.

Sempre que as interações não foram significativas ($p > 0,15$), foram removidas do modelo. Os dados da primeira semana de ensaio foram utilizados como covariável em cada um dos respetivos modelos, com a exceção da análise dos dados imunológicos em que a covariável, quando utilizada, foi a da amostra sem estímulo. Sempre que a covariável não foi significativa ($p > 0,05$) foi removida do modelo. O animal foi incluído como efeito aleatório e o período foi considerado como medida repetida.

Os dados referentes ao consumo de alimento foram analisados utilizando o procedimento MIXED, incluindo, no modelo, os efeitos fixos raça e dieta e o erro residual aleatório. O período foi considerado como medida repetida.

Sempre que existiram diferenças significativas o teste de Tukey foi utilizado para comparação de médias.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Dietas experimentais

Neste ensaio foi selecionada a alga *G. vermiculophylla* devido à possibilidade de produção de elevadas quantidades em cultura evitando estar dependente da recolha natural, uma vez que, ao longo do ano, se verificam grandes variações na quantidade de alga passível de ser recolhida, bem como na sua composição química. Outro motivo foi o facto de no cultivo ser possível manipular a composição da própria alga, permitindo tornar o valor nutritivo mais uniforme ao longo do ano. Dado não ser utilizada para a alimentação humana, também a tornou atrativa por poder ser adquirida a um custo mais acessível que outras algas. Em Portugal, as únicas algas com ciclo fechado de cultivo são a *Ulva* e a *Gracilaria*. Contudo, num ensaio de digestibilidade, com ovinos, realizado anteriormente, verificou-se que, apesar dos valores de digestibilidade obtidos serem semelhantes entre algas, a ingestão de *Ulva* alterava a consistência das fezes dos animais, instigando a utilização da *Gracilaria* em estudos posteriores (Cabrita *et al.*, comunicação pessoal). Adicionalmente, resultados de composição química de diferentes algas recolhidas naturalmente na costa portuguesa e de cultivo, mostraram que a *G. vermiculophylla* de cultivo apresenta, em média, cerca de 21% de PB e 11% de minerais (Cabrita *et al.*, comunicação pessoal), tornando-a, também, atrativa enquanto fonte de proteína e de minerais.

Na Tabela 2 apresenta-se a composição química dos alimentos utilizados durante o ensaio. Como seria de esperar, a composição química manteve-se relativamente constante ao longo das nove semanas de ensaio. A substituição de luzerna desidratada por *G. vermiculophylla*, na mistura de matérias-primas, aumentou o teor em cinza e diminuiu o teor em constituintes da parede celular. Com efeito, é bem sabido que as macroalgas obtêm da água uma fonte

incomparável de elementos minerais (macro e oligoelementos), sendo o seu teor em minerais superior ao das plantas terrestres (Rupérez 2002). Vários estudos referem que esta fração pode atingir os 36% (Burtin 2003) ou 40% da MS (Ortega-Calvo *et al.* 1993).

Tabela 2. Composição química das misturas de matérias-primas e do feno de Prado natural fornecidos durante o ensaio¹.

Alimento ²	MS (%)	(%MS)									
		MO	Cinza	GB	PB	NDF	NDFom	ADF	ADL	ADLom	Amido
Mistura de matérias-primas com alga											
Período 1	90,1	85,2	14,8	3,6	19,8	18,7	16,8	7,8	3,9	3,2	32,2
Período 2	90,0	87,4	12,6	3,7	19,0	21,3	19,6	10,4	5,4	4,6	31,2
Período 3	90,8	87,3	12,7	3,4	19,2	21,4	20,3	9,0	2,2	1,8	30,8
Período 4	89,7	87,4	12,6	3,6	19,1	21,1	19,8	9,1	2,4	1,9	30,5
Mistura de matérias-primas sem alga											
Período 1	90,1	91,2	8,8	4,0	20,6	25,4	24,2	13,3	5,0	4,8	27,6
Período 2	89,4	91,1	8,9	3,4	19,8	24,1	23,6	12,2	5,2	5,3	29,4
Período 3	91,0	91,2	8,8	3,8	18,7	25,2	24,8	11,4	3,2	3,7	28,9
Período 4	90,1	91,4	8,6	4,0	19,2	26,0	25,6	12,1	2,2	2,7	27,7
Feno de Prado natural											
Período 1	90,1	92,6	7,4	1,2	4,9	62,4	61,5	39,7	7,7	4,6	ND ³
Período 2	90,2	95,2	4,8	1,2	4,1	72,2	71,7	40,8	6,5	5,2	ND
Período 3	89,9	92,5	7,5	1,5	5,0	69,6	68,1	41,1	7,4	4,2	ND
Período 4	89,6	93,1	6,9	1,3	6,6	66,4	65,9	39,8	5,1	7,2	ND

¹ MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; GB: gordura bruta; PB: proteína bruta; NDF: fibra de detergente neutro; NDFom: NDF isento de cinza; ADF: fibra de detergente ácido; ADL: lenhina de detergente ácido; ADLom: ADL isento de cinza. ² Amostras de alimentos compostas por período: 3 semanas após a introdução da dieta (Período 1), 2 semanas antes da 1ª imunização (Período 2), 2 semanas entre a 1ª e a 2ª imunização (Período 3), e 2 semanas entre a 2ª imunização e o abate (Período 4). ³ ND: não determinado.

3.3.2. Ingestão voluntária e crescimento

Na Tabela 3 apresentam-se os efeitos da raça e da dieta na ingestão voluntária e no GMD dos animais. A raça teve um efeito significativo na ingestão diária de MS ($p < 0,001$), mas quando expressa por kg de PV, as diferenças foram apenas significativas para a ingestão de mistura ($p = 0,005$), tendo os animais da raça CGB ingerido uma maior quantidade do que os da raça BEDM. Expressando a ingestão por kg de PV metabólico, mais relacionada com as necessidades dos animais, verificaram-se diferenças significativas na ingestão de mistura ($p = 0,009$) e na ingestão da dieta total ($p = 0,013$), mantendo-se a maior ingestão dos animais da raça CGB relativamente aos da raça BEDM. Na Figura 3 e na Tabela 3, pode observar-se que as diferenças na ingestão não se refletiram no PV e GMD dos animais.

Ao analisar os efeitos da dieta verifica-se que esta afetou significativamente todos os parâmetros avaliados. Independentemente da forma de expressão da ingestão voluntária, a dieta CONT promoveu maior ingestão de mistura e total, existindo uma clara substituição da ingestão de mistura pela ingestão de maiores quantidades de feno pelos animais alimentados com a dieta ALGA. Este facto pode dever-se a uma menor palatabilidade ou à existência de mecanismos

pós-ingestivos da dieta com *G. vermiculophylla*. Dado que a ingestão da mistura com alga foi baixa desde o início do ensaio, os resultados sugerem um maior efeito da palatabilidade no comportamento alimentar dos animais. Apesar de existir pouca informação a este respeito, estudos que avaliaram a variação intraespecífica da palatabilidade em algas, sugerem que o stresse físico (e.g., corte da alga, ataque por predadores) pode induzir defesas químicas por parte da alga (Renaud *et al.* 1990, Cronin & Hay 1996c, Cronin & Hay 1996b) que alterarão a sua palatabilidade; também foi verificado existir variação nas concentrações de metabolitos (extrato lipofílico) com propriedades antinutricionais nas diferentes porções das algas, nomeadamente talo e ramificações (Cronin & Hay 1996a, Pavia & Toth 2008).

Tabela 3. Efeito da raça e da dieta na ingestão voluntária e no ganho médio diário de peso vivo.

Parâmetro	Raça ¹		SEM	P	Dieta ¹		SEM	P
	CGB	BEDM			ALGA	CONT		
Ingestão, kg MS²/parque/dia								
Feno	2,37	2,04	0,042	<0,001	2,67	1,74	0,042	<0,001
Mistura	3,63	2,61	0,047	<0,001	1,86	4,37	0,047	<0,001
Dieta	6,00	4,65	0,071	<0,001	4,53	6,11	0,071	<0,001
Ingestão, kg MS/kg PV ³								
Feno	0,10	0,11	0,003	0,188	0,14	0,07	0,003	<0,001
Mistura	0,15	0,13	0,005	0,005	0,09	0,19	0,005	<0,001
Dieta	0,26	0,24	0,006	0,105	0,23	0,26	0,006	0,003
Ingestão, kg MS/kg PV^{0,75}								
Feno	0,23	0,23	0,007	0,978	0,29	0,16	0,007	<0,001
Mistura	0,33	0,27	0,009	0,001	0,20	0,41	0,009	<0,001
Dieta	0,56	0,50	0,013	0,003	0,49	0,57	0,013	<0,001
GMD ⁴, g/animal/dia	134,40	127,90	9,470	0,631	85,30	177,00	9,470	<0,001

¹ CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho; CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas. ² MS: matéria seca. ³ PV: peso vivo. ⁴ GMD: Ganho médio diário de peso vivo

A menor ingestão verificada com a dieta ALGA refletiu-se numa diminuição significativa do GMD e no peso dos animais (Tabela 3 e Figura 4). Os resultados obtidos são consistentes com ensaios anteriores em novilhos e borregos (Al-Shorepy *et al.* 2001, Saker *et al.* 2001, Samara *et al.* 2013) e suínos (Leonard *et al.* 2010a), mas contraditórios em relação a outros ensaios em novilhos (Williams *et al.* 2009) e suínos (McDonnell *et al.* 2010, O'Doherty *et al.* 2010). Em geral, a utilização de algas na nutrição animal tem apresentado resultados inconsistentes no que diz respeito ao GMD e à ingestão voluntária. As discrepâncias podem dever-se à variação dos géneros (*Gracilaria*, *Ulva*, *Ascophyllum*) e das espécies (algas vermelhas, algas verdes e algas castanhas) de algas utilizadas, a diferenças nos processos de colheita e de transformação (recolha, lavagem e secagem), à qualidade nutritiva das algas (nutrientes digestíveis e cinzas), aos níveis e formas de inclusão utilizados (granulado, com ou sem melaço) e às concentrações de compostos biologicamente ativos (compostos fenólicos e alginatos) (Samara *et al.* 2013, El-Waziry *et al.* 2015).

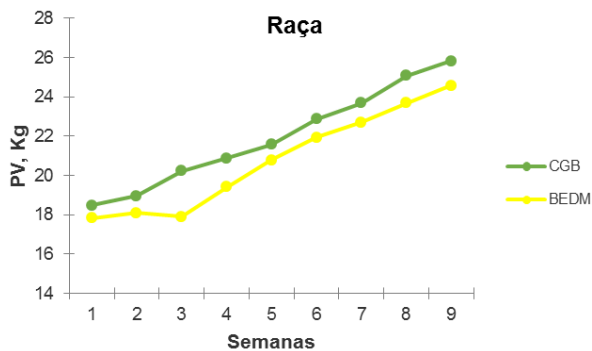


Figura 3. Efeito da raça no peso vivo (PV) das borregas, ao longo do ensaio. CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho.

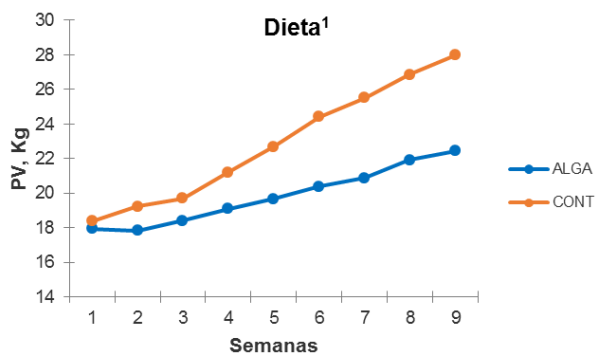
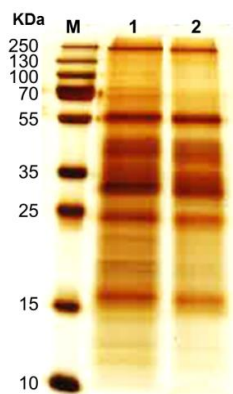


Figura 4. Efeito da dieta no peso vivo (PV) das borregas, ao longo do ensaio. ¹ p < 0,001. CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas.

3.3.3. Parâmetros hematológicos

No ensaio foram realizados hemogramas e proteinogramas no início de cada período com o objetivo de avaliar o estado geral de saúde dos animais (Tabela 6, Anexos). No hemograma e no proteinograma, o efeito raça só foi significativo para os parâmetros plaquetas, eosinófilos, basófilos e β -globulinas; o efeito dieta apenas apresentou diferenças estatisticamente significativas para eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, linfócitos e albumina; tendo verificado-se um maior efeito, como seria de esperar, ao nível do período. Cebra e Cebra (2012) referem que ovelhas com menos de seis meses de idade, tendem a ter valores inferiores de hematócrito, contagem de eritrócitos, hemoglobina e proteínas plasmáticas totais, bem como uma contagem de leucócitos mais elevada, que os animais adultos. Assim sendo, todos os valores do hemograma e proteinograma estão dentro dos intervalos de referência descritos por Byers e Kramer (2010) e Cebra e Cebra (2012).

3.3.4. Proteínas da membrana de *Neospora caninum*



Neste ensaio, para avaliar se as NcMP utilizadas apresentavam um perfil proteico semelhante ao descrito por Ferreirinha *et al.* (2014) num ensaio de imunização intranasal em ratinhos, realizou-se uma eletroforese SDS-PAGE, em que se comparou a amostra isolada neste ensaio e a amostra publicada pelos autores referidos. Tal como se observa na Figura 5, o protocolo utilizado levou ao isolamento de NcMP com massas moleculares e perfil de migração eletroforética semelhante ao previamente descrito.

Figura 5. Perfil de migração eletroforética das NcMP. Colunas: M - marcador de massas moleculares; 1 - perfil das NcMP isolada para este ensaio; 2 - perfil das NcMP de referência descrito por Ferreirinha *et al.* (2014).

3.3.5. Proliferação celular

Células mononucleares isoladas de sangue periférico, marcadas com CFSE, foram colocadas em cultura com ConA e NcMP para avaliar o efeito da dieta, da raça e do período na resposta proliferativa aos diferentes estímulos. Na Figura 6 é apresentado um exemplo representativo da análise realizada por citometria de fluxo, em amostras de um animal da raça CGB.

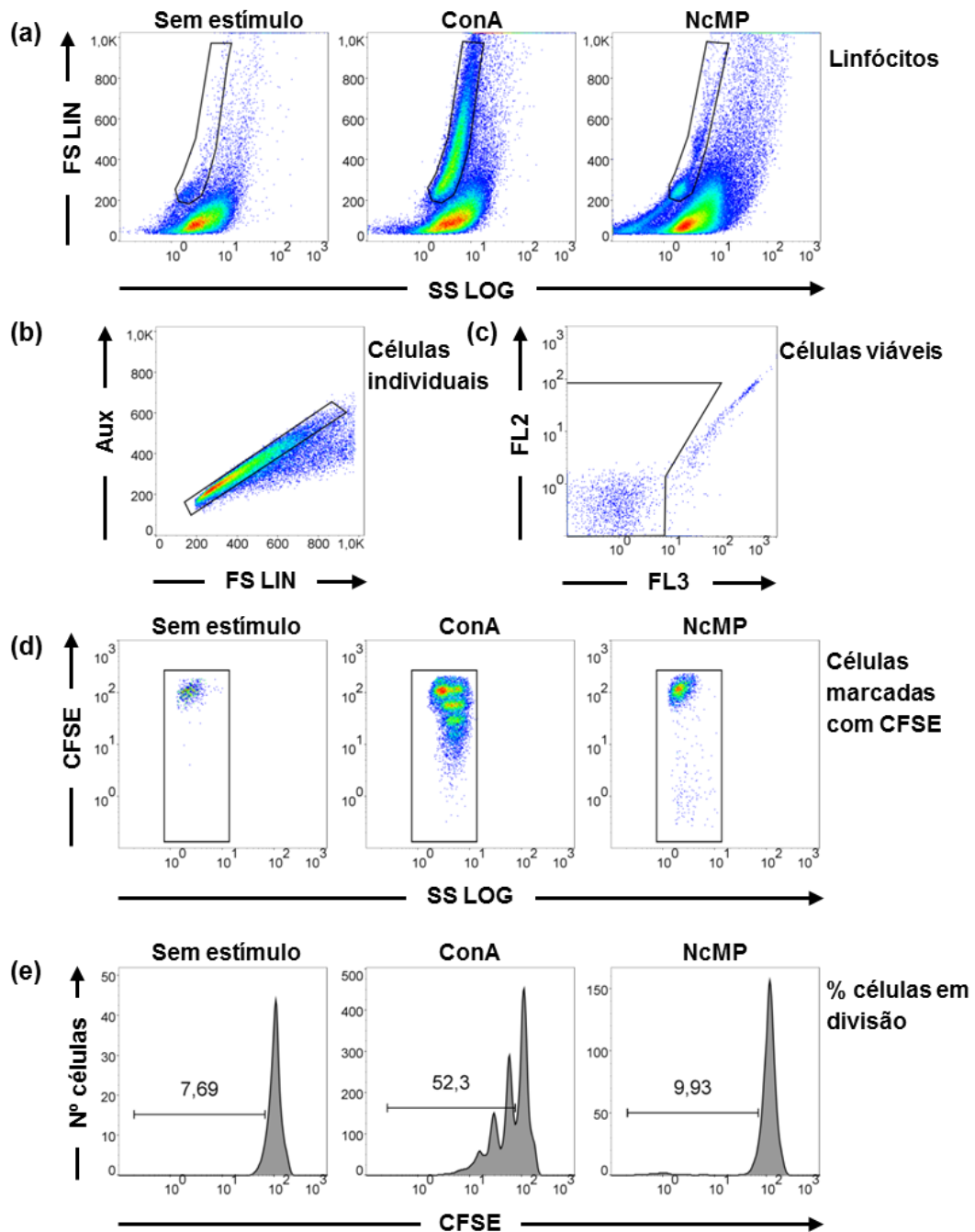


Figura 6. Análise da proliferação celular por citometria de fluxo. Imagens representativas da seleção de: (a) linfócitos segundo parâmetros de granulocidade e tamanho; (b) células individuais; (c) células viáveis, utilizando o corante de exclusão de viabilidade celular iodeto de propídio; (d) células marcadas com CFSE sem estímulo, após a estimulação com concanavalina A (ConA) e proteínas de membrana de *Neospora caninum* (NcMP), como indicado. (e) Os números dentro dos histogramas representam a percentagem de células com pelo menos uma divisão celular em cada condição indicada.

Como é possível verificar na Tabela 4, a proliferação das PBMC foi afetada pelo período, tendo sido o único efeito a apresentar resultados estatisticamente significativos.

As PBMC proliferaram em grande extensão quando estimuladas com o mitogénio ConA que leva à ativação e proliferação de células T e que permite avaliar a resposta celular (Ando *et al.* 2014), verificando-se uma resposta crescente significativa ao longo do ensaio (% de proliferação de 29,72 a 51,22). Curiosamente, na raça BEDM a resposta proliferativa é decrescente após a primeira imunização, contudo após a segunda imunização atingiu valores superiores aos da raça CGB que apresentou uma resposta proliferativa crescente ao longo do ensaio (Figura 7). De modo concordante, num estudo com ovinos da raça *Scottish Blackface* em que foi avaliada a proliferação de PBMC após a estimulação *in vitro* com ConA de células de vários animais num determinado momento, bem como do mesmo animal em momentos diferentes, registou-se também uma elevada variabilidade na resposta celular (Wattegedera *et al.* 2004).

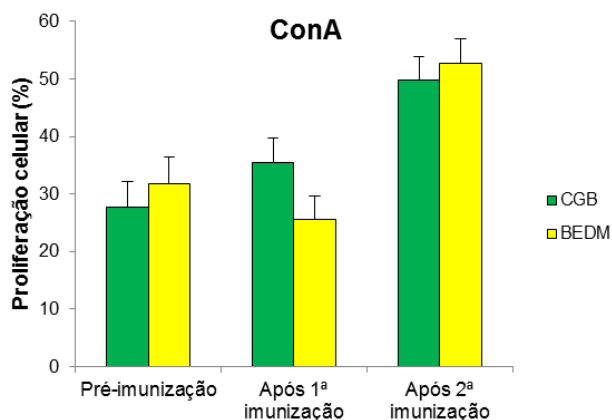


Figura 7. Percentagem de células com pelo menos uma divisão celular após estimulação com concanavalina A, em relação às células não estimuladas ($p = 0,08$; médias ajustadas \pm erros padrões das médias). CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho.

Relativamente ao estímulo com NcMP, a resposta proliferativa das PBMC tendeu a variar ao longo do ensaio ($p < 0,001$), tendo aumentado após a primeira imunização e diminuído após a segunda imunização (% de proliferação de 14,47 e 13,70 após a primeira e segunda imunizações, respetivamente). Já Stanley *et al.* (2004), num estudo com ovinos, em que avaliaram a resposta imunológica induzida por imunização intranasal com antígenos de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, obtiveram resultados semelhantes, mostrando a possível presença flutuante de PBMC específicas para antígenos na circulação, dado migrarem do local indutivo da mucosa para locais efetores após cada imunização. Note-se, contudo, que no estudo de Stanley *et al.* (2004) as recolhas e as análises das amostras de soro foram realizadas semanalmente, enquanto no presente estudo o foram antes da primeira imunização e segunda semanas após cada imunização.

Tabela 4. Efeito da raça, da dieta e do período na proliferação celular e produção de citocinas interleucina-10 e interferão-gama de células mononucleares de sangue periférico e células ganglionares quando estimuladas com concanavalina A, proteínas de membrana de *Neospora caninum* e taquizoítos de *Neospora caninum*.

Parâmetros ²	Raça ¹				Dieta ¹				Período					
	CGB	BEDM	SEM	P	ALGA	CONT	SEM	p	Pré-imunização	Após 1 ^a imunização	Após 2 ^a imunização	SEM	P	
Proliferação celular, %														
ConA ³	37,59	36,68	3,373	0,850	38,03	36,23	3,367	0,707	29,72	30,46	51,22	3,069	<0,001	
NcMP ⁴	12,18	12,38	0,793	0,860	13,19	11,36	0,808	0,126	8,66	14,47	13,70	1,014	<0,001	
Citocina IL-10, pg/mL														
<u>PBMC</u>	ConA ⁵	791,50	932,86	77,556	0,207	843,88	880,48	77,269	0,740	912,41	500,11	1174,02	93,346	<0,001
	NcMP ⁶	22,24	13,71	6,163	0,335	19,45	16,50	6,158	0,737	18,24	23,07	12,62	6,290	0,347
<u>Gânglio Parotídeo</u>	ConA	135,41	109,46	36,703	0,624	93,90	150,96	36,703	0,287	ND ⁸	ND	ND	ND	ND
	NcMP	0	0,68	0,483	0,331	0,68	0	0,483	0,331	ND	ND	ND	ND	ND
	NcT	0,52	0,79	0,616	0,764	1,27	0,04	0,616	0,174	ND	ND	ND	ND	ND
<u>Gânglio Mesentérico</u>	ConA	194,90	171,07	39,131	0,672	196,20	169,78	39,131	0,640	ND	ND	ND	ND	ND
	NcMP	0	4,48	0,878	0,002	1,17	2,66	0,837	0,253	ND	ND	ND	ND	ND
	NcT	0	8,14	0,429	<0,001	3,40	4,65	0,409	0,058	ND	ND	ND	ND	ND
Citocina IFN-γ, pg/mL														
<u>PBMC</u>	ConA ⁷	313,84	128,67	28,681	<0,001	273,56	168,95	28,630	0,015	120,51	311,67	231,59	27,603	<0,001
	NcMP	2,80	1,33	1,282	0,423	2,54	1,60	1,288	0,612	1,75	0,13	4,33	1,369	0,055
<u>Gânglio Parotídeo</u>	ConA	0,62	6,21	1,994	0,064	4,26	2,58	1,994	0,600	ND	ND	ND	ND	ND
	NcMP	0,14	0,25	0,021	0,005	0,20	0,19	0,017	0,845	ND	ND	ND	ND	ND
	NcT	0,13	0,70	0,036	<0,001	0,41	0,42	0,030	0,794	ND	ND	ND	ND	ND
<u>Gânglio Mesentérico</u>	ConA	5,88	10,05	1,263	0,032	10,31	5,62	1,263	0,018	ND	ND	ND	ND	ND
	NcMP	0,15	0,72	0,069	<0,001	0,52	0,35	0,069	0,092	ND	ND	ND	ND	ND
	NcT	0,25	1,15	0,082	<0,001	0,85	0,55	0,082	0,019	ND	ND	ND	ND	ND

¹ CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho; CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas. ² PBMC: células mononucleares do sangue periférico; ConA: concanavalina A; NcMP: proteínas de membrana de *Neospora caninum*; NcT: taquizoítos de *Neospora caninum*; IL-10: interleucina-10; IFN-γ: interferão-gama. ³ Interação períodoxraça (p = 0,08). ⁴ Interação períodoxdieta (p = 0,06) e períodoxraça (p = 0,04). ⁵ Interação períodoxraça (p = 0,03). ⁶ Interação períodoxdieta (p = 0,05). ⁷ Interação períodoxdietaxraça (p = 0,09). ⁸ ND: não determinado.

Tal como observado para a resposta celular estimulada com ConA, também se verificou elevada variabilidade na resposta celular das PBMC estimuladas com NcMP para as duas raças ao longo do ensaio (Figura 8).

A resposta proliferativa das PBMC ao estímulo com NcMP tendeu a aumentar ao longo do ensaio nos animais com a dieta ALGA (Figura 9), o que não se verificou nos animais com a dieta CONT. Seria necessário repetir o ensaio para verificar se o efeito da alga é consistente, uma vez que apenas se verificou para o estímulo específico e não para o estímulo mitogénico e também com um nível de ingestão de alga superior, uma vez que não sabemos se a menor ingestão de de dieta ALGA pode estar a minorizar os resultados. As células dos animais com a dieta ALGA podem, devido à combinação alga e estímulo específico (NcMP), ter sofrido uma estimulação/diferenciação diferente que, aquando da estimulação *in vitro*, levou à obtenção de células que respondessem melhor a um estímulo específico que a um inespecífico (ConA).

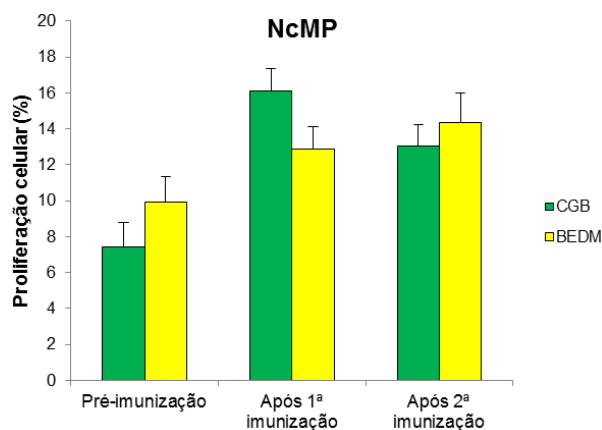


Figura 8. Percentagem de células com pelo menos uma divisão celular após estimulação com NcMP, em relação às células não estimuladas ($p = 0,04$; médias ajustadas \pm erros padrões das médias). CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho.

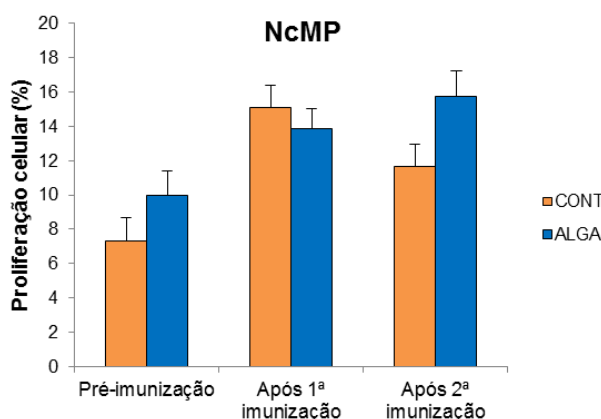


Figura 9. Percentagem de células com pelo menos uma divisão celular após estimulação com NcMP, em relação às células não estimuladas ($p = 0,06$; médias ajustadas \pm erros padrões das médias). CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas.

Assim sendo, a estratégia de imunização intranasal reportada por Ferreirinha *et al.* (2014), num estudo em ratinhos, mostrou poder ser explorada em ovinos, dado ter promovido a resposta celular, potencialmente protetora, ao antígeno específico NcMP. Os baixos valores proliferativos obtidos podem dever-se ao facto de as quantidades de antígeno NcMP e de adjuvante CpG utilizadas não terem sido as ideais para estimular uma resposta imunológica específica de magnitude desejável. Com efeito, as quantidades de antígeno e adjuvante descritas em outros ensaios em que foram realizadas também imunizações IN, embora com antígenos diversos, são muito variáveis (Premier *et al.* 2004, Stanley *et al.* 2004, Sedgmen *et al.* 2006). O facto de os animais só terem recebido duas imunizações, e apenas numa narina, pode ter sido insuficiente para promover/estimular uma resposta imunológica específica adequada, pois em vários estudos

em que recorrem a esta estratégia de imunização (IN), em ovinos, referem fazer três imunizações e em ambas as narinas (Stanley *et al.* 2004, Sedgmen *et al.* 2006). Também, à imunização IN estão associadas grandes perdas da preparação imunogénica, uma vez que neste estudo não foi utilizado nenhum tipo de gel que permitisse uma melhor aderência contendo os antígenos à mucosa nasal e que se verificou que os animais “espirravam” podendo expelir parte dessa preparação. Seria interessante, num estudo posterior, procurar adicionar uma substância que permitisse uma maior aderência à mucosa nasal.

Existe uma elevada variação na proliferação das PBMC de diferentes animais, o que permite concluir que, ao contrário do que se verifica com animais *inbred* (e.g., ratinhos) em que existem apenas pequenas variações entre os animais, o mesmo não se pode esperar em animais *outbred* como os ovinos (Wattegedera *et al.* 2004), nomeadamente, quando trabalhamos com raças autóctones que têm, em geral, tirando os parâmetros morfológicos, uma variabilidade genética elevada.

Dado a informação em ovinos ser escassa e não existirem estudos que avaliem o efeito de algas na proliferação celular de PBMC, não é possível fazer apreciações comparativas. No entanto, os resultados obtidos sugerem que pode ser pertinente fazer estudos posteriores na avaliação de um efeito adjuvante da alga na resposta celular a antígenos específicos.

3.3.6. Citocinas interleucina-10 e interferão-gama

Com o objetivo de avaliar o efeito da dieta, da raça e do período na produção de citocinas após os diferentes estímulos (ConA, NcMP e NcT), mediram-se os níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de PBMC e de células dos gânglios parotídeos e mesentéricos.

Verificou-se que a libertação de IL-10 pelas PBMC estimuladas com ConA variou ao longo do ensaio diminuindo após a primeira imunização e aumentando após a segunda imunização (500,11 pg/mL e 1174,02 pg/mL, respetivamente; Tabela 4), e que a produção de IFN- γ apresentou variações opostas, aumentando após a primeira imunização e diminuindo após a segunda imunização (311,67 pg/mL e 231,59 pg/mL; Tabela 4), sugerindo que a produção de uma citocina controla/limita a produção da outra. Tal poderá acontecer de modo direto ou indireto (Moore *et al.* 2001, Herrero *et al.* 2003).

A libertação de IL-10 apresentou diferenças significativas para a interação períodoxraça (Figura 10), verificando-se que na raça CGB as PBMC tendem a aumentar a libertação de IL-10 ao longo do ensaio, enquanto na raça BEDM as PBMC no período pré-imunização apresentam elevadas concentrações de IL-10 que decrescem até à segunda imunização tendo, contudo, aumentado posteriormente para níveis superiores aos apresentados pré-imunização.

Na produção de IL-10 pelas PBMC estimuladas com NcMP apenas se verificaram diferenças significativas na interação períodoxdieta (Figura 11). Os animais alimentados com a dieta CONT apresentaram produções decrescentes ao longo do ensaio, contrariamente aos animais da dieta ALGA que aumentaram a produção de IL-10 até à segunda imunização, diminuindo posteriormente. Caroprese *et al.* (2012), num estudo *in vitro*, com PBMC de ovinos da raça Comisana, em que analisou o efeito de extractos esteroides da microalga *Dunaliella tertiolecta* com ConA e LPS na produção de IL-10 verificaram que os extractos da alga acentuavam a sua produção.

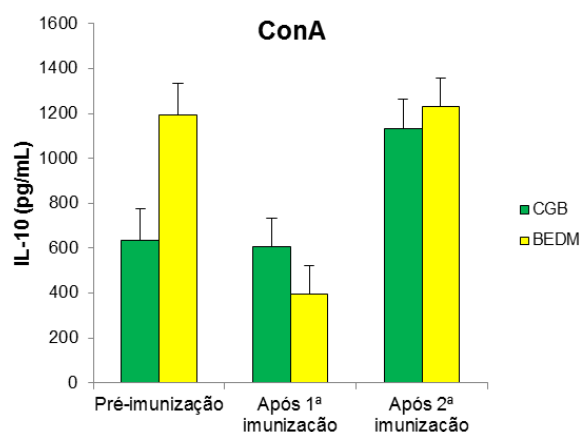


Figura 10. Concentração de citocina IL-10, nos sobrenadantes de PBMC cultivadas durante 72 horas estimuladas com ConA, ($p = 0,03$; médias ajustadas \pm desvios padrões das médias). CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho.

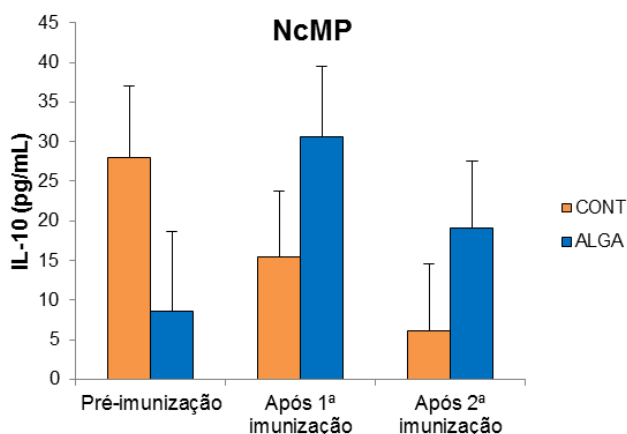


Figura 11. Concentração de citocina IL-10, nos sobrenadantes de PBMC cultivadas durante 72 horas estimuladas com NcMP, ($p = 0,07$; médias ajustadas \pm desvios padrões das médias). CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas.

Na Tabela 4 verifica-se que a produção de IFN- γ pelas PBMC estimuladas por ConA mostrou ser afetada: pela raça ($p < 0,001$), verificando-se maiores produções por parte da raça CGB; pela dieta ($p = 0,015$), apresentando os animais alimentados com a dieta ALGA valores superiores; e pelo período ($p < 0,001$) como referido anteriormente. Wattegedera *et al.* (2004) e Stanley *et al.* (2004), em estudos com ovinos não imunizados e imunizados contra *Toxoplasma*, respetivamente, mostraram existir variação na produção desta citocina por PBMC estimuladas com ConA, quer entre animais, quer ao longo do tempo.

A interação períodoxdietaxraça para a produção de IFN- γ pelas PBMC apresentada na Figura 12, evidencia ao longo do ensaio uma maior produção de IFN- γ nos animais alimentados com a dieta ALGA em relação aos da dieta CONT, bem como uma maior produção de IFN- γ pela raça CGB comparativamente à raça BEDM.

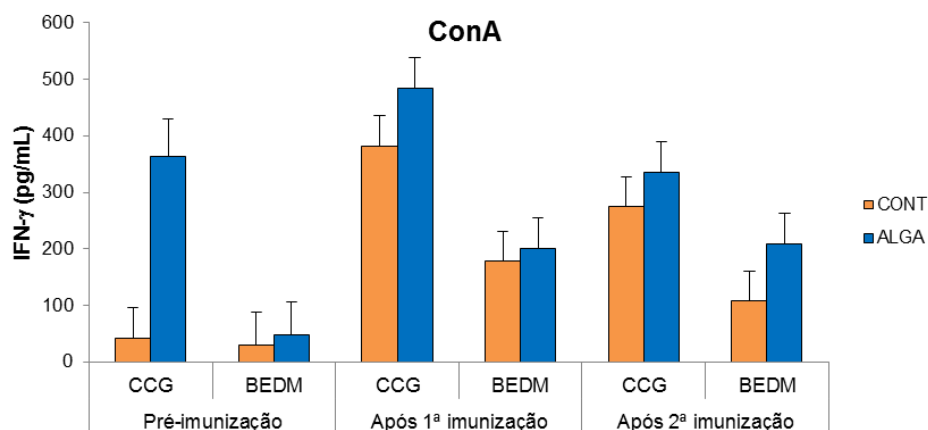


Figura 12. Concentração de citocina IFN- γ , nos sobrenadantes de PBMC cultivadas durante 72 horas estimuladas com ConA ($p = 0,09$; médias ajustadas e desvios padrões das médias). CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho; CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas.

A produção de IFN- γ pelas PBMC estimuladas com NcMP não foi afetada pela raça e, apesar de apresentar valores superiores para os animais com a dieta ALGA, as diferenças obtidas para as duas dietas não foram significativas.

Analisando a Tabela 4, a produção de IL-10 por células do gânglio parotídeo não foi afetada, nem pela raça, nem pela dieta, e a produção de IL-10 por células do gânglio mesentérico apenas mostrou diferenças significativas para a raça nos estímulos com antígeno de Nc, quer de proteína de membrana ($p = 0,002$), quer do taquizoíto morto ($p < 0,001$). Também se verificou uma maior produção de IL-10 na raça BEDM relativamente à raça CGB. A acompanhar esta produção de IL-10 na raça BEDM, verificou-se que em ambos os gânglios parotídeo e mesentérico para os estímulos com antígeno (NcMP ou NcT) também existe uma maior produção de IFN- γ .

A produção de IFN- γ nos gânglios mesentéricos também apresentou valores mais elevados para os animais com a dieta ALGA quando estimulados com ConA e NcT.

Este ensaio sugere existir uma relação inversa na produção de IL-10 e IFN- γ o que faz sentido, uma vez que têm função anti-inflamatória e pró-inflamatória, respetivamente. O fornecimento da alga *G. vermiculophylla* associado a uma estimulação específica (imunização com NcMP) sugere promover a produção de IL-10 pelas PBMC, indicando a possível capacidade anti-inflamatória desta alga.

Relativamente à resposta ganglionar, os resultados sugerem que os animais alimentados com a dieta ALGA produzem mais citocinas nos gânglios para o estímulo específico que os animais com a dieta CONT, apesar das diferenças obtidas não terem sido significativas. Nos gânglios mesentéricos, as diferenças verificadas na produção de citocinas parecem estar mais relacionadas com a raça. Ao contrário do que seria de esperar, a quantidade de citocinas

produzidas por células dos gânglios para o estímulo específico (NcMP), foi maior para o gânglio não drenante (mesentérico) do que para o gânglio drenante (parotídeo). Estes resultados, embora controversos, podem evidenciar a migração de células diferenciadas para outros órgãos secundários do sistema imunitário.

3.3.7. Imunoglobulinas A, M e G

Com o objetivo de avaliar a resposta imunológica à imunização intranasal com NcMP e o efeito da dieta, da raça e do período, foram determinados os títulos de anticorpos IgA específicos para este antígeno a partir de amostras de saliva, uma vez que a IgA é o marcador mais característico de resposta imunológica nas mucosas. Idealmente, os títulos de IgA deveriam ter sido medidos nas secreções nasais, no entanto, a sua amostragem requeria métodos invasivos e não era possível obter as quantidades de secreções necessárias para processar. Foram analisadas amostras de soros para determinar se os anticorpos IgG e IgM específicos para NcMP também foram induzidos pela imunização intranasal e se a sua produção foi afetada pela raça, pela dieta e pelo período.

Na Tabela 5 não são apresentados os títulos de IgG dado que por limitações técnicas não foi possível determiná-los. O anticorpo secundário utilizado para a avaliação dos títulos de IgG mostrou não ser específico, ligando-se a outras proteínas utilizadas durante a execução do protocolo (BSA). Apesar de se ter utilizado, também, outras proteínas (leite em pó), continuou-se a obter-se uma resposta inespecífica do reagente. Relativamente aos títulos de anticorpos de IgA e IgM, verificou-se que não foram afetados pela raça, pela dieta e pelo período.

3.3.8. Antioxidantes plasmáticos totais

Com o objetivo de avaliar as propriedades antioxidantes da *G. vermiculophylla*, bem como o efeito da raça e do período neste parâmetro, foi analisado o teor de antioxidantes totais nos plasmas dos animais. As quantidades de antioxidantes totais para o parâmetro período sugeriram existir uma diminuição deste teor ($p = 0,001$) ao longo do tempo, independentemente da raça e da dieta, como se pode observar na Tabela 5. Embora alguns estudos tenham mostrado que outras algas aumentavam o teor em antioxidantes em bovinos (Allen *et al.* 2001, Montgomery *et al.* 2001, Saker *et al.* 2001), os resultados obtidos neste estudo não verificaram esse efeito nos animais alimentados com a dieta ALGA. Curiosamente, os nossos resultados assemelharam-se aos de Samara *et al.* (2013), num estudo com a alga *U. lactuca* em borregos, em que verificaram não existir alteração a nível da concentração de antioxidantes totais no plasma dos animais alimentados com alga.

Tabela 5. Efeito da raça, da dieta e do período na concentração de imunoglobulinas A e M, e concentração plasmática de antioxidantes totais.

Parâmetros	Raça ¹		EPM	P	Dieta ¹		EPM	P	Período			EPM	P
	CGB	BEDM			ALGA	CONT			Pré- imunização	Após 1 ^a imunização	Após 2 ^a imunização		
IgA, pg/mL													
Saliva	43,46	44,27	16,920	0,973	51,91	35,82	16,920	0,506	66,12	29,67	35,80	15,640	0,095
IgM, pg/mL													
Soro	1040,72	1147,66	353,340	0,833	1420,42	767,96	353,340	0,207	706,38	ND ²	1482,00	353,340	0,137
Antioxidantes totais, mM													
Plasma	0,21	0,13	0,017	0,001	0,18	0,16	0,017	0,553	0,19	0,19	0,13	0,016	0,001

¹ CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho; CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas. ² ND: não determinado.

Curiosamente, a raça CGB apresentou concentrações superiores de antioxidantes relativamente à raça BEDM ($p = 0,001$), apesar de existir, dentro de cada grupo, uma elevada variação dos níveis de antioxidantes.

3.3.9. Peroxidação lipídica

Não foi possível determinar a peroxidação lipídica por limitações técnicas, uma vez que as amostras de plasmas, depois de processadas, não apresentavam qualquer sinal, mesmo após peroxidação experimental das amostras.

4. Considerações finais

No presente estudo, a inclusão da alga *G. vermiculophylla* na dieta como fonte nutricional alternativa, embora tenha provocado a diminuição da ingestão de alimento pelos animais, mostrou ser benéfica a nível imunológico. Apesar dos efeitos benéficos verificados terem sido ligeiros, a sua inclusão sugeriu promover a resposta celular a estímulos específicos, bem como a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), revelando a possível propriedade anti-inflamatória desta alga. A inclusão da alga não influenciou os níveis de antioxidantes plasmáticos. Contudo, e uma vez que os efeitos relacionados com a dieta podem estar minorizados devido à baixa ingestão nos animais dos grupos com a dieta experimental, bem como ao curto período de ensaio, seria interessante a realização de mais estudos com diferentes níveis de inclusão da alga, em que a introdução desta fosse gradual de forma a assegurar uma ingestão adequada da mesma; repensar a forma de apresentação do alimento aos animais, provavelmente substituir a apresentação em mistura por uma apresentação em granulado e adicionar melaço de forma a aumentar a palatabilidade e promover a ingestão. Uma vez que se verificou uma maior ingestão da dieta com alga para o final do ensaio seria interessante verificar se a idade dos animais poderá ter afetado a ingestão, fazendo sentido realizar um novo estudo com animais jovens versus animais adultos.

Relativamente à raça, os animais da raça CGB apresentaram uma melhor aceitação da dieta experimental relativamente aos da raça BEDM. Relativamente aos níveis de antioxidantes, verificou-se que a raça CGB possui teores superiores independentemente da dieta. Conforme mencionado em outros estudos, constatou-se que quando se trabalha com animais *outbreed* existe elevada variabilidade nas respostas entre as duas raças e entre animais da mesma raça.

Neste estudo, o período mostrou influenciar a proliferação celular e, conseqüentemente, a produção de citocinas. Contudo, observou-se a necessidade de otimizar as quantidades de antigénio e adjuvante a utilizar na imunização intranasal desta espécie, e a de aumentar o tempo do ensaio para permitir a realização de mais imunizações, de forma a tornar mais evidentes os efeitos.

5. Bibliografia

- Al-Shorepy SA, Alhadrami GA, Jamali IA (2001) "Effect of feeding diets containing seaweed on weight gain and carcass characteristics of indigenous lambs in the United Arab Emirates" **Small Ruminant Research** 41, 283-287
- Allen VG, Pond KR, Saker KE, Fontenot JP, Bagley CP, Ivy RL, Evans RR, Brown CP, Miller MF, Montgomery JL, Dettle TM, Wester DB (2001) "Tasco-Forage: III. Influence of a seaweed extract on performance, monocyte immune cell response, and carcass characteristics in feedlot-finished steers" **Journal of Animal Science** 79, 1032-1040
- Anderson MJ, Blanton JR, Gleghorn J, Kim SW, Johnson JW (2006) "*Ascophyllum nodosum* Supplementation Strategies That Improve Overall Carcass Merit of Implanted English Crossbred Cattle" **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 19, 1514-1518
- Ando Y, Yasuoka C, Mishima T, Ikematsu T, Uede T, Matsunaga T, Inobe M (2014) "Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule" **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal** 50, 313-320
- Anónimo (2015) "Alga Net", visitado a 20 de abril de 2015, em <http://www.alga-net.com/seavegetables/suppliers.htm>
- AOAC (1990) **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA
- Archer GS, Friend TH, Caldwell D, Ameiss K, Krawczel PD, Iacono C, Keen H, Martin T (2008) "Impacts of feeding several components of the seaweed *Ascophyllum nodosum* on transported lambs" **Animal Feed Science and Technology** 140, 258-271
- ARFC (1993) **Energy and Protein Requirements of Ruminants**, CAB International, Wallingford, UK
- Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist U (2006) "Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria" **Aquaculture** 252, 79-84
- Booth JS, Nichani AK, Benjamin P, Dar A, Krieg AM, Babiuk LA, Mutwiri GK (2007) "Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells" **Veterinary Immunology and Immunopathology** 115, 24-34
- Braden KW, Blanton JR, Jr., Allen VG, Pond KR, Miller MF (2004) "*Ascophyllum nodosum* supplementation: a preharvest intervention for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in feedlot steers" **Journal of Food Protection** 67, 1824-1828
- Breithaupt DE (2007) "Modern application of xanthophylls in animal feeding – a review" **Trends in Food Science & Technology** 18, 501-506
- Burtin P (2003) "Nutritional value of seaweeds" in **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry** Vol. 2, Pleubian

- Byers S, Kramer J (2010) "Normal Hematology of Sheep and Goats" in **Schalm's Veterinary Hematology**, 6^a Ed., Blackwell Publishing Ltd, 836-842
- Caroprese M, Albenzio M, Ciliberti MG, Francavilla M, Sevi A (2012) "A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep" in **Vet Immunology Immunopathol** 150, 27-35
- Cebra C, Cebra M (2012) "Diseases of the hematologic, immunologic, and lymphatic systems (multisystem diseases)" in **Sheep and Goat Medicine**, 2^a Ed., Elsevier Saunders, 466-502
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004) "Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp" **Aquaculture** 233, 23-30
- Cronin G, Hay M (1996a) "Within-plant variation in seaweed palatability and chemical defenses: optimal defense theory versus the growth-differentiation balance hypothesis" **Oecologia** 105, 361-368
- Cronin G, Hay ME (1996b) "Susceptibility to Herbivores Depends on Recent History of both the Plant and Animal" **Ecology** 77, 1531-1543
- Cronin G, Hay ME (1996c) "Induction of Seaweed Chemical Defenses by Amphipod Grazing" **Ecology** 77, 2287-2301
- Dang VT, Li Y, Speck P, Benkendorff K (2011) "Effects of micro and macroalgal diet supplementations on growth and immunity of greenlip abalone, *Haliotis laevis*" **Aquaculture** 320, 91-98
- Dierick N, Olyn A, De Smet S (2009) "Effect of feeding intact brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on some digestive parameters and on iodine content in edible tissues in pigs" **Journal of the Science of Food and Agriculture** 89, 584-594
- EI-Waziry AM, Al-Haidary AA, Okab AB, Samara EM, Abdoun KA (2015) "Effect of dietary seaweed (*Ulva lactuca*) supplementation on growth performance of sheep and on in vitro gas production kinetics" **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 39, 81-86
- Ely R, Supriya T, Naik CG (2004) "Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India" **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 309, 121-127
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014), "Year Book of Fishery and Aquaculture Statistics", Rome
- Ferreirinha P, Dias J, Correia A, Perez-Cabezas B, Santos C, Teixeira L, Ribeiro A, Rocha A, Vilanova M (2014) "Protective effect of intranasal immunization with *Neospora caninum* membrane antigens against murine neosporosis established through the gastrointestinal tract" **Immunology** 141, 256-267

- Fike JH, Allen VG, Schmidt RE, Zhang X, Fontenot JP, Bagley CP, Ivy RI, Evans RR, Coelho RW, Wester DB (2001) "Tasco-Forage: I. Influence of a seaweed extract on antioxidant activity in tall fescue and in ruminants" **Journal of Animal Science** 79, 1011-1021
- Freshwater DW (2000) "Rhodophyta - Red Algae", visitado a 20 de abril de 2015, em <http://tolweb.org/Rhodophyta/2381/2000.03.24>
- Gromova I, Celis JE (2006) "Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass Spectrometry" in **Cell Biology**, 3ª Ed., Burlington, Academic Press, 219-223
- Guiry MD (2015a) "The Seaweed Site: information on marine algae", visitado a 20 de abril de 2015, em <http://www.seaweed.ie/Algae/seaweeds.php>
- Guiry MD (2015b) "Algae Base", visitado a 20 de abril de 2015, em http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=E50c6587e8078c3d4
- Gupta S, Abu-Ghannam N (2011) "Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds" **Trends in Food Science & Technology** 22, 315-326
- Hasan M, Chakrabarti R (2009) "Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture - A review", **Food and Agriculture Organization of the United Nations**
- Heim G, Sweeney T, O'Shea CJ, Doyle DN, O'Doherty JV (2014) "Effect of maternal supplementation with seaweed extracts on growth performance and aspects of gastrointestinal health of newly weaned piglets after challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88" **British Journal of Nutrition** 112, 1955-1965
- Herrero C, Hu X, Li WP, Samuels S, Sharif MN, Kotenko S, Ivashkiv LB (2003) "Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma" **Journal of Immunology** 171, 5034-5041
- Holdt S, Kraan S (2011) "Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation" **Journal of Applied Phycology** 23, 543-597
- Kanjana K, Radtanatip T, Asuvapongpatana S, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K (2011) "Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*" **Fish Shellfish Immunology** 30, 389-396
- Kannan G, Saker KE, Terrill TH, Kouakou B, Galipalli S, Gelaye S (2007) "Effect of seaweed extract supplementation in goats exposed to simulated preslaughter stress" **Small Ruminant Research** 73, 221-227
- Katayama M, Fukuda T, Okamura T, Suzuki E, Tamura K, Shimizu Y, Suda Y, Suzuki K (2011) "Effect of dietary addition of seaweed and licorice on the immune performance of pigs" **Journal of Animal Science** 82, 274-281
- Kulik M (1995) "The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi" **European Journal of Plant Pathology** 101, 585-599

- Lee DG, Hyun JW, Kang KA, Lee JO, Lee SH, Ha BJ, Ha JM, Lee E, Lee JH (2004) "*Ulva lactuca*: A potential seaweed for tumor treatment and immune stimulation" **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 9, 236-238
- Lee R (2008) **Phycology**, 4^o Ed., Cambridge University Press
- Leonard SG, Sweeney T, Bahar B, Lynch BP, O'Doherty JV (2010a) "Effect of maternal fish oil and seaweed extract supplementation on colostrum and milk composition, humoral immune response, and performance of suckled piglets" **Journal of Animal Science** 88, 2988-2997
- Leonard SG, Sweeney T, Bahar B, Lynch BP, O'Doherty JV (2011a) "Effect of dietary seaweed extracts and fish oil supplementation in sows on performance, intestinal microflora, intestinal morphology, volatile fatty acid concentrations and immune status of weaned pigs" **British Journal of Nutrition** 105, 549-560
- Leonard SG, Sweeney T, Bahar B, Lynch BP, O'Doherty JV (2011b) "Effects of dietary seaweed extract supplementation in sows and post-weaned pigs on performance, intestinal morphology, intestinal microflora and immune status" **British Journal of Nutrition** 106, 688-699
- Leonard SG, Sweeney T, Bahar B, Pierce KM, Lynch BP, O'Doherty JV (2010b) "The effects of maternal dietary supplementation with seaweed extract and fish oil on the humoral immune response and performance of suckling piglets" **Livestock Science** 134, 211-214
- Lopes GL (2014) "Seaweeds from the portugueses coast: chemistry, antimicrobial and anti-inflammatory capacity", Doctor
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent" **Journal of Biological Chemistry** 193, 265-275
- Lynch MB, Sweeney T, Callan JJ, O'Sullivan JT, O'Doherty JV (2010) "The effect of dietary *Laminaria*-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs" **Journal of the Science of Food and Agriculture** 90, 430-437
- Maehre HK, Malde MK, Eilertsen KE, Elvevoll EO (2014) "Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed" **Journal of the Science of Food and Agriculture** 94, 3281-3290
- McDonnell P, Figat S, O'Doherty JV (2010) "The effect of dietary laminarin and fucoidan in the diet of the weanling piglet on performance, selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentrations" **Animal** 4, 579-585
- McHugh DJ (2003) "A guide to the seaweed industry", **Food and Agriculture Organization of the United Nations**
- Mendes MS (2012) "Functional activity of seaweed extracts from the north portuguese coast", Master, Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia

- Mhadhebi L, Laroche-Clary A, Robert J, Bouraoui A (2011) "Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*" **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 89, 911-921
- Montgomery JL, Allen VG, Pond KR, Miller MF, Wester DB, Brown CP, Evans R, Bagley CP, Ivy RL, Fontenot JP (2001) "Tasco-Forage: IV. Influence of a seaweed extract applied to tall fescue pastures on sensory characteristics, shelf-life, and vitamin E status in feedlot-finished steers" **Journal of Animal Science** 79, 884-894
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor" **Annual Review of Immunology** 19, 683-765
- Nyberg CD, Wallentinus I (2009) "Long-term survival of an introduced red alga in adverse conditions" **Marine Biology Research** 5, 304-308
- O'Doherty JV, Dillon S, Figat S, Callan JJ, Sweeney T (2010) "The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from *Laminaria spp.* on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs" **Animal Feed Science and Technology** 157, 173-180
- Oliveira MC, Bhattacharya D (2000) "Phylogeny of the Bangiophycidae (*Rhodophyta*) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids" **American Journal of Botany** 87, 482-492
- Ortega-Calvo JJ, Mazuelos C, Hermosin B, Saiz-Jimenez C (1993) "Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain" **Journal of Applied Phycology** 5, 425-435
- Ozdemir G, Horzum Z, Sukatar A, Karabay-Yavasoglu NU (2006) "Antimicrobial Activities of Volatile Components and Various Extracts of *Dictyopteris membranaceae* and *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey" **Pharmaceutical Biology** 44, 183-188
- Pavia H, Toth G (2008) "Macroalgal Models in Testing and Extending Defense Theories" in Amsler C (Ed.), **Algal Chemical Ecology**, Springer Berlin Heidelberg, 147-172
- Pereira R, Valente LMP, Sousa-Pinto I, Rema P (2012) "Apparent nutrient digestibility of seaweeds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)" **Algal Research** 1, 77-82
- Premier RR, Jacobs HJ, Lofthouse SA, Sedgmen BJ, Meeusen EN (2004) "Antibody isotype profiles in serum and circulating antibody-secreting cells following mucosal and peripheral immunisations of sheep" **Veterinary Immunology and Immunopathology** 98, 77-84
- Reilly P, O'Doherty JV, Pierce KM, Callan JJ, O'Sullivan JT, Sweeney T (2008) "The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig" **Animal** 2, 1465-1473

- Renaud P, Hay M, Schmitt T (1990) "Interactions of plant stress and herbivory: intraspecific variation in the susceptibility of a palatable versus an unpalatable seaweed to sea urchin grazing" **Oecologia** 82, 217-226
- Robertson J, Van Soest P (1981) "Detergent system of analysis" in **The Analysis of Dietary Fibre in Food**, NY, Marcel Dekker, 123-158
- Rueness J (2005) "Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (*Gracilariales, Rhodophyta*), a new introduction to European waters" **Phycologia** 44, 120-128
- Ruperez P, Ahrazem O, Leal JA (2002) "Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*" **Journal of agricultural and food chemistry** 50, 840-845
- Rupérez P (2002) "Mineral content of edible marine seaweeds" **Food Chemistry** 79, 23-26
- Saker KE, Fike JH, Veit H, Ward DL (2004) "Brown seaweed- (Tasco) treated conserved forage enhances antioxidant status and immune function in heat-stressed wether lambs" **Journal of animal physiology and animal nutrition** 88, 122-130
- Saker KE, Allen VG, Kalnitsky J, Thatcher CD, Swecker WS, Jr., Fontenot JP (1998) "Monocyte immune cell response and copper status in beef steers that grazed endophyte-infected tall fescue" **Journal of Animal Science** 76, 2694-2700
- Saker KE, Allen VG, Fontenot JP, Bagley CP, Ivy RL, Evans RR, Wester DB (2001) "Tasco-Forage: II. Monocyte immune cell response and performance of beef steers grazing tall fescue treated with a seaweed extract" **Journal of Animal Science** 79, 1022-1031
- Salomonsson A, Theander O, Westerlund E (1984) "Chemical characterization of some Swedish cereal whole meal and bran fractions" **Swedish Journal of Agricultural Research** 14, 111-117
- Samara EM, Okab AB, Abdoun KA, El-Waziry AM, Al-Haidary AA (2013) "Subsequent influences of feeding intact green seaweed *Ulva lactuca* to growing lambs on the seminal and testicular characteristics in rams" **Journal of Animal Science** 91, 5654-5667
- Sedgmen BJ, Lofthouse SA, Meeusen ENT (2006) "The ovine nasal mucosa: An alternative tissue site for mucosal immunization" **Methods** 38, 112-116
- Seenivasan R, Indu H, Archana G, Geetha S (2010) "The antibacterial activity of some marine algae from South East Coast of India" **Journal of Agricultural Science and Environmental Science** 9, 480-489
- Sirirustananun N, Chen JC, Lin YC, Yeh ST, Liou CH, Chen LL, Sim SS, Chiew SL (2011) "Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*" **Fish Shellfish Immunology** 31, 848-855

- Sivagnanavelmurugan M, Thaddaeus BJ, Palavesam A, Immanuel G (2014) "Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*" **Fish Shellfish Immunology** 39, 439-449
- Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF (2004) "Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep" **Vaccine** 22, 3929-3941
- Thomas NV, Kim S-K (2011) "Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae" **Environmental Toxicology and Pharmacology** 32, 325-335
- Turner JL, Dritz SS, Higgins JJ, Minton JE (2002) "Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*" **Journal of Animal Science** 80, 1947-1953
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) "Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle - Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal production" **Journal of Dairy Science**, 74, 3583-3597
- Walford LA (1958) "Seaweeds" in **Living Resources of the Sea: Opportunities for Research and Expansion**, Ronald Press Company, New York
- Wang Y, Xu Z, Bach SJ, McAllister TA (2009) "Sensitivity of *Escherichia coli* to Seaweed (*Ascophyllum nodosum*) Phlorotannins and Terrestrial Tannins" **Asian Australas Journal of Animal Science** 22, 238-245
- Wattegedera S, Sills K, Howard CJ, Hope JC, McInnes CJ, Entrican G (2004) "Variability in cytokine production and cell proliferation by mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells: modulation by interleukin (IL)-10 and IL-12" **Veterinary Immunology and Immunopathology** 102, 67-76
- Williams JE, Spiers DE, Thompson-Golden LN, Hackman TJ, Eilersieck MR, Wax L, Colling DP, Corners JB, Lancaster PA (2009) "Effects of Tasco in Alleviation of Heat Stress in Beef Cattle" **The Professional Animal Scientist** 25, 109-117
- Wongprasert K, Rudtanatip T, Praiboon J (2014) "Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp" **Fish Shellfish Immunology** 36, 52-60
- Zahid B, Aisha K, Ali A (1995) "Green seaweed as component of poultry feed" **Bangladesh Journal of Botany** 24, 153-156

6. Anexo

Tabela 6. Efeito da raça, da dieta e do período nos parâmetros hematológicos.

Parâmetros	Raça ¹		SEM	p	Dieta ¹		SEM	p	Período			SEM	P
	CGB	BEDM			ALGA	CONT			Pré-imunização	Após 1ª imunização	Após 2ª imunização		
Hemograma													
Eritrócitos, x10 ⁶ /μL	10,72	10,07	0,289	0,126	9,61	11,17	0,288	0,001	10,73	10,33	10,12	0,001	0,001
Hemoglobina, g/dL ²	10,50	9,88	0,271	0,115	9,33	11,06	0,271	<0,001	10,42	10,19	9,97	0,208	0,011
Hematócrito, % ²	30,37	29,55	0,980	0,592	27,61	32,31	0,889	0,001	30,39	30,56	28,92	0,682	0,002
Volume Corpuscular Médio, fL ³	28,47	29,25	0,419	0,210	28,75	28,97	0,405	0,695	28,36	29,63	28,60	0,299	<0,001
Hemoglobina Corpuscular Média, pg	9,70	10,00	0,119	0,090	9,82	9,87	0,119	0,742	9,75	9,92	9,87	0,091	0,020
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, g/dL	34,29	34,10	0,383	0,755	34,26	34,13	0,332	0,789	34,46	33,57	34,58	0,255	<0,001
Distribuição eritrócitos, %	19,52	18,97	0,342	0,276	19,57	18,92	0,336	0,180	19,31	19,27	19,17	0,259	0,722
Plaquetas, x10 ³ /μL	659,20	422,87	56,450	0,005	492,87	589,20	56,450	0,235	487,70	608,5	526,90	52,492	0,127
Volume Plaquetas, fL	9,39	9,35	0,610	0,963	10,06	8,68	0,610	0,116	9,70	11,02	7,40	0,747	0,005
Leucócitos, x10 ³ /μL	7,91	7,00	0,495	0,202	7,14	7,77	0,495	0,373	6,71	7,89	7,76	0,434	0,022
Neutrófilos, x10 ³ /μL	1,79	1,42	0,216	0,223	1,68	1,53	0,216	0,607	1,38	1,86	1,58	0,220	0,231
Eosinófilos, x10 ³ /μL	0,13	0,10	0,008	0,014	0,11	0,13	0,008	0,109	0,11	0,13	0,11	0,008	0,080
Basófilos, x10 ³ /μL	0,07	0,04	0,006	0,004	0,05	0,06	0,006	0,402	0,05	0,06	0,06	0,005	0,177
Monócitos, x10 ³ /μL	0,23	0,25	0,036	0,679	0,25	0,23	0,036	0,737	0,32	0,20	0,20	0,037	0,017
Linfócitos, x10 ³ /μL	5,87	4,89	0,345	0,065	4,79	5,97	0,336	0,021	4,81	5,59	5,74	0,289	0,008
Proteinograma													
Proteínas Plasmáticas Totais, g/dL ²	5,65	5,59	0,127	0,793	5,58	5,67	0,103	0,563	5,99	5,26	5,62	0,093	<0,001
Albumina, g/dL	2,62	2,58	0,042	0,549	2,50	2,70	0,042	0,002	2,74	2,39	2,66	0,040	<0,001
α-Globulinas, g/dL ⁴	1,25	1,23	0,037	0,714	1,21	1,27	0,040	0,264	1,36	1,15	1,19	0,043	0,004
β-Globulinas, g/dL ⁴	1,83	1,48	0,096	0,014	1,73	1,59	0,096	0,294	1,72	1,62	1,63	0,084	0,475
γ-Globulinas, g/dL ²	0,14	0,20	0,032	0,202	0,18	0,16	0,032	0,615	0,25	0,13	0,13	0,031	0,002

¹ CGB: Raça Churra Galega Bragançana; BEDM: Raça Bordaleira do Entre-Douro e Minho; CONT: dieta sem inclusão de alga; ALGA: dieta com inclusão de 12,5% de alga *Gracilaria vermiculophylla* na mistura de matérias-primas. ² Interação períodoxraça (p < 0,10). ³ Interação períodoxdieta (p < 0,10). ⁴ Interação períodoxdieta (p < 0,05).