

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICABILIDADE DA ALGA CIANOFÍCEA *Spirulina*
maxima COMO INGREDIENTE EM PETFOOD: AVALIAÇÃO DE
AÇÃO ANTIOXIDANTE E IMUNOLÓGICA EM CÃES**

Raquel Valim Labres

Médica Veterinária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICABILIDADE DA ALGA CIANOFÍCEA *Spirulina*
maxima COMO INGREDIENTE EM PETFOOD: AVALIAÇÃO DE
AÇÃO ANTIOXIDANTE E IMUNOLÓGICA EM CÃES**

Raquel Valim Labres

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho, 2012.**

L126a Labres, Raquel Valim
Aplicabilidade da alga cianofícea *Spirulina maxima* como
ingrediente em petfood: Avaliação de ação antioxidante e imunológica
em cães/ Raquel Valim Labres. – Jaboticabal, 2012
xii, 78 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
Banca examinadora: Danielle Cardoso Geraldo Maia, Cristiana
Fonseca Ferreira Pontieri
Bibliografia

1. Nutrição. 2. Espirulina. 3. Oxidação. 4. Citocinas. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.39:639.7

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: APLICABILIDADE DA ALGA CIANOFÍCEA *Spirulina maxima* COMO INGREDIENTE EM PETFOOD: AVALIAÇÃO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE E IMUNOLÓGICA EM CÃES

AUTORA: RAQUEL VALIM LABRES

ORIENTADOR: Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. CRISTIANA FONSECA FERREIRA PONTIERI
Premier Pet / Araraquara/SP


Profa. Dra. DANIELLE CARDOSO GERALDO MAIA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Data da realização: 20 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAQUEL VALIM LABRES – Nascida em 13 de julho de 1978, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, graduou-se em dezembro de 2008 em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), de 2007 a 2008, na área de nutrição de monogástricos do departamento de Zootecnia da UFRGS. No ano seguinte ao término da graduação, foi bolsista de Treinamento Técnico 3 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de 2009 a 2010 na área de nutrição de cães e gatos, sob a orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV/Unesp – Campus Jaboticabal.

“As coisas que queremos e parecem impossíveis só podem ser conseguidas com uma teimosia pacífica”.

Mahatma Gandhi

Dedico

Aos meus pais e meus irmãos, meu porto seguro, fonte de todas minhas forças.

Ofereço

A todos os cães e gatos que cruzaram minha vida, é por eles o meu empenho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me guiar e por colocar obstáculos em meu caminho que me ajudaram a crescer.

Aos meus pais Marta e José Carlos, por estarem sempre tão perto, mesmo que longe. Seu apoio, carinho e compreensão me deram determinação para perseverar.

Aos meus irmãos Patrícia, Maurício e Rafael: minha alegria, minha força, meu incentivo.

Ao Professor e orientador Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, por ter sido além de um orientador, conduzindo a um melhor trabalho e resolução dos problemas, também um amigo sempre preocupado com o bem estar de seus orientados. Agradeço também à sua família.

Ao Professor, co-orientador, grande mestre e amigo, Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, pela confiança em mim depositada.

À colega e amiga Mayara Corrêa Peixoto, pela amizade, dedicação, eficiência e ajuda sem a qual teria sido mais difícil.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada", Elaine e Diego, pela ajuda e dedicação aos animais.

A todos os colegas do Laboratório de Nutrição, estagiários Laurinha, Guilherme, Raquel Siqueira, Aline, Karine, Laís e Vitor; e pós-graduandos Letícia, Chayanne, Fernando Mulamba, Flávio Carioca, Fabiano, Marcinho, Bruna, Clarita Palagiano, Aninha, Marcinha, Ju Jerê, Danilo Sivi, Lê Zaine, Fernandinha, Íris Mayumi, Thaila, Dóris, Palumbo e Michele, pela amizade e carinho.

Aos amigos bigodes Anelise Cane, Lonjoré, Haroldo, Eliana, Letícia, Érika, Simone e Sharon, por terem sido minha família, meu irmãos em Jaboticabal.

A todos os amigos que fiz em Jabuka, em especial a querida Camila Neves pelos ótimos momentos e pela parceria incondicional.

Aos funcionários Cláudia, Paulo e Renata do Laboratório de Pesquisa Clínica Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FCAV-UNESP-Jaboticabal, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pelas análises realizadas.

Ao Professor Dr. Euclides Braga Malheiros pelo auxílio na elaboração e compreensão das análises estatísticas.

À Dra. Danielle Maia, ao Dr. Luis Gustavo Monazzi e à Prof. Dra. Iracilda Carlos do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus Araraquara (FCFAR-UNESP-Araraquara), pelo acolhimento e pela realização das análises de imunologia.

À Mogiana Alimentos S.A., pelo fornecimento das matérias-primas necessárias para a elaboração das dietas e pelo suporte financeiro necessário à manutenção do “Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de cães e gatos - Professor Dr. Flávio Prada”, pertencente à FCAV-UNESP-Jaboticabal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a execução deste projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio em forma de bolsa de treinamento técnico 3 (processo nº 2009/08166-0), de mestrado (processo nº 2009/12917-0) e em forma de auxílio financeiro à pesquisa (processo nº 2008/08401-6).

À Premier pet e aos queridos amigos que lá fiz neste ano de trabalho, agradeço pelo carinho, respeito e por possibilitar que eu me ausentasse em algumas situações para resolver pendências do mestrado.

Enfim, aos meus queridos Joaquim, Marley, Shake, Spike, Charlie, Luigi, Bola, Peri, Napô, Júnior, Juca, Tomas, Luizinho, Zezinho, Demétrius, Chico, Brad, Onofre, Odarina, Fiona, Coca, Laura, Rímel, Marina e Gracinha pela sua docilidade e lealdade que me faz amar cada dia mais a minha profissão.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
Oxidação, antioxidantes e influência na resposta imune.....	2
Espirulina como fonte de antioxidantes	8
Espirulina e resposta imunológica.....	11
Animais.....	16
Dietas e grupos experimentais	16
Avaliações dos tratamentos	21
Resposta imunológica	21
Produção de citocinas <i>ex vivo</i>	21
Anticorpos anti-leishmania do isotipo Imunoglobulina G (IgG)	22
Teste de hipersensibilidade cutânea tardia	24
Imunofenotipagem.....	25
Mensuração do <i>status oxidativo sérico</i>	26
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	26
Capacidade antioxidante total (TAC).....	27
Análise estatística	29
Comparação múltipla das médias	29
Análise de regressão (estudo de níveis)	29
Contrastes ortogonais	29
IV. RESULTADOS E DISCUÇÃO	30
Consumo das dietas, peso corporal e considerações gerais sobre o ingrediente.....	30
Imunofenotipagem.....	31
Quantificação de anticorpos anti-leishmania do isotipo IgG	37
Teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH)	40
Produção de citocinas <i>ex vivo</i>	45
Mensuração do <i>status oxidativo sérico</i>	50
V. REFERENCIAS	57
APÊNDICES.....	64
APÊNDICE A:.....	64
APÊNDICE B:.....	65

APLICABILIDADE DA ALGA CIANOFÍCEA *Spirulina maxima* COMO INGREDIENTE EM PETFOOD: AVALIAÇÃO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE E IMUNOLÓGICA EM CÃES

RESUMO – A *Spirulina spp.* é uma alga cianofícea que apresenta altas concentrações de substâncias com ação antioxidante em sua composição. Devido ao seu efeito na manutenção das reações de oxidação-redução (redox) do organismo, os antioxidantes são capazes de modular diversas funções orgânicas, dentre elas, a imunológica. Tendo isso em vista, delineou-se um experimento dose-resposta, no qual avaliou-se os efeitos imunológicos *in vivo*, *ex vivo* e indicadores do *status* oxidativo em cães alimentados com dietas extrusadas contendo espirulina. Foram formuladas cinco rações isonutrientes: Controle (Co), Co+ β -caroteno (controle positivo), Co+0,5%; Co+1,0% e Co+3,0% de espirulina, sendo a espirulina e o beta-caroteno adicionados externamente após o processo de extrusão. Utilizou-se 35 cães adultos beagle, distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos. Os animais receberam as dietas por 98 dias e foram estimulados imunologicamente no dia 70 com vacina anti-leishmania. Nos períodos 0, 70 e 98 dias avaliou-se a produção *ex vivo* de citocinas em cultura de células mononucleares de sangue periférico, a quantificação de subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo, de imunoglobulina G (IgG) anti-leishmania e o *status* oxidativo pela determinação das concentrações séricas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela determinação da capacidade antioxidante total (TAC). Como parâmetro de avaliação da resposta imune celular, realizou-se o teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH) nos dias 0 e 98. Os dados foram submetidos à análise de covariância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Não houve efeito de inclusão de espirulina sobre a produção de IgG anti-leishmania, DTH, subpopulações linfocitárias e produção *ex vivo* das citocinas IL-4, TNF- α e IFN- γ . Houve redução na produção de IL-10 nos grupos que receberam 1% e 3% de espirulina ($p < 0,05$) em relação ao Co. A inclusão de espirulina nas dietas propiciou redução nas concentrações de TBARS, conforme verificado pela relação linear inversa entre a inclusão do ingrediente e os níveis de TBARS. ($p < 0,005$). A dieta contendo 1% de espirulina proporcionou as menores concentrações de TBARS. Não houve efeito da inclusão de espirulina para a TAC. Não foi verificado efeito da dieta controle positivo em nenhuma das variáveis estudadas. Concluindo, a utilização de espirulina como um novo ingrediente na dieta de cães mostrou-se segura e proporcionou redução na produção *ex vivo* de IL-10 e nas concentrações séricas de TBARS, sendo este efeito dose-dependente. Estes achados podem estar relacionados com a atividade antioxidante desta alga já verificado em outras espécies animais, havendo a necessidade de mais estudos para comprovar seus benefícios também em cães.

Palavras-chave: nutrição, espirulina, oxidação, citocinas, linfócitos, ração.

APPLICABILITY OF CYANOPHYCEAE ALGAE *Spirulina maxima* AS INGREDIENT IN PETFOOD: EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND IMMUNE ACTION IN DOGS

SUMMARY –The cyanophyceae algae *Spirulina spp.* presents your composition relatively high concentrations of antioxidants. Because of its effect on the maintenance of the oxidation-reduction reaction (redox) in the body, antioxidants are able to modulate various physiological functions, like the immune system. A dose-response experiment it was designed to assess the immunological effects *in vivo* and *ex vivo* and the oxidative status in dogs fed with extruded diets having *Spirulina*. Four experimental isonutrient rations were formulated, being one Control diet (Co) and others three containing 0,5%, 1,0% or 3,0% of *Spirulina*, externally added after extrusion. 35 Beagle adult dogs were distributed in a randomized alignment in four groups. The animals received this diet for 98 days and the immunologic system was stimulated on the 70 day with leishmania vaccine. In the period 0, 70 and 98 days it was evaluated the *ex vivo* cytokine production in mononuclear cell culture, flux cytometry for Lymphocyte subpopulations quantification and concentrations of immunoglobulin G (IgG) anti-leishmania, and oxidative status avaluation. Concentrations of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined, as well as seric total antioxidant capacity (TAC) of the animals. Delayed-type hypersensitivity test (DTH) too was determined on 0 and 98 day. We conducted the analysis of covariance and Tukey's test was used to compare means. There was no effect of spirulina inclusion on the IgG anti-leishmania production, DTH, lymphocyte subpopulation (CD5+, CD4+, CD8+ and CD21+) and *ex vivo* cytokine production IL-4, TNF-alpha and INF-gamma. Moreover, there was significant decreases in the IL-10 production in the groups receiving 1 and 3 % of spirulina ($p < 0,05$). The inclusion of spirulina diet caused a reduction in the concentration of TBARS as verified by the inverse linear relationship between the inclusion of the ingredient and TBARS ($p < 0,005$). A diet containing 1% spirulina gave the lowest concentrations of TBARS. There was no treatment effect for TAC. There was no effect of the positive control diet in any of the variables studied. In conclusion, the use of spirulina as a new ingredient in the diet to dogs demonstrated to be safe and decreased the production *ex vivo* of IL- 10 and in seric concentrations of TBARS, this effect was dose dependent. These results may be related to the antioxidant activity of these algae, although more studies are required.

Keywords: nutrition, spirulina, oxidation, cytokine, lymphocyte, ration

I. INTRODUÇÃO

Manter a alimentação dos cães e gatos adequada tem sido uma busca mais frequente pelos proprietários que fornecem alimentos industrializados aos seus animais, visando otimizar a expectativa de vida e prevenir ou ao menos retardar o desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas. Com isto, a nutrição e os cuidados veterinários estão ganhando cada vez mais importância na sociedade (LOWE, 2002; BONTEMPO, 2005). É sobre este aspecto nutricional que a indústria de alimentos para animais de companhia tem buscado ingredientes que, além do atendimento das necessidades nutricionais básicas, tenham ainda propriedades funcionais, com o foco em promover a saúde e prevenir doenças. (HUSSEIN, 1998; NEUMANN et al., 2000; TAIPINA et al., 2002).

Os processos oxidativos do organismo, embora essenciais para a sobrevivência, também são responsáveis pelo envelhecimento e desenvolvimento de muitas doenças, tais como artrites, neoplasias, doenças renais, hepáticas e cardiovasculares, entre outros (LOWE, 2002). Por este motivo, os antioxidantes são importantes para a manutenção do balanço entre as reações de oxidação-redução (redox), e assim retardar ou impedir o desenvolvimento de muitas destas doenças (AHMED, 2005; PHAM-HUY *et al.*, 2008).

As algas do gênero *Spirulina spp.*, além de fonte de proteínas e de ácidos graxos gamma-linolênico (GLA), eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), também apresentam em sua composição aproximadamente 15% de biliproteínas (C-ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) (TAKEUCHI et al., 2008) com potente ação antioxidante demonstrada em estudos *in vitro* e em algumas espécies animais, mas ainda não estudadas em cães.

Baseando-se no exposto acima, neste projeto objetivou-se avaliar os efeitos da biomassa seca de espirulina, em diferentes concentrações na alimentação, sobre parâmetros da resposta imunológica e indicadores do *status* oxidativo sérico de cães, comparando estes efeitos com aqueles obtidos sem o uso de antioxidantes e com o uso de β -caroteno.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Oxidação, antioxidantes e influência na resposta imune

Viver sobre o risco do stress oxidativo é o preço que os organismos aeróbicos pagam por serem mais eficientes em termos de bioenergética (ANDREYEV et al., 2005). A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres, sendo os principais originários do metabolismo do oxigênio (espécies reativas de oxigênio; ERO's) e do nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio; ERN's). Estas moléculas têm um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outra molécula e por isso são extremamente reativas, podendo ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. No meio intracelular, originam-se de vias metabólicas, tais como a redução de flavinas e tióis, da atividade enzimática de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases, da interação com metais de transição (ferro, cobre, entre outros) e da cadeia de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres ocorre em várias organelas celulares, como mitocôndrias, a principal delas, mas também nos lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem a poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

O consumo de oxigênio pelas células leva a geração de uma série de radicais livres (RLs), especialmente o ânion superóxido. A interação destas espécies com macromoléculas (lipídeos, carboidratos e proteínas) ou a sua metabolização enzimática produz novos radicais, tais como peróxido de hidrogênio, hidroxila, alcóxila, peróxila, peroxinitritos, triclorometil, entre outros. Considerando a alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados como constituintes das membranas celulares e sua susceptibilidade ao ataque dos RL, os sistemas antioxidantes do organismo e os antioxidantes consumidos como parte da dieta são fundamentais para proteger as células dos danos causados pelos RL (MORAES & COLLA, 2006).

A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados usualmente envolve três fases: iniciação, propagação e terminação (GIROTTI, 1985). A fase da iniciação ocorre com a formação de um conjugado dieno pela subtração de um átomo de hidrogênio pelo

radical livre com reatividade suficiente (GUTERRIDGE & HALLIWELL, 1984). A fase de propagação da peroxidação lipídica decorre da interação do oxigênio molecular com o carbono, com formação do hidroperóxidos (GUTERRIDGE & HALLIWELL, 1984). Na fase de terminação, com a ajuda de metais catalíticos, a decomposição dos hidroperóxidos resulta na formação dos radicais alcoxil e peroxil que podem iniciar uma reação em cadeia, propagando a peroxidação lipídica (GUTERRIDGE & HALLIWELL, 1984). A figura 1 mostra sequencia de reações que ilustra o fenômeno:

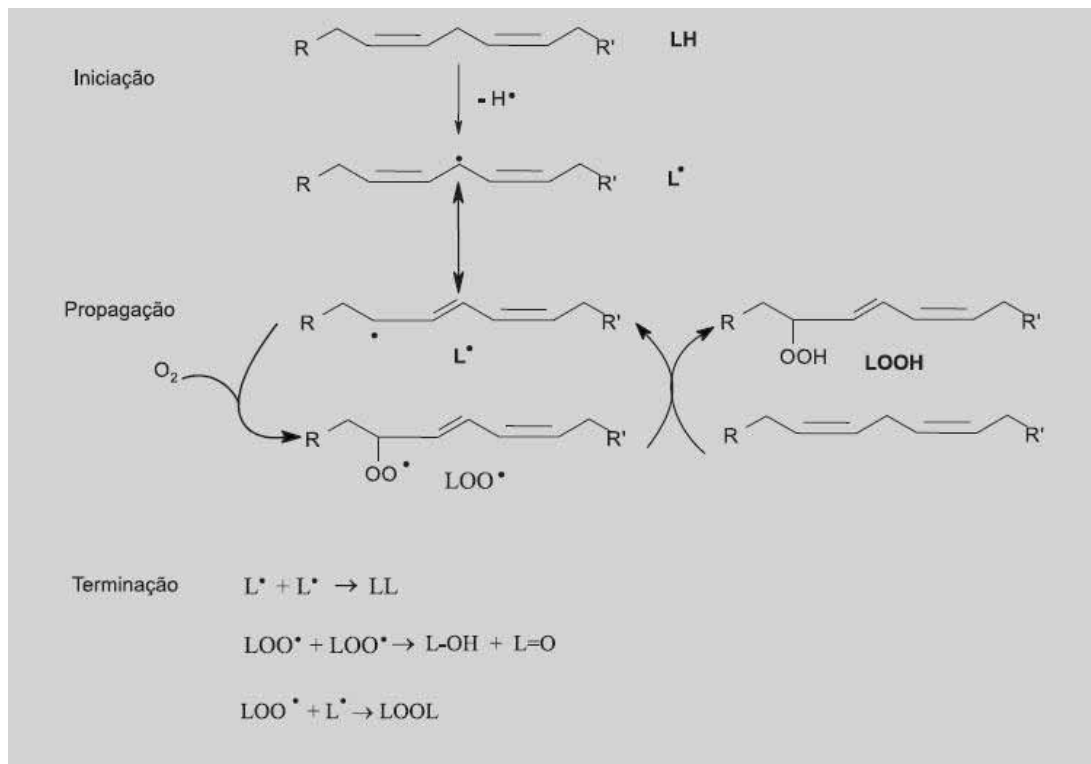


Figura 1: Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica. Fonte: Abdalla & Lima (2001).

A oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo radicais livres (ARAÚJO, 2001), e a velocidade da reação de oxidação depende, dentre outros fatores, do grau de insaturação da molécula do ácido graxo. Assim, quanto maior o grau de insaturação, maior será a suscetibilidade à oxidação. Desta maneira, os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelo radical livre, fazendo com que ocorra reação propagadora de auto-oxidação, na formação de novos radicais livres

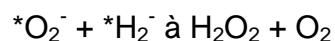
(BOOTH & MCDONALD, 1992; ARAÚJO, 2001). Sendo a membrana leucocitária e espermática ricas em ácidos graxos poliinsaturados (ZALATA & DEPUYDT, 1998; BAUMBER et al., 2000), estas tornam-se altamente sensíveis às espécies reativas de oxigênio (COMHAIRE & MAHMOUD et al., 1999; OCHSENDORF, 1999). Por este motivo os sistemas, imunológico e reprodutivo são particularmente sensíveis ao *stress* oxidativo.

Em um indivíduo sadio, apenas cerca de 2-3% do oxigênio consumido é transformado em RL, enquanto um indivíduo severamente doente pode transformar aproximadamente 75% do oxigênio consumido em RL (ANDRADE JR. et al., 1996).

O conjunto das substâncias que neutralizam os efeitos danosos dos radicais livres constitui o sistema de defesa antioxidante. Enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase estão localizadas no citosol, e nas mitocôndrias, onde grande parte dos radicais livres é produzida (JI et al., 1988). Davies (1988) sugeriu uma classificação para sistema de defesa antioxidante, dividindo-o em sistema de defesa primária e secundária. A defesa primária inclui complexos antioxidantes, como próvitamina A, vitamina E e C, glutatona e ácido úrico, e enzimas antioxidantes varredoras de radicais livres, como a superóxido dismutase, a catalase, e as peroxidases. A defesa secundária, por sua vez, seria composta por enzimas lipolíticas, fosfolipases, enzimas proteolíticas, enzimas reparadoras de DNA, endonucleases, exonucleases e ligases (DAVIES, 1988).

A dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase é frequentemente incluída na defesa antioxidante primária, porque esta enzima atua diretamente na prevenção do acúmulo do radical superóxido, através da seguinte reação:

superóxido dismutase



A taxa de dismutação do superóxido induzida pela superóxido dismutase é aproximadamente 10^4 vezes maior do que a dismutação química (FRIDOVICH, 1975). A superóxido dismutase é classificada em três tipos distintos dependendo do metal que

contém: Cu/Zn-superóxido dismutase (citosol), Mn-superóxido dismutase (mitocôndria) e Fe-superóxido dismutase (ANDRADE JR. et al., 1996).

A enzima catalase é considerada o maior componente da defesa antioxidante primária, atuando na catálise da decomposição de peróxido de hidrogênio em água e dividindo esta função com a glutathione peroxidase. Na presença de baixos níveis de peróxido de hidrogênio, os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela glutathione peroxidase, enquanto que em altas concentrações de peróxido de hidrogênio predomina a ação da catalase. A catalase pode ter um papel protetor contra alguns tumores, como o câncer de pulmão. Em um estudo com 24 pacientes portadores de câncer de pulmão, constatou-se redução na atividade de catalase no tecido tumoral em comparação com o pulmão normal (CHUNG-MAN et al., 2001).

Além do sistema enzimático, muitos outros componentes do organismo participam dos sistemas de defesa antioxidante, conforme citado anteriormente. Na tabela 1 podem ser visualizadas algumas destas substâncias e seus principais sítios de atuação. É importante que haja sinergismo entre as moléculas para ampliar a linha de defesa.

Tabela 1: Componentes envolvidos na defesa celular natural e seus locais de ação.

Tipo	Local
<i>Decomposição não radical</i>	
Catalase	citoplasma, espaço da matriz mitocondrial
Glutathiona	citoplasma, espaço da matriz mitocondrial
Glutathiona peroxidase	citoplasma
Glutathiona s-transferase	citoplasma
<i>Liberadores de oxigênio ativo</i>	
MnSOD	espaço da matriz mitocondrial e membrana
CuZnSOD	extracelular, citoplasma
<i>Agentes lipofílicos</i>	
Vitamina E, carotenóides, Flavonóides, ubiquinol, etc.	citoplasma e membrana mitocondrial
<i>Agentes hidrofílicos</i>	
Vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albumina	plasma, soro

Fonte: Lippman (1983), Camougrand & Rigoulet (2001)

Conforme pode ser verificado na tabela acima, agentes lipofílicos e hidrofílicos apresentam importante função em sítios celulares específicos e muitos deles não são produzidos pelo organismo, devendo ser adquiridos na dieta. Alguns alimentos funcionais e nutracêuticos têm sido empregados na alimentação de cães, graças à sua ação antioxidante, como por exemplo: carotenóides, vitamina C, taurina, coenzima Q, compostos sulfurados (n-acetilcisteína, S-adenosilmetionina, entre outros), fitoestrógenos, tocoferóis, flavonóides, zinco, selênio e polifenóis (LOWE, 2002). No entanto, estudos que avaliaram seus efeitos em *petfood* ainda são escassos e controversos.

Os principais representantes dos carotenóides são os carotenos precursores da vitamina A e o licopeno (CASTRO, 2008; HUGHES, 1999). As xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e oxidação. O

β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (AMBRÓSIO et al., 2006). O β -caroteno é o mais abundante em alimentos e o que apresenta a maior atividade de vitamina A. Tanto os carotenóides precursores de vitamina A como os não precursores, como a luteína, a zeaxantina e o licopeno, parecem apresentar ação protetora contra o câncer, sendo que os possíveis mecanismos de proteção são por intermédio do sequestro de radicais livres, modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinóides, estimulação da comunicação entre as células e aumento da resposta imune (AMBRÓSIO et al., 2006; STAHL & SIES, 2003; CHEW & PARK, 2004).

Os carotenoides atuam na função imunológica através de efeitos como promover a atividade mitogênica dos linfócitos, estimular a produção de anticorpos *in vivo*; aumento nas atividades enzimáticas da citocromo oxidase e peroxidase de macrófagos; estimular a atividade fagocitária de macrófagos e as reações ao teste de hipersensibilidade cutânea tardia; aumentar no número de células CD4+Th; induzir a produção de interleucina-2 e imunoglobulina G (CHEW & PARK, 2004). Dentre os carotenoides, o β -caroteno tem sido o mais estudado e apresenta efeitos benéficos na estimulação da resposta imunológica *in vitro* e *in vivo*, porém os resultados ainda são muito variáveis entre os estudos realizados até o momento.

O β -caroteno e a luteína, assim como a vitamina E são exemplos de antioxidantes utilizados e avaliados em cães e gatos, e os benefícios na resposta imunológica dos animais suplementados são a estimulação da resposta imune humoral e mediada por células (KIM et al., 2000a; KIM et al., 2000b; CHEW et al., 2000).

Heaton et al. (2002) suplementaram cães adultos com um *blend* de antioxidantes e verificaram que a elevação nas concentrações séricas de taurina e vitamina E foram associadas com menor dano sofrido no DNA, melhora na resposta vacinal dos animais e melhor atividade antioxidante do plasma dos cães suplementados.

A suplementação de 20 ou 50 mg/animal/dia (aproximadamente 200-500 mg/kg de ração) de β -caroteno em cães propiciou maior número de células CD4+ e maior relação CD4+:CD8+, tendo sido produzida uma maior concentração de IgG plasmática

e melhor resposta vacinal e resposta antigênica, quando comparados aos grupos que receberam menores doses de β -caroteno ou não suplementados (CHEW et al., 2000b).

A luteína também foi avaliada em cães por Kim et al. (2000a) nas doses de 5-20mg, que verificaram um aumento na resposta de proliferação de linfócitos *in vitro* e aumento no percentual de células expressando CD4+, CD5+ e CD8+ e na produção de IgG em resposta a vacinação, quando comparados aos grupos não suplementados. Em gatos, a luteína na dose de 10mg/animal/dia apresentou efeitos semelhantes aos de cães (KIM et al., 2000b). Sabe-se que o sistema imune está diretamente relacionado na contenção da proliferação de células tumorais e desta forma, a melhora na resposta imune também está relacionada com auxílio na prevenção do câncer (HUGHES, 1999).

Geralmente, mais de uma substância com atividade antioxidante encontra-se nos alimentos, o que torna importante a avaliação do potencial do alimento como um todo na redução dos danos oxidativos ao organismo.

Espirulina como fonte de antioxidantes

O aumento da demanda mundial de proteína tem sido o principal problema nutricional para a humanidade. Por este motivo, desde a década de 50 têm sido pesquisadas novas fontes proteicas, alternativas ou não-convencionais para a alimentação humana e animal. Desta forma, fungos, bactérias, leveduras e algas produzidas em escala industrial têm sido utilizadas como fontes protéicas na alimentação destas espécies (NASSERI et al., 2011). Além do elevado teor de proteínas, muitos destes microrganismos apresentam propriedades funcionais.

As algas cianofíceas do gênero *Spirulina spp.* apresentam uma longa história de uso na alimentação humana (BELAY, 2002). Isto porque estas algas são consideradas fontes ricas de aminoácidos (aproximadamente 65% de proteína bruta), minerais, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados (especialmente gamma-linolênico) e compostos antioxidantes. Devido à sua composição química, alguns efeitos imunomodulatórios têm sido atribuídos ao seu emprego na alimentação humana e animal (JAIME-CEBALLOS et al., 2005). Na sua composição, as espirulinas

apresentam quantidades significantes de alfa-tocoferol, glutationa, ácido ascórbico, astaxantina, luteína, zeaxantina, criptoxantina, β -caroteno e ficobiliproteínas (EL-BAKY et al., 2007), sendo este último grupo de substâncias seu principal componente com propriedades antioxidantes, representando cerca de 14% da biomassa seca destas algas (DUANGSEE et al., 2009).

Comparativamente às outras substâncias empregadas como antioxidantes na alimentação animal, o extrato alcoólico de espirulina inibiu a peroxidação lipídica mais significativamente (65% de inibição) que o alfa-tocoferol (35%), BHA (45%) e β -caroteno (48%). A atividade antioxidante da espirulina tem sido atribuída ao sinergismo dos antioxidantes presentes neste alimento, uma vez que a extração com hexano, éter de petróleo, etanol e água apresentam atividade antioxidante, demonstrando a presença de compostos de diferente natureza química na composição da espirulina (BELAY, 2002). Apesar disto, um aspecto importante é a atividade mais potente do extrato aquoso desta alga, mesmo após a remoção dos polifenóis, sugerindo a presença de compostos hidrossolúveis com importante ação antioxidante (CHOPRA & BISHNOI, 2008).

As ficobiliproteínas são um pequeno grupo de cromoproteínas que constituem o ficobilissomo, um complexo protéico macromolecular que apresenta como principal função fixar a luz pelo aparato fotossintético das cianobactérias. As classes mais comuns de ficobiliproteínas são as aloficocianinas, C-ficocianinas e ficoeritrinas (CHOPRA & BISHNOI, 2008), as quais são formadas por subunidades a e b, que carregam diferentes grupos prostéticos tetrapirrólicos lineares (cromóforo bilina). Estes grupos bilina são ligados a polipeptídeos através de ligações tioéter contendo resíduos de cisteína. As ficocianinas apresentam a estrutura química dos cromóforos bilina muito semelhante à bilirrubina, que por sua vez é conhecida por apresentar importante ação antioxidante fisiológica. Da mesma forma, a ficocianina sequestra ou inibe a formação de EROs em uma variedade de sistemas, sendo desta forma um potente antioxidante, atuando em radicais hidroxil, alcoxil e peroxil gerados durante o processo de oxidação. Na tabela 2 pode ser verificada a atividade antioxidante da ficocianina contra diferentes radicais formados em ensaios *in vitro*.

Tabela 2: Propriedades antioxidantes da ficocianina (principal constituinte da *Spirulina*) em diferentes sistemas.

Sistema de reação	Efeito
Superóxido gerada pela hipoxantina-xantina oxidase	Sem efeito
Radical alcoxil gerado pelo t-BOOH-ferro sulfato	Sequestro
Radical hidroxila gerado por peróxido de hidrogênio-sulfato ferroso (reação de Fenton)	Sequestro
Radical peroxila gerado por termólise de AAPH	Sequestro
Oxigênio Singlet	Sequestro
Peroxidação lipídica induzida pelo Fe ²⁺ , ácido ascórbico e termólise AAPH	Elimina
Peroxidonitrito gerado por peróxido de hidrogênio acidificado por nitrito	Sequestro
Hipoclorito	Remove
Oxigênio reativo produzido por estimulação neutrofílica com opsonização zimozan	Inibe

Fonte: Romay et al., 2003.

De uma maneira geral, os antioxidantes são moléculas relativamente sensíveis às condições adversas de pH, luminosidade e temperatura, sendo importante considerar estes aspectos no processamento de ingredientes com propriedades antioxidantes. Sarada et al. (1999) verificaram que a ficocianina se manteve estável em condições de pH entre 5-7,5; ocorrendo maiores perdas em pH ácido. Com relação à temperatura, estes autores verificaram que acima de 45°C ocorrem perdas significativas deste pigmento e que a secagem em estufa a 60°C ou o processamento por spray-dried, comumente usado para a secagem industrial da espirulina, podem levar a perda de 55% da ficocianina.

Tem sido demonstrado que a ficocianina inibe a hemólise induzida pelo 2,2'azobis (2-midinopropano) dihidroxicloreto (AAPH) na mesma intensidade que o trolox e ácido ascórbico, substância com propriedades antioxidantes conhecidas.

Baseado na IC_{50} a concentração de ficocianina capaz de inibir 50% a peroxidação lipídica foi 16 vezes menor que o trolox e 20 vezes menor que o ácido ascórbico (BELAY, 2002). Estes dados já haviam sido demonstrados por Hirata et al. (2000) que verificaram que a ficocianobilina (fração da ficocianina) apresentou atividade antioxidante maior que a do alfa-tocoferol, em mesma base molar. Neste estudo estes autores ainda verificaram que a atividade antioxidante foi mantida após a secagem da espirulina por spray-dried, indicando que apesar da desnaturação da ficocianina, o sítio ativo antioxidante desta molécula parece ser a ficocianobilina, que permanece estável, mesmo após o tratamento térmico.

Espirulina e resposta imunológica

O Sistema imunológico compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende de invasores internos, como bactérias, vírus ou parasitas. Existem dois tipos de mecanismos de defesa: o inato e o adquirido.

Na resposta imune inata, os microrganismos invasores são detectados inicialmente por células sentinela como macrófagos, mastócitos e células dendríticas, células ligadas a resposta inicial (TIZARD et al., 2009). Por isto, os receptores das células sentinelas não estão destinados a reconhecer todas as possíveis moléculas microbianas, e sim, utilizam seus receptores na detecção de moléculas altamente conservadas que se encontram em muitos grupos diferentes de microrganismos como os seus ácidos nucleicos característicos, estes são os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são reconhecidos por receptores do tipo Toll (TLR) situados na superfície celular e por outros receptores intracelulares. As células mais importantes nesta ação são as células sentinelas, que depois de ativadas pelo TLR secretam as citocinas que ativam o processo inflamatório. As citocinas pró-inflamatórias mais importantes são o fator de necrose tumoral – α (TNF – α), interleucinas 1 α e 6 (IL – 1 α e IL – 6). Elas são responsáveis por aumentar o fluxo

sanguíneo local e a permeabilidade capilar. Estas citocinas sintetizam óxido nítrico sintase 2 (NOS-2) que gera substâncias oxidantes como óxido nítrico. Também são responsáveis por sintetizar a enzima cicloxigenase2 (COX-2) que gera lipídeos inflamatórios, prostaglandinas e leucotrienos (TIZARD et al., 2009).

O TNF- α é uma proteína produzida por macrófagos, mastócitos, linfócitos T, células endoteliais, linfócitos B e fibroblastos. Pode ser encontrado na forma livre ou aderido à membrana. No momento em que os macrófagos e mastócitos detectam os patógenos invasores, liberam os TNF- α que estão associados às suas membranas que passam à forma solúvel, e estimula a liberação de quimiocinas e citocinas e promove a aderência, migração, atração e ativação dos leucócitos ao foco da invasão. O TNF- α pode destruir algumas células tumorais e células infectadas por vírus mediante a ativação em cascata e indução da apoptose (TIZARD et al., 2009). Uma outra citocina, a interleucina 10 (IL-10) é um inibidor de macrófagos ativados, o que lhe cabe um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata e da imunidade celular. Tem a função de inibir a produção de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos ativados, modulando a resposta imunológica.

Os macrófagos são também ativados por outra molécula, o IFN- γ , produzidos por células *Natural killers* (NK) e linfócitos T CD4. As células NK constituem de 5 a 20% das células mononucleares no sangue e baço, sendo raras em outros órgãos linfóides. Além de destruir as células infectadas diretamente, as células NK constituem uma fonte importante de IFN- γ (ABBAS et al., 2005). Acredita-se que a ingestão de espirulina promove o aumento da atividade fagocitária de macrófagos, estimulado por células NK. Khan et al. (2005) observaram o aumento na atividade das células NK em frangos de corte suplementados com uma inclusão de 10.000 ppm (1%) de espirulina em sua dieta.

Os neutrófilos apresentam em seu citoplasma grânulos com função bactericida, contendo em seu interior enzimas com atividade oxidativa e hidrolítica. No entanto, estas enzimas podem levar tanto a morte de patógenos, quanto à própria lesão tecidual e morte de células de defesa do hospedeiro. Por este motivo parece que os

antioxidantes apresentam importante função na resposta imunológica inata, protegendo as células de defesa dos danos oxidativos.

O maior componente protéico da espirulina, a C-ficocianina, tem sido investigada quanto a sua capacidade de influenciar as funções imunológicas, especialmente na inibição da tumorigênese em animais de laboratório, na modulação da resposta inflamatória, na regulação da produção de determinadas citocinas *in vivo* e *in vitro* e na atividade de fagocítica de macrófagos (Borchers et al., 2008). A espirulina possui ainda, alguns glicolípídeos (O- β -D-galactosyl-(1-10)-20,30-di-O-acyl-D-glycerol), os quais possuem características imunológicas semelhantes aos componentes da parede celular de microorganismos, funcionando como ligantes Toll, que por sua vez estimulam especialmente receptores TLR-2 e TLR-4. Por este motivo, estes alimentos são reconhecidos como “elementos estranhos” ao organismo e estimulam a resposta imunológica. Especialmente as linhagens mielóides (monócitos/macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos) possuem um repertório de receptores reconhecedores de antígenos, sendo estes estimulados pela espirulina, com possíveis impactos na atividade anti-viral e anti-tumoral estudada desta cianobactéria. Hirahashi et al. (2002) verificaram em estudos com células do sistema imunológico de seres humanos, que a espirulina atuou diretamente nas linhagens mielóides e direta ou indiretamente na ativação das células NKs.

Diferente da resposta inata, a resposta imunológica adaptativa é altamente especializada a um determinado antígeno em particular e se torna mais intensa e rápida à medida que o indivíduo mantém o contato com o antígeno. São envolvidas nesta resposta os linfócitos T e B. A principal função dos Linfócitos B é produzir anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Estas células expressam IgM e IgD em sua superfície para reconhecer os antígenos. Após a sua ativação iniciam a secreção de IgM. As células T são divididas em T auxiliares e T citotóxicas. A subclasse T auxiliar contribui com os macrófagos no combate aos microorganismos, enquanto as células T citotóxicas têm papel crucial na indução de células B para produzir anticorpos. Estas células induzem a morte celular de células infectadas. Hirahashi et al. (2002) verificaram que a espirulina

induziu vias apoptóticas (NFκ-β e MAPK) em macrófagos humanos e de ratos infectados.

Apesar destas respostas indutoras das vias de resposta imunológica dos animais, a espirulina apresenta componentes ativadores e outros inibidores ou supressores de tais respostas. As ficocianinas apresentam principalmente atividade imunomodulatória, com possíveis aplicações em doenças imunomediadas (BELAY, 2002). Em modelos de inflamação em ratos, a ficocianina inibiu a formação de edema, liberação de histamina, atividade de mieloperoxidase e níveis de prostaglandina (PGE₂) e leucotrieno (LTB₄) nos tecidos inflamados. Estes efeitos foram atribuídos a sua capacidade de sequestrar radicais livres e seus efeitos inibitórios na atividade da cicloxigenase (COX-2) e liberação de histamina por mastócitos (ROMAY, 2003). O uso da espirulina em pacientes transplantados beneficiou o tratamento, provocando a supressão de CD28, o qual possui um potente efeito estimulatório de células T e de interleucinas (IL), como a IL-2 e IL-6. Este efeito imunossupressor foi similar ao produzido por drogas como o ciclosporina, que apresentam efeitos colaterais indesejáveis (ISMAIL et al., 2009).

Em estudo feito com *Spirulina fusiformis*, os seus efeitos *in vivo* na inibição da resposta imune humoral foram notadas em forma dose-dependente em camundongos. Observaram-se *in vitro* diminuição na proliferação linfócitos T mitógeno-induzida, sugerindo a existência de ativação de mecanismos imunossupressores pela espirulina (SHEAHAN et al., 2008), os quais são pouco compreendidos.

As reações alérgicas no organismo são geralmente mediadas por IgE. As ações biológicas da IL-4 incluem estimulação da IgE e reações mediadas por mastócitos/eosinófilos (ABBAS et al., 2005). Hayashi et al. (1996b) observaram os efeitos da ficocianina na melhora da atividade de defesa biológica através da redução de reação alérgica pela supressão de antígeno anticorpo IgE específico e através da manutenção da função do sistema imunológico contra doenças infecciosas em ratos. Em seu estudo duplo-cego, Hosoyamada et al. (1991), trataram pacientes com rinite alérgica, onde o grupo controle recebeu placebo e outro *Spirulina platensis*, este último mostrou redução marcada da secreção pró-inflamatória IL-4 em 32% dos casos, juntamente com o alívio dos sinais clínicos.

Considerando a complexidade de possíveis componentes atuantes da espirulina sobre a resposta imune do hospedeiro, muitos estudos são necessários para verificar a viabilidade de seu uso na prática, visando conhecer sua atuação sobre o sistema imunológico.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp, campus de Jaboticabal. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Bem-Estar e Ética no Uso de Animais (CEBEUA) da mesma Faculdade tendo como número de protocolo nº 017641-08 (Apêndice A).

Animais

Foram inseridos no estudo 35 cães adultos da raça beagle, com idade média de 4,5 +/- 1,5 anos, entre machos e fêmeas. Todos os animais foram devidamente desverminados e submetidos ao exame clínico, antes do início do estudo. Uma amostra de 10mL de sangue foi obtida por venipunção da jugular para a realização do hemograma e determinação do perfil bioquímico e enzimático sérico, com a finalidade de atestar a saúde de todos os animais. Foram feitas as dosagens de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, glicose, bilirrubina total e direta, proteínas totais e albumina, usando-se kits específicos (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil).

Dietas e grupos experimentais

Os animais foram submetidos à adaptação pré-experimental realizada com uma mesma dieta comercial (Herói Adulto Carne, Mogiana Alimentos S.A., Campinas, Brasil), em quantidade suficiente para manter o peso corporal durante período de quatro semanas, atendendo os padrões mínimos de exigência da AFFCO, utilizou-se esta dieta para adaptação, por ser ela desprovida da adição de antioxidantes e desta forma, excluir-se a possibilidade de interferência de ingredientes presentes nesta dieta

na coleta basal, no início do experimento, na tentativa de uniformizar os grupos experimentais e homogeneizar as variáveis biológicas em estudo. A pesquisa foi conduzida em dois blocos, sendo o primeiro com 20 cães e o segundo com 15 cães, aleatoriamente distribuídos entre os cinco tratamentos, cada grupo experimental contou com sete repetições. A necessidade energética diária de cada animal foi calculada seguindo-se a equação abaixo:

$$\text{NEM} = 130 \times (\text{Peso corporal})^{0,75}$$

Onde: NEM – necessidade energética de manutenção; peso corporal^{0,75} – peso metabólico.

A energia metabolizável dos alimentos foi calculada conforme o NRC, 2006, e foi estimada em aproximadamente 3.732 kcal/kg.

A quantidade de alimento calculada foi dividida em duas refeições diárias (11:00h e 17:00h). Os animais foram pesados quinzenalmente e ajustes individuais nas quantidades de alimento fornecido foram realizados para garantir a manutenção do peso corporal.

O beta-caroteno utilizado na pesquisa foi doado pela empresa DSM Nutritional Products (Beta-carotene 10% CWS, São Paulo, Brasil). A biomassa seca de espirulina (*Spirulina maxima*) para este estudo (figura 2) foi fornecida pela empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda. (*Spirulina maxima*, São Paulo, Brasil) seu país de origem é a China e teve como número de autorização da ANVISA 1.04.604-1. O laudo de análise química do ingrediente encontra-se no Apêndice B.



Figura 2: Ingrediente espirulina (*Spirulina maxima*) empregado no estudo.

As dietas experimentais foram formuladas com o auxílio do software estatístico Super Crac (TD Software, Viçosa, Brasil) e as composições químicas analisadas das

dietas e dos ingredientes encontram-se na Tabela 3. Formulou-se uma dieta controle negativo, uma dieta contendo beta-caroteno (40ppm) e outras três dietas contendo diferentes concentrações (0,5%; 1% e 3%) do ingrediente teste espirulina.

Tabela 3: Composição química analisada das dietas, para cães, com diferentes adições de antioxidantes (valores expressos na matéria seca) ^{1,2}

Item	Dietas experimentais				
	Co	βCar ³	Esp 0,5% ⁴	Esp 1% ⁴	Esp 3% ⁴
Matéria seca (%)	91,84	91,96	92,05	92,78	92,22
Proteína Bruta (%)	24,03	23,33	21,76	21,92	21,74
Extrato Etéreo (%)	13,31	12,77	12,54	12,19	12,48
Fibra Bruta (%)	3,32	2,89	3,11	3,27	2,73
Matéria Mineral (%)	5,11	4,78	4,92	4,91	4,87
Extrativos não nitrogenados (%) ⁵	54,24	56,26	49,76	50,58	50,48
Energia Bruta (kcal/kg)	4926,5	4904,0	4117,8	4221,2	4172,8

Co- controle; βCar- β-caroteno; Esp 0,5%- 0,5% de espirulina; Esp 1%- 1% de espirulina; Esp 3%- 3% de espirulina, todos adicionados pós-extrusão.

¹- Ingredientes: Milho Integral Moído (42,32%), Farinha de vísceras de aves (21,91%), quireira de arroz (20,00%), fibra de cana (3,17%), glúten de milho (0,0-3,0%), gordura de aves (2,91%), óleo de peixe (2,00%), hidrolisado de fígado (2,00%), cloreto de potássio (0,56%), fosfato bicálcico (0,49%), calcáreo (0,49%), sal comum (0,41%), l-lisina (0,25%), cloreto de colina (0,20%), premix mineral e vitamínico (0,15%), antifúngico Mold-Zap Aquativa (Alltech do Brasil, Brasil) (0,10%), antioxidante Banox (Alltech do Brasil, Brasil) (0,04%), espirulina (0,0-3,0%).

²- Enriquecimento por quilograma: vitamina A (20000UI); vitamina D3 (1500UI); vitamina E (150UI); vitamina K (1mg); vitamina B1 (1,5mg); vitamina B2 (1,5mg); pantotenato de cálcio (15mg); Niacina (20mg); vitamina B6 (1,5mg); biotina (0,2mg); ácido fólico (1mg); vitamina B12 (30mcg); colina (1200mg); manganês (6mg); zinco (150mg); ferro (90mg); cobre (8,5mg); iodo (1,6mg); selênio (0,3mg); propilgalato (1mg); BHT (1mg); BHT (10mg).

³- Beta-carotene 10% CWS, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brasil. Adição de 400mg/kg, após a extrusão.

⁴- adição do ingrediente em substituição ao glúten de milho.

⁵- valores calculados.

As rações experimentais foram produzidas na Fábrica de Ração do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal (FCAV/Unesp). A mistura das rações foi moída previamente à extrusão

em moinho com peneira de 0,8mm e em seguida extrusada (Extrusora MAB 400S, com capacidade de processamento de 150kg de ração/hora). As condições de processamento foram controladas (produtividade, pressão de vapor, temperatura de extrusão, temperatura de secagem, umidade do extrusado, densidade do extrusado, umidade da ração após a secagem e atividade de água da ração seca), procurando-se manter as mesmas condições de processamento para todas as rações.

Visando padronizar a composição das dietas, foi produzida uma única partida de ração. Esta foi posteriormente desdobrada nos tratamentos experimentais. Para isto, tendo em vista a semelhança do teor de proteína bruta da espirulina e do glúten de milho (aproximadamente 60%), a dieta controle e com beta-caroteno tiveram adição de 3% de glúten de milho e nas demais dietas, o glúten foi substituído parcial ou integralmente pela espirulina.

O recobrimento com os ingredientes em pó das dietas beta-caroteno, 0,5%; 1,0% e 3,0% de espirulina foi realizado imediatamente após os banhos com gordura e palatilizante líquido, visando melhor aderência do pó ao produto final. Para melhor homogeneização e distribuição, estes ingredientes (espirulina ou beta-caroteno) foram previamente pesados e a quantidade total adicionada sobre a ração, lentamente, com o misturador helicoidal em movimento. Na Figura 3 podem ser visualizadas as dietas experimentais finalizadas. Notar que nas dietas C, D e E, a espirulina confere uma coloração esverdeada externa devido ao ingrediente. A coloração avermelhada da dieta contendo beta-caroteno (B) é artificial, pelo uso do corante amarelo crepúsculo, para que esta pudesse ser diferenciada da dieta controle (A).

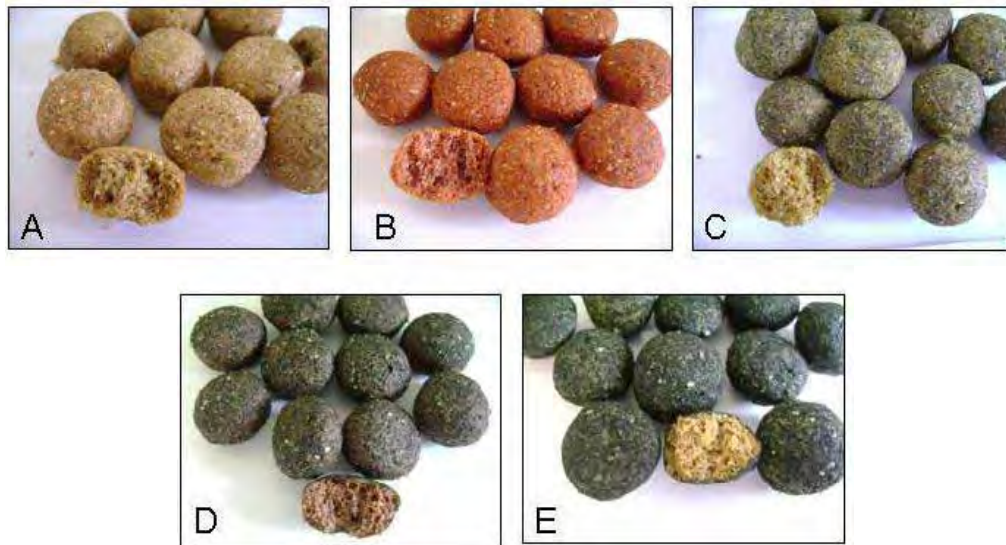


Figura 3: Dietas: Controle (A); Beta-caroteno (B); 0,5% espirulina (C); 1,0% espirulina (D); 3% espirulina (E);

As análises químicas das rações foram realizadas no laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da FCAV/Unesp-Jaboticabal, São Paulo.

Avaliações dos tratamentos

Resposta imunológica

Foram avaliadas ao longo do estudo as respostas imunológicas de cada um dos grupos experimentais, por meio de testes *in vivo* e *ex vivo*, conforme as descrições abaixo. Todas as análises, após a colheita e preparo das amostras, foram realizadas no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Campus de Araraquara-SP.

Produção de citocinas *ex vivo*

Amostras de sangue total foram utilizadas para a determinação da produção de citocinas *ex vivo* por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em mitógenos lipolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, Sigma Aldrich, São Paulo) e Concanavalina A (ConA tipo IV; C2010; Sigma-Aldrich, São Paulo-Brasil), visando mimetizar as condições *in vivo*.

Para este teste, foi utilizada uma amostra de oito mililitros (8mL) de sangue total heparinizado dos animais e a separação das células foi realizada com o uso de Histopaque 1,077 e 1,119 (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), seguindo orientação do fabricante, para a obtenção da camada de células mononucleares com o mínimo de contaminação possível. Após a separação e contagem, verificou-se a viabilidade das células pelo método do azul de Tripán. Foram consideradas amostras viáveis para o teste apenas aquelas em que se verificou viabilidade celular acima de 90%. Após a confirmação da viabilidade celular dentro dos limites toleráveis, as células foram re-suspendidas em meio de cultura RPMI-1640, contendo 25mM HEPES, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Sigma-Aldrich, São Paulo-Brasil) e diluídas para padronizar a concentração de 2×10^6 células/mL de meio de cultura.

Imediatamente após foram incubadas da seguinte maneira: só células (sem adição de mitógenos); células estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, Sigma Aldrich, São Paulo) na diluição de 1:10.000; células estimuladas com

Concanavalina A (ConA, Sigma Aldrich, São Paulo) na diluição de 1:10.000. O período de incubação foi de 24h, seguindo os protocolos já padronizados pelo laboratório de imunologia da FCFAR-Unesp-Araraquara. As condições de incubação foram de 37°C, com umidade e atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂. O sobrenadante das culturas foi devidamente colhido, após a centrifugação das placas, identificado e congelado em freezer a -80°C para posterior quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4, produzidas durante o período de incubação. Para a quantificação das citocinas empregou-se um painel para quantificação simultânea de até 12 citocinas, específico para cães (MILLIPLEXTMMAP, Canine Citokine, Millipore Corporation, E.U.A.), pela tecnologia LUMINEX[®]MAP. Os kits e as análises foram fornecidos pela empresa Genese Produtos Diagnósticos Ltda. (São Paulo, Brasil) e as análises realizadas após o término do estudo, visando a otimização dos kits para aproximadamente 76 testes. As citocinas IL-10 e IFN- γ foram quantificadas a partir do sobrenadante da cultura estimulada com o mitógeno Concanavalina-A. O TNF- α e a IL-4 foram quantificados a partir do sobrenadante de células estimuladas com o mitógeno lipopolissacarídeo de *E. coli*. A produção de citocinas *ex vivo* foi quantificada em três momentos: Início (dia 0); no dia 70 e no dia 98 do estudo.

Anticorpos anti-leishmania do isotipo Imunoglobulina G (IgG)

Esta dosagem foi feita com o intuito de verificar a intensidade da resposta vacinal dos animais. Para isto, todos os cães foram vacinados com 1mL subcutâneo da vacina anti-leishmania (Leishmune[®], FortDodge, São Paulo, Brasil). O protocolo de vacinação se deu no momento 70 do experimento, e as colheitas de amostras, foram realizadas nos dias 0 (basal I), 70 (basal II, que corresponde ao dia da vacinação), 84 (14 dias após a vacinação) e 98 (28 dias após a vacinação) de estudo. Foi empregada para a quantificação de IgG anti-leishmania a técnica de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), realizada no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp-Jaboticabal.

A preparação do antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* para o teste de ELISA indireto foi realizado conforme preconizado por Oliveira et al. (2008). Foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *L. chagasi* diluído na concentração 5µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, e de pH 9,6 em cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nunclon™ Surface, Nunc. Denmark). Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas com tampão PBS 0,01M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 80. As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 80 acrescido de 6% de leite em pó em câmara úmida a 37°C por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador foram adicionados, em duplicata, 100µL dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos na diluição 1:400 em PBS Tween 80 com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas e lavadas como descrito anteriormente e 100µL do conjugado anti-IgG de cão com a peroxidase (Sigma – Cat. nº A6792-1ML) na diluição 1:8000, diluído em PBS-Tween 80 acrescido de 5% de soro normal de coelho foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. Adicionou-se o substrato (comprimidos O-fenilendiamina dicloridrato, 2mg de substrato por comprimido), diluído em tampão citrato e peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos adicionou-se ácido sulfúrico para bloquear a reação enzimática. A leitura da placa foi feita em filtro de 490nm. Os resultados encontrados foram expressos como índice amostra/positivo (A/P), o qual foi calculado através da seguinte fórmula:

$$A/P = \frac{(DO \text{ amostra} - DO \text{ soro negativo})}{(DO \text{ soro padrão positivo} - DO \text{ soro negativo})}$$

Onde: DO amostra é a densidade óptica da amostra analisada

DO soro negativo é a densidade óptica dos soros padrão negativos

DO soro positivo é a densidade óptica dos soros padrão positivos

Teste de hipersensibilidade cutânea tardia

Para a avaliação da resposta celular por este teste, o antígeno foi injetado pela via intradérmica na prega cutânea localizada na região lateral do abdômen dos animais, conforme ilustrado nas figuras 4 e 5. Para a execução deste procedimento a região foi devidamente depilada.



Figura 4. Região lateral ao abdômen depilada para a realização do teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH).



Figura 5. Prega cutânea da virilha com os locais de inoculação da solução salina (marcação à esquerda) ou dos antígenos vacinais de leishmania (marcação central) e raiva (marcação à direita).

Foi inoculado 0,1mL de cada uma das soluções na região descrita, conforme seguem: 1) no ponto mais cranial - salina (8,5g/L) como controle negativo (branco); 2) no ponto intermediário - vacina com antígeno modificado de leishmania (Leishmune[®], FortDodge, São Paulo, Brasil); 3) no ponto mais caudal - vacina anti-rábica (Rai-vac[®] I, Fort Dodge saúde animal, Campinas, Brasil).

O aumento de volume da pele foi mensurado nos momentos 24, 48 e 72h após as injeções intradérmicas e comparado com as mesmas medidas no momento inicial, com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo 500-144b, Tóquio, Japão), que aplica automaticamente a força de 2 Newton no local de mensuração. Os momentos de realização do teste foram nos dias experimentais 0 e 98. Foram apresentados apenas os resultados do dia 98, uma vez que o teste realizado no momento inicial serviu apenas para assegurar igualdade entre os grupos experimentais.

Imunofenotipagem

Os cães foram submetidos à avaliação quantitativa de células CD4, CD5, CD8 e CD21 no sangue periférico, para a imunofenotipagem dos linfócitos. A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo, no laboratório de imunologia da Faculdade de ciências farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – Campus de Araraquara.

Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a colheita do sangue, no momento 0, 70 e 98 do experimento. A metodologia para a avaliação citofluorométrica incluiu identificação de quatro tubos estéreis para cada amostra. (tubo 1 - γ 1PE/ γ 2FITC, tubo 2 -CD5FITC/CD4PE , tubo 3– CD5FITC/CD8PE e tubo 4- CD5FITC/CD21PE). Foram adicionados 100 μ L de amostra (sangue periférico) e 2 μ L dos respectivos reagentes: γ 1PE (R104, Caltag) e γ 2FITC (MCA1212F, Serotec) no tubo 1; anti-CD5 conjugado com FITC (MCA1037F, Serotec) e anti-CD4 conjugado com PE (MCA1038PE, Serotec) no tubo 2, anti-CD5 conjugado com FITC (MCA1037F, Serotec) e anti-CD8 conjugado com PE (MCA1039PE, Serotec) no tubo 3 e anti-CD5 conjugado com FITC (MCA1037F, Serotec) e anti-CD21 conjugado com PE (VMRD) no

tubo 4. Os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Um mililitro de tampão de lise de hemácias foi adicionado em cada tubo, seguido da homogeneização e incubação abrigado da luz à temperatura ambiente por 10min.; os tubos foram então incubados por dez minutos à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com PBS por três vezes, que consiste na centrifugação a 1800rpm por três minutos, desprezado o sobrenadante e adicionados 2mL de PBS.

Depois de desprezado o sobrenadante, foi adicionado 200 μ L de PBS nos quatro tubos e as amostras submetidas à análise no citofluorômetro FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA) para identificação e contagem das subpopulações linfocitárias.

Mensuração do *status* oxidativo sérico

Nos dias experimentais 0, 70 e 98 foi avaliado o status oxidativo dos animais aos tratamentos, pela quantificação de metabólitos da peroxidação lipídica no soro dos animais (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), pela determinação da capacidade antioxidante sérica e ainda pela quantificação do ácido úrico, conforme descrito a seguir.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método foi realizado conforme descrito por Paya et al. (1992). A extensão da degradação dos lipídeos pelo ataque de radicais livres pode ser indiretamente medida por este método, que consiste na reatividade dos produtos finais da lipoperoxidação, especialmente o malondialdeído e outros aldeídos, com o ácido tiobarbitúrico, produzindo cromógenos que podem ser medidos espectrofotometricamente entre 520-540nm. Foram separadas duas amostras de soro de cada animal. Foi adicionada à primeira 2mL da solução de TBA (15% de Ácido Tricloroacético, 0,275% de Ácido Tiobarbitúrico e 0,25M de Ácido Clorídrico). Em seguida, os tubos foram fervidos por 15 minutos em banho-maria e, então, resfriados e centrifugados por 15 minutos a 1200G, formando um precipitado. O sobrenadante foi analisado ao espectrofotômetro UV-

visível. O cromógeno desenvolvido foi identificado por meio de leituras de absorvância em um comprimento de onda fixo de 532nm conforme metodologia descrita por Paya et al. (1992) determinando a quantidade de lipoperoxidação na amostra. À segunda amostra foi adicionada 2mL de solução de TBA-SG (15% de Ácido Tricloroacético, 0,375% de Ácido Tiobarbitúrico, 0,25M de Ácido Clorídrico, 0,24mM de Cloreto de Ferro e 50µM de Hidroxitoluenobutilado). Esse procedimento foi denominado de sistema gerador e tem a mesma função do sistema gerador para o radical O_2^- e H_2O_2 . Os resultados foram expressos em valores de absorvância, considerando que a elevação da absorvância é diretamente proporcional à concentração de malondialdeído presente na amostra.

Capacidade antioxidante total (TAC)

Essa é uma técnica utilizada para mensuração de radicais totais em culturas celulares, tecidos, plasma e soro. Foi utilizado kit específico (Antioxidant Assay Kit, CS0790, Sigma, São Paulo, Brasil), cujo princípio é a indução *in vitro* da formação dos radicais ferril mioglobina, metmioglobina e peróxido de hidrogênio que oxidam o ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) levando a produção de um radical cátion $ABTS^+$, um cromógeno solúvel de coloração esverdeada que pode ser determinado pelo espectrofotômetro num comprimento de 405nm. Desta forma, a presença de antioxidantes na amostra inibe parcialmente a oxidação do ABTS. Para o teste, as soluções estoques foram preparadas de acordo com o boletim técnico que acompanha o Kit da seguinte maneira: o tampão foi diluído a 10X; solução estoque de mioglobina (adicionado 285µL de água e estocado a menos 20°C); solução trabalho (1µL de estoque de mioglobina em 99µL de tampão, no momento da utilização); solução trabalho de Trolox (adicionado 2,67mL de tampão 1X, estocado a -20°C); solução ABTS (adicionado um tablete de ABTS mais um tablete de fosfato mais 100mL de água, estocado a 4°C); solução trabalho 10µL da solução de ABTS mais 25µL de peróxido de hidrogênio a 3% que deve ser utilizado em 20 a 30 minutos. O plasma foi

descongelado a temperatura ambiente e centrifugado a 2000g por 10 minutos a 4°C, removendo-se o sobrenadante para continuar o procedimento.

O procedimento foi realizado em placas de 96 poços sendo adicionados sobre o sobrenadante 10µL da solução trabalho de Trolox, 20µL da solução trabalho de mioglobina, 150µL de solução trabalho de ABTS. Passados dois minutos, período de incubação em temperatura ambiente foi adicionado 100µL de solução STOP que se encontrava em temperatura ambiente. Em seguida, foi efetuada a leitura em absorbância de 405nm. Para o conhecimento das concentrações de antioxidante foi construída uma curva padrão com a expressão dos resultados em equivalentes de TROLOX (análogo hidrossolúvel da vitamina E).

Análise estatística

Comparação múltipla das médias

Para esta análise os dados foram submetidos a análise de covariância (ANCOVA), considerando como co-variável as dosagens do momento inicial para cada variável, dentro dos respectivos grupos. Desta forma o momento inicial foi co-variável dos momentos posteriores (70, 86 e 98 dias). Considerou-se para esta análise, 5% de probabilidade. Verificou-se os efeitos de tratamento, período e as interações. Para a comparação múltipla das médias, utilizou-se o teste Tukey, considerando o pareamento dos dados ao longo do tempo (0, 70, 86 e 98 dias) dentro dos grupos e não-pareamento dos dados entre os grupos, dentro de cada período, considerando também 5% de probabilidade. Os dados estão apresentados como média (ajustadas pela co-variável) e erro-padrão da média.

Análise de regressão (estudo de níveis)

Esta análise foi realizada para a verificação da relação entre a adição de espirulina nas rações e respostas biológicas dos animais. Para isto, foram incluídos apenas os tratamentos Controle (0% de espirulina); 0,5%; 1,0% e 3,0% de espirulina. Verificou-se os efeitos lineares e quadráticos, considerando 5% de probabilidade. Para estas análises utilizou-se o valor ajustado de cada variável em função da covariável M-0, conforme descrito acima.

Contrastes ortogonais

Adicionalmente, realizou-se a análise de contrastes ortogonais, respeitando os seguintes modelos pré-estabelecidos: Controle vs. Espirulina; Beta-Caroteno vs. Espirulina, também considerando 5% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software estatístico SAS (SCHLOTZAUER & LITTELL, 1997) e os dados apresentados em uma mesma tabela, de acordo com o grupo de variáveis.

IV. RESULTADOS E DISCUÇÃO

Consumo das dietas, peso corporal e considerações gerais sobre o ingrediente

O peso corporal foi mantido constante ao longo do estudo, mas a ingestão energética dos animais teve que ser reduzida em todos os grupos para não ocorrer ganho de peso (Tabela 4).

Não foi verificada recusa ou redução na ingestão dos alimentos com a utilização da espirulina nas dosagens empregadas no estudo. Da mesma forma, não se verificou alteração na qualidade das fezes ou qualquer outra alteração clínica dos animais, porém, as fezes dos cães que consumiram o alimento com 3% de espirulina ficaram esverdeadas.

O ingrediente mostrou-se seguro para a utilização na dieta de cães até as concentrações empregadas neste estudo, visto que não foi verificada qualquer modificação no hemograma ou exames bioquímicos sanguíneos dos cães, realizados no início e término do estudo (dados não apresentados).

Tabela 4: Peso corporal e ingestão energética diária pelos cães ao longo do estudo

<i>Período</i>	Co	β Car	Esp 0,5%	Esp 1%	Esp 3%
<i>Peso corporal (kg)</i>					
Início	11,3 \pm 0,6	12,2 \pm 0,6	11,5 \pm 0,5	11,8 \pm 0,4	11,6 \pm 0,9
70 dias	11,5 \pm 0,6	12,3 \pm 0,6	11,4 \pm 0,6	11,9 \pm 0,3	11,6 \pm 1,0
98 dias	11,5 \pm 0,6	12,3 \pm 0,7	11,3 \pm 0,6	11,9 \pm 0,4	11,6 \pm 1,0
Média	11,4 \pm 0,6	12,3 \pm 0,6	11,4 \pm 0,5	11,9 \pm 0,5	11,6 \pm 0,9
<i>Ingestão energética diária (kcal/kg(PC)^{0,75})</i>					
Início	130 \pm 8,0	130 \pm 8,0	130 \pm 7,0	130 \pm 6,0	130 \pm 11,0
70 dias	115 \pm 8,0	109 \pm 8,0	114 \pm 7,0	111 \pm 6,0	109 \pm 11,0
98 dias	117 \pm 8,0	113 \pm 5,0	124 \pm 9,0	114 \pm 5,0	116 \pm 11,0
Média	121 \pm 6,0	118 \pm 2,0	123 \pm 9,0	119 \pm 4,0	119 \pm 6,0

Co= controle; β Car= ração com β -caroteno; Esp 0,5%= ração com 0,5% de espirulina; Esp 1%= ração com 1% de espirulina e Esp 3%= ração com 3% de espirulina

Imunofenotipagem

Os dados de imunofenotipagem estão apresentados na Tabela 5. Não houve efeito dos tratamentos para nenhuma das populações linfocitárias estudadas ($P > 0,05$). Desta forma, a utilização da espirulina ou β -caroteno não estimularam ou inibiram a resposta linfocitária *in vivo* dos animais, nas dosagens empregadas.

Por outro lado, houve efeito significativo de período, conforme o momento do experimento para os linfócitos T citotóxicos (CD8+; $P < 0,05$), linfócitos B (CD21+; $P < 0,05$) e a relação linfócitos T-helper: T-citotóxicos (CD4+:CD8+; $P < 0,05$). No protocolo experimental, estimulou-se a resposta imunológica dos animais por meio da vacinação, que representa um estímulo que não compromete a saúde e bem-estar dos animais. A vacina anti-leishmania foi aplicada após 70 dias do início do consumo das rações. Esta vacina apresenta antígeno do tipo FML (fucose-manose-ligante), antígeno extraído das leishmanias do complexo *L. donovani* (*L. donovani*/*L. infantum*/*L. chagasi*), com o poder imunogênico amplificado pelo adjuvante saponina. Assim, no momento inicial (dia 0) o sistema imunológico dos animais não estava desafiado e todos estavam sob efeito da dieta de adaptação, no dia 70 os grupos estavam recebendo seus respectivos tratamentos, porém o sistema imunológico ainda não estava passando por qualquer desafio e no momento final (dia 98) os animais haviam sido vacinados há 28 dias, estando com seu sistema imunológico estimulado.

Existem dois tipos principais de resposta imunológica, que são a resposta inata e a adaptativa (Borchers et al., 2008). A resposta de células T e B verificadas neste estudo representam a resposta adaptativa e são altamente específicas a antígenos particulares. A principal função das células B (CD21+) é produzir anticorpos, os quais irão neutralizar antígenos e destruir patógenos. Existem 5 maiores classes de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. As células B em repouso expressam principalmente IgM e IgD em sua superfície e quando ativadas, iniciam a secreção de IgM. As células T são classificadas como helper e citotóxicas. As células T helper apresentam como principais funções a eliminação de patógenos juntamente com os

macrófagos e ativação e manutenção das células B. Já as células T citotóxicas atuam diretamente nas células infectadas, para a eliminação de patógenos e apoptose (BORCHERS et al., 2008).

A espirulina apresenta na sua composição aproximadamente 60% de proteína, uma variedade de polissacarídeos, ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Uma das proteínas abundantes na espirulina (15-20% da matéria seca da alga) é a C-ficocianina, a qual está covalentemente ligada a outro cromóforo, a ficocianobilina e é responsável pela coloração verde-azulada da alga. A C-ficocianina e outros polissacarídeos da espirulina têm sido investigados pela sua habilidade em influenciar a resposta imunológica dos animais e seres humanos. Estudos em ratos demonstraram elevação significativa na produção de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA em resposta a ingestão da alga (HAYASHI et al., 2008). Apesar desta melhora, os resultados ainda são controversos e as doses nas quais a produção de IgM foi significativamente elevada foi a partir da inclusão de 10% de espirulina na dieta, justificando que no presente estudo a adição máxima de 3% não tenha sido efetiva. Além disso, fatores como temperatura de cultivo e concentração de sais na água influenciam diretamente a composição química da espirulina (COLLA et al., 2004), podendo alterar sua composição de antioxidantes (ESTRADA et al., 2001; MIRANDA et al., 1998) e ácidos graxos poliinsaturados (ISHIKAWA et al., 1989), os principais componentes da alga responsáveis por sua ação na resposta imunológica dos animais e seres humanos.

Outros estudos demonstraram efeitos da espirulina sobre as contagens de subpopulações linfocitárias. Azabji-Kenfack et al. (2011) compararam os efeitos da suplementação de soja ou espirulina para indivíduos aidéticos severamente desnutridos e imunossuprimidos, verificando que a espirulina, mas não a soja, foi capaz de elevar as contagens de células da subpopulação CD4, sendo estes valores elevados para mais que o dobro das contagens iniciais. Apesar disto, outros achados da literatura consultada sugerem efeito oposto desta alga sobre o sistema imunológico. Rasool & Sabina (2009) alimentaram ratos com um equivalente a uma dieta contendo de 2-4% de

Spirulina fusiformis e verificaram potente efeito imunossupressor desta cianobactéria sobre a resposta imune mediada por células e humoral.

As possíveis causas dos diferentes achados entre os estudos podem ser explicadas pelas diferentes dosagens empregadas, espécie de espirulina, condições de cultivo e, ainda, da fração desta cianobactéria empregada nos estudos, podendo esta fração empregada ser estimulante ou inibidora do sistema imunológico. Lobner et al. (2008) verificaram o efeito da Immulina, um polissacarídeo de alto peso molecular extraído da *Spirulina platensis* sobre a resposta imune adaptativa em seres humanos e verificaram efeito significativo deste polissacarídeo sobre a taxa de proliferação de células CD4⁺, além de efeitos estimulatórios sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α e efeitos inibitórios sobre citocinas inibitórias da atividade de macrófagos, como IL-10. Por outro lado, Zhang et al. (2005), extraíram a C-ficocianina da *Spirulina platensis* e avaliaram seus efeitos *in vitro* sobre o *cluster* de diferenciação de células tumorais (células Hela) e verificaram efeitos estimulatórios dose-dependentes desta proteína sobre a apoptose destas células tumorais e também inibitórios sobre taxa de multiplicação celular, evidenciando atividade anti-tumoral da C-ficocianina. Considerando que a espirulina possui componentes celulares com atividade estimulatória sobre o sistema imunológico e outras com efeitos antitumorais ou até mesmo inibitórios sobre componentes da resposta imunológica, este fato justifica os diferentes achados entre estudos.

O β -caroteno apresentou resultados benéficos na resposta imunológica de cães (Chew et al., 2000), especialmente na elevação de linfócitos CD4⁺ e IgG quando fornecido entre 20ppm e 50ppm em dietas para cães, neste estudo optou-se por incluir um tratamento contendo β -caroteno para comparar seus efeitos aos propiciados pelos tratamentos contendo espirulina, servindo assim como um controle positivo. No entanto, no presente estudo, o β -caroteno também não propiciou aumento nas contagem de subpopulações linfocitárias, semelhantemente a espirulina. Possíveis explicações para isto incluem as baixas concentrações de β -caroteno na dieta, que propiciou aproximadamente a ingestão de 20mg por animal/dia; as concentrações deste nutriente no ingrediente comercial utilizado, cuja quantificação não foi realizada com sucesso; a

qualidade da dieta basal, que favoreceu boas condições de saúde para todos os cães, inclusive os pertencentes ao grupo controle. Massimiro et al. (2003) estudaram os efeitos da adição de β -caroteno na dieta de cães jovens e idosos. Verificaram que os cães jovens apresentaram menores percentuais de células CD4+ e menores taxas de multiplicação de linfócitos B (CD21+) e T (CD5+) e que estes déficits foram reestabelecidos com a utilização de β -caroteno.

Tabela 5: Sub-populações linfocitárias CD4⁺, CD5⁺, CD8⁺, CD21⁺ e relação CD4⁺:CD8⁺ dos cães mediante consumo das dietas controle, beta-caroteno ou espirulina, nos momentos T0, T70 e T98.

Item	Espirulina			β-caroteno	Média	EPM ¹		Contrastes polinomialis		Contrastes ortogonais	
	0%	0,5%	1%			3%	Linear ⁴	Quadrática ⁵	CON vs ESP ²	CAR vs ESP ³	
LINFÓCITOS T TOTAIS (CD5+)											
Dia 0	1,16	1,04	1,13	1,24	1,15	1,14	0,06	-	-	0,652	0,859
Dia 70	1,44	0,98	1,21	1,54	0,77	1,20	0,08	0,24	0,15	0,245	0,068
Dia 98	1,11	1,13	1,10	1,35	1,23	1,19	0,06	0,74	0,50	0,821	0,770
Média	1,24	1,04	1,15	1,37	1,05			0,22	0,12		
EPM ¹	0,10	0,06	0,09	0,12	0,09						
LINFÓCITOS T HELPER (CD4+)											
Dia 0	0,59	0,53	0,61	0,68	0,61	0,60	0,04	-	-	0,683	0,982
Dia 70	0,69	0,57	0,66	0,82	0,68	0,68	0,05	0,54	0,79	0,929	0,983
Dia 98	0,55	0,61	0,62	0,73	0,63	0,63	0,04	0,72	1,00	0,263	0,820
Médias	0,61	0,57	0,63	0,74	0,64			0,95	0,62		
EPM	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06						
LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS (CD8+)											
Dia 0	0,28	0,27	0,27	0,28	0,27	0,28 ^B	0,03	-	-	0,876	0,972
Dia 70	0,36	0,31	0,33	0,42	0,33	0,35 ^A	0,03	0,46	0,30	0,622	0,845
Dia 98	0,21	0,25	0,23	0,24	0,24	0,23 ^C	0,02	0,68	0,74	0,706	0,841
Médias	0,28	0,28	0,28	0,31	0,28			0,76	0,55		
EPM	0,03	0,06	0,03	0,07	0,04						
LINFÓCITOS B (CD21+)											
Dia 0	0,27	0,27	0,28	0,29	0,27	0,28 ^B	0,02	-	-	0,151	0,439
Dia 70	0,40	0,35	0,39	0,44	0,22	0,37 ^A	0,03	0,98	0,72	0,318	0,006
Dia 98	0,32	0,34	0,34	0,37	0,34	0,34 ^A	0,02	0,88	0,96	0,244	0,697
Médias	0,33	0,32	0,34	0,36	0,28			0,95	0,79		
EPM	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03						
RELAÇÃO LINFÓCITOS T HELPER : T CITOTÓXICOS (CD4+:CD8+)											
Dia 0	2,58	2,55	2,65	2,63	2,62	2,60 ^B	0,18	-	-	0,792	0,887
Dia 70	1,99	1,85	2,04	2,03	2,08	2,05 ^C	0,18	0,85	0,91	0,718	0,739
Dia 98	2,75	3,66	2,87	3,23	2,90	3,18 ^A	0,20	0,57	0,65	0,273	0,776
Médias	2,44	2,69	2,52	2,63	2,53			0,57	0,67		
EPM	0,23	0,37	0,27	0,19	0,35						

- 1 – EPM = erro padrão da média, n=7 repetições por dieta;
 - 2 – Dieta sem antioxidantes (Controle) versus dieta com espirulina (dietas com 0,5%; 1% e 3% de espirulina);
 - 3 - Dieta beta caroteno versus ração com espirulina (dietas com 0,5%; 1%; 3% de espirulina);
 - 4 - Efeito linear (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;
 - 5 – Efeito quadrático (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;
- a b – médias dos tratamentos nas linhas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);
A¹, B¹, C – médias nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Comparação válida para uma mesma variável.

Quantificação de anticorpos anti-leishmania do isotipo IgG

Considerando a ampla variabilidade individual dos resultados obtidos da quantificação de IgG anti-leishmania, para se reduzir o coeficiente de variação os dados foram transformados para raiz quadrada da concentração de IgG obtida. Esta transformação permitiu que os coeficientes de variação dos tratamentos fossem inferiores a 40%, valor este ainda elevado, porém, aceitável (Tabela 6).

Tabela 6: Anticorpos anti-leishmania do isotipo IgG dos cães, expressa como relação amostra/positivo (índice A/P), mediante consumo das rações controle, β -caroteno ou conteúdo espirulina, nos momentos T0, T70, T86 e T98.

Item	Espirulina				Média	EPM ¹	Contrastes polinômias		Contrastes ortogonais	
	0%	0,5%	1%	3%			β -caroteno	Linear ⁴	Quadrático ⁵	CON vs ESP ²
IMUNOGLOBULINA G ANTI-LEISHMANIA (índice A/P)										
Dia 0	-0,041	0,136	0,084	0,080	-0,127	0,026 ^B	0,003		0,03	0,001
Dia 70	-0,071	0,081	0,058	0,043	-0,136	0,006 ^B	0,007	0,24	0,662	0,913
Dia 86	0,354	0,600	0,449	0,424	0,348	0,474 ^A	0,11	0,58	0,930	0,923
Dia 98	0,233	0,600	0,370	0,401	0,475	0,426 ^A	0,09	0,46	0,723	0,486
Médias	0,119	0,357	0,240	0,237	0,140			0,31		
EPM ¹	0,08	0,11	0,06	0,08	0,12					

¹ – EPM = erro padrão da média, n=7 repetições por dieta;

² – Dieta sem antioxidantes (Controle) versus dieta com espirulina (dietas com 0,5%; 1% e 3% de espirulina);

³ – Dieta beta caroteno versus ração com espirulina (dietas com 0,5%; 1%; 3% de espirulina);

⁴ – Efeito linear (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

⁵ – Efeito quadrático (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

a, b – médias dos tratamentos nas linhas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05);

A, B, C – médias nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). Comparação válida para uma mesma variável.

Não foi verificado efeito de tratamento da resposta vacinal ($P > 0,05$) pelo protocolo empregado. Da mesma forma, não houve relação linear ou quadrática na resposta dos animais a inclusão de espirulina nas dietas. Por outro lado, o protocolo de vacinação empregado e o método de ELISA utilizado para a quantificação desta imunoglobulina foram considerados adequados, uma vez que a vacinação no dia 70 propiciou elevação significativa nos níveis séricos de IgG anti-leishmania ($P < 0,05$) nos dias 86 e 98 do experimento (Tabela 6).

Existem alguns estudos que investigaram os efeitos da espirulina sobre a produção de anticorpos pelos linfócitos B em resposta a imunização (resposta imune primária). Neste estudo, ratos alimentados com dietas contendo 10% a 20% de espirulina apresentaram elevação significativa na produção de IgM, mas não na produção de IgG em resposta ao desafio antigênico (Hayashi et al., 1994). Por outro lado, Qureshi et al. (1996) utilizaram 1% de espirulina em dietas para frangos e observaram elevação significativa na produção de IgG antígeno-específica. No presente estudo, mesmo empregada na concentração de 3%, não foi possível verificar maior produção de IgG nos animais permanecendo em aberto se esta influência à espécie canina ou se a questão se remete às condições de produção da alga.

Ao observar a Tabela 6 é possível verificar uma elevada diferença numérica na resposta vacinal entre o grupo controle e os demais tratamentos. No entanto, considerando que estas diferenças já existiam no momento basal, a análise de Covariância empregada foi importante para que não fossem tomadas decisões errôneas sobre os tratamentos experimentais. Na figura 6 encontra-se a representação gráfica da resposta vacinal dos animais.

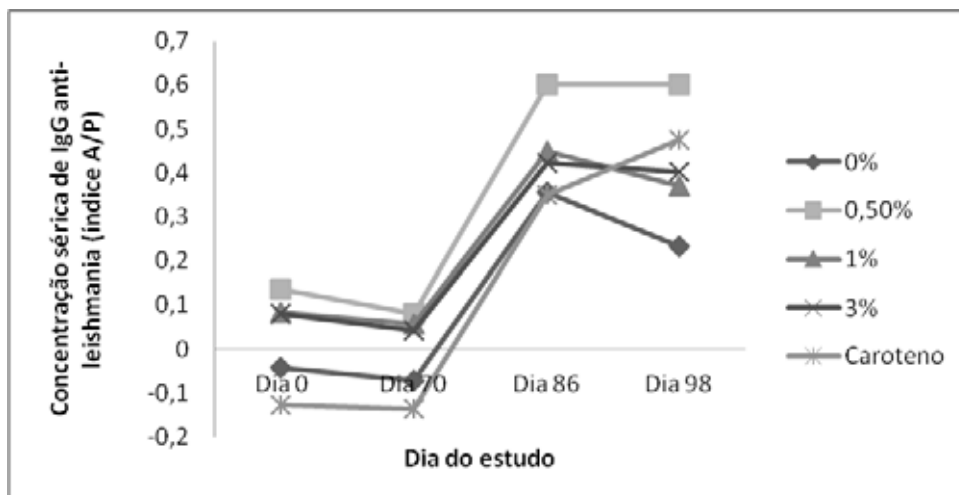


Figura 6: Concentrações de imunoglobulina G (IgG), expresso como índice amostra:padrão positivo (A/P) nos dias 0, 70, 86 e 98, mediante consumo das rações experimentais 0%, 0,5%, 1% e 3% de espirulina e β -caroteno.

Teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH)

Os resultados deste teste encontram-se na Tabela 7. Os estímulos vacinais empregados foram eficientes em promover a resposta cutânea dos animais. No entanto, os animais responderam de maneira diferente a ambas as vacinas empregadas (anti-leishmania ou anti-rábica).

Tabela 7: Espessura da pele (mm) dos cães em resposta ao teste de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH), mediante consumo das dietas controle, β -caroteno ou contendo espirulina, ao final do experimento (dia 98).

Item	Espirulina				Média	EPM ¹	Regressão		Contrastes ortogonais	
	0%	0,5%	1%	3%			β -caroteno	Linear ⁴	Quadrática ⁵	CON vs ESP ²
ESPESURA DA PELE EM RESPOSTA A VACINA ANTI-LEISHMANIA (mm)										
0 hora	2,64	2,62	2,60	2,65	2,65	0,07			0,52	0,48
24 horas	3,50	3,45	3,74	3,56	3,52	0,09	0,50	0,54	0,92	0,82
48 horas	3,13	3,11	3,26	3,37	3,14	0,09	0,81	0,99	0,97	0,96
72 horas	2,75	2,94	3,07	3,05	2,75	0,08	0,19	0,26	0,46	0,50
Médias	3,01	3,03	3,17	3,16	3,02		0,18	0,30		
EPM ¹	0,11	0,12	0,11	0,14	0,09					
ESPESURA DA PELE EM RESPOSTA A VACINA ANTI-RÁBICA (mm)										
0 hora	2,79	2,80	2,80	2,80	2,80	0,10			0,58	0,59
24 horas	3,62	3,52	3,51	3,46	3,78	0,13	0,73	0,74	0,92	0,27
48 horas	3,71	3,79	3,70	3,98	3,84	0,13	0,91	0,70	0,50	0,65
72 horas	3,99	3,98	4,14	4,40	4,05	0,13	0,82	0,89	0,41	0,95
Médias	3,53	3,52	3,54	3,66	3,62		0,91	0,62		
EPM	0,13	0,18	0,15	0,19	0,19					

¹ – EPM = erro padrão da média, n=7 repetições por dieta;

² – Dieta sem antioxidantes (Controle) versus dieta com espirulina (dietas com 0,5%; 1% e 3% de espirulina);

³ – Dieta beta caroteno versus ração com espirulina (dietas com 0,5%; 1%, 3% de espirulina);

⁴ – Efeito linear (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

⁵ – Efeito quadrático (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

a, b – médias dos tratamentos nas linhas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05);

A, B, C – médias nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). Comparação válida para uma mesma variável.

Pode-se verificar que a vacina anti-leishmania propiciou resposta máxima de aumento de volume cutâneo 24 horas após a inoculação, com redução da reação as 48 e 72 horas, retornando praticamente aos valores basais. Esta resposta foi semelhante à descrita por Kim et al. (2000) em cães, utilizando vacina polivalente contendo frações virais. Por outro lado, a vacinação antirrábica estimulou resposta cutânea contínua desde o momento da aplicação até 72 horas após sua aplicação, com aumento crescente de espessura da pele ao longo do período de observação. Tais diferenças possivelmente ocorreram devido à natureza das vacinas empregadas, uma vez que a vacina anti-leishmania é composta por uma fração específica do microrganismo, a FML (fucose-manose-ligante), o que favorece resposta imunológica específica no hospedeiro. Por outro lado, na vacina antirrábica, o estímulo antigênico empregado é o próprio vírus da raiva atenuado, o que estimula toda a cascata de resposta imunológica do hospedeiro a uma infecção viral. Alguns animais apresentaram fibrose no local da aplicação da vacina antirrábica, que permaneceu ainda por meses após o estudo, dificultando a interpretação destes resultados e tornando não recomendável a sua utilização.

O DTH é um teste comumente utilizado para a verificação da imunidade mediada por células (KIM et al., 2000). A reação cutânea de hipersensibilidade tardia é uma resposta inflamatória caracterizada por um infiltrado de células mononucleares, constituídos especialmente por linfócitos T de memória que, em presença de antígenos específicos, liberam citocinas recrutadoras de macrófagos (DE CAMPOS, 2005). A resposta medida consiste em uma resposta inflamatória local mediada por linfócitos T helper que penetram no sítio da injeção do antígeno, reconhecem os complexos de peptídeos e o Complexo de Histocompatibilidade Principal da classe-II (MHC-II) nas células apresentadoras de antígeno e liberam mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular local, e propiciam a formação de edema, que é medido com o auxílio de um cutímetro ou micrômetro (HUGHES, 1999).

Verificou-se diferença na espessura da pele em todos os momentos, para ambas as vacinas. No entanto, não foi verificado efeito do ingrediente estudado sobre este parâmetro, conforme pode ser constatado na Tabela 7. Nas figuras 7 e 8 encontram-se os valores de elevação percentual da espessura da pele em resposta

a vacina anti-leishmania e antirrábica, respectivamente. Na vacina anti-leishmania, pode-se verificar o aumento numérico nas respostas dos grupos que receberam 1% e 3% de espirulina, respectivamente, porém, estes aumentos não foram significativos ($P > 0,05$).

Outros estudos com antioxidantes em cães e gatos observaram aumento significativo na resposta ao DTH nos animais tratados com antioxidantes (KIM et al., 2000; KIM et al., 2001; CHEW et al., 2000; HAYEK et al., 2002). Chew et al. (2000) verificaram elevação significativa da resposta intradérmica a uma vacina polivalente, em cães beagle alimentados com 20 e 50mg de β -caroteno diariamente. No presente estudo, apesar dos cães alimentados com 1% e 3% de espirulina terem apresentado elevação muito semelhante numericamente à verificada por Chew et al. (2000), esta diferença não foi significativa. O grupo que recebeu β -caroteno apresentou resposta muito semelhante ao grupo controle. Uma possível explicação para a discrepância de achados entre o presente estudo e o de Chew et al. (2000) são as diferenças nos estímulos antigênicos empregados, a dieta controle do presente estudo, que foi considerada de elevado valor nutricional, ou mesmo diferenças na abordagem estatística realizada pelos autores supracitados.

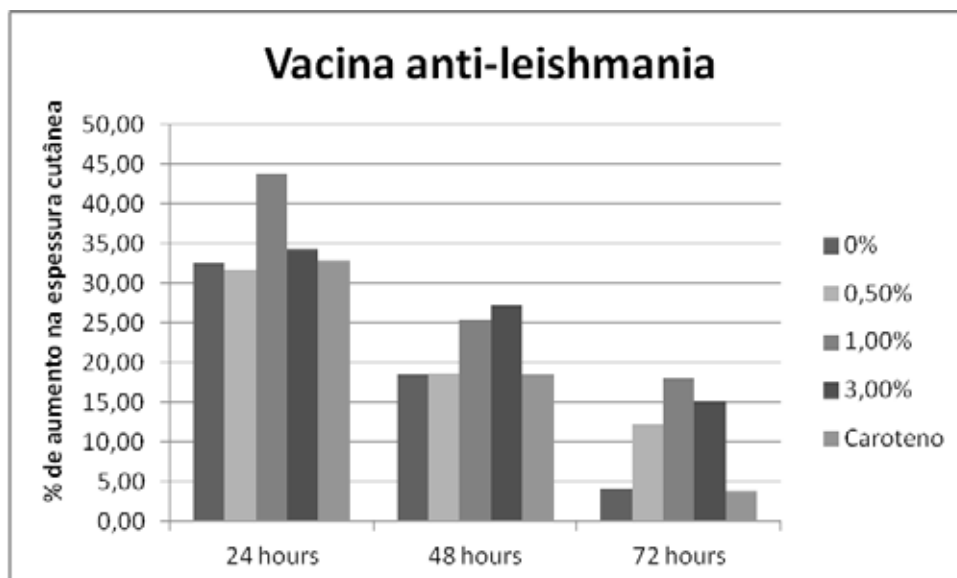


Figura 7: Aumento percentual da espessura da pele dos cães às 24h, 48h e 72h de inoculação intradérmica da vacina, em relação à aferição basal, mediante consumo das rações controle (0%), β -caroteno ou espirulina (0,50%; 1% e 3%), aos 98 dias de experimento.

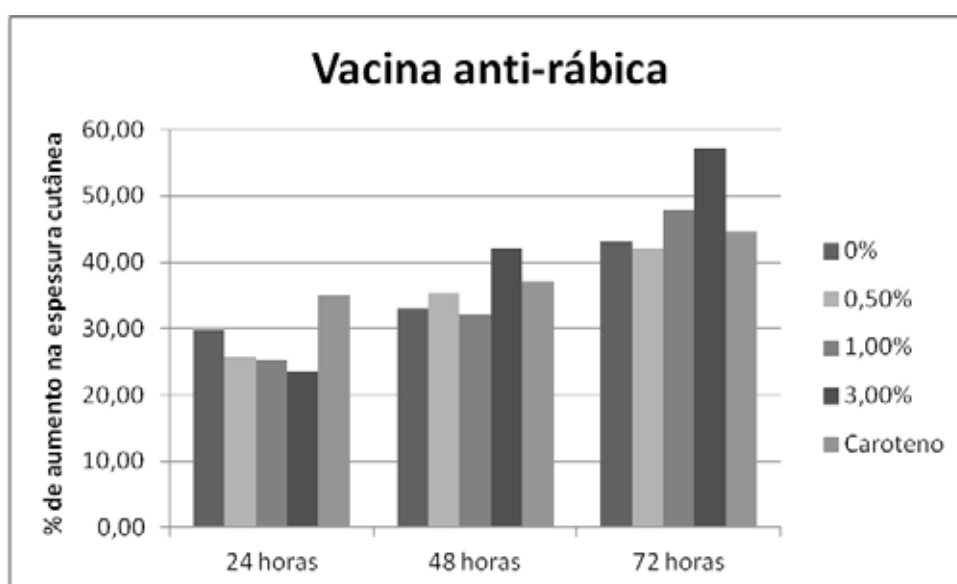


Figura 8: Comparação dos tratamentos controle (0%), β -caroteno ou contendo espirulina (0,50%; 1% e 3%), aos 98 dias de experimento, verificando o aumento percentual da espessura da pele dos cães às 24h, 48h e 72h de inoculação intradérmica da vacina anti-rábica, em relação à aferição basal.

Produção de citocinas *ex vivo*

Não houve efeito de tratamento para as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-4 ($P > 0,05$). Estes resultados encontram-se na Tabela 8.

Mao et al. (2005) encontraram que a administração de 2 gramas de espirulina diariamente durante 12 semanas em 36 pacientes humanos alérgicos reduziu a produção de IL-4 em células mononucleares em sangue periférico sem redução concomitante na produção de IFN- γ , indicando que a inibição da diferenciação de células Th2 ocorre principalmente pela redução na produção de IL-4. As ações biológicas da IL-4 incluem principalmente, a estimulação da IgE e reações mediadas por mastócitos/eosinófilos, sendo a sua produção importante para o desenvolvimento de alergias. E ainda promove o desenvolvimento de células Th2 em células T auxiliares (ABBAS et al., 2005). Além de apresentar um papel central na produção de IgE pelos linfócitos B, a IL-4 ativa vários outros tipos celulares envolvidos em processos alérgicos (MAO et al., 2000).

A produção de citocinas depende de uma complexa rede de comunicação celular para permitir que o hospedeiro mantenha-se protegido contra os desafios ambientais ou endógenos. A ativação do sistema imunológico e inflamação estão profundamente envolvidas na patogênese de muitas doenças (SCHROECKSNADEL et al., 2007) e os nutrientes ingeridos na alimentação podem modular de maneira efetiva a resposta imunológica, tornando-a mais pró ou anti-inflamatória (CHEW et al., 2002).

O interferon gamma (IFN- γ) é uma glicoproteína secretada pelos linfócitos T pró-inflamatórios e pelas células NK. É o principal fator ativador de macrófagos, nos quais estimula a produção de TNF- α , aumenta a sua capacidade lítica e induz a expressão de moléculas de histocompatibilidade de MHC I e II, aumentando a exposição antigênica e a ativação de linfócitos CD4 e CD8. (TIZARD et al., 2009)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma proteína produzida por macrófagos, mastócitos, linfócitos T, células endoteliais, linfócitos B e fibroblastos. Pode ser encontrado na forma livre ou aderido à membrana. No momento em que os macrófagos e mastócitos detectam os patógenos invasores, liberam os TNF- α que estão associados às suas membranas que passam à forma solúvel, e estimula a liberação de quimiocinas e citocinas e promove a aderência, migração, atração e

ativação dos leucócitos ao foco da invasão. Atua também sobre os neutrófilos, aumentando sua capacidade de destruir os agentes invasores, atraindo os neutrófilos até as zonas de lesão tissular e aumentando sua capacidade de aderência ao endotélio vascular. O TNF- α pode destruir algumas células tumorais e células infectadas por vírus mediante a ativação em cascata e indução da apoptose (TIZARD et al., 2009). O TNF- α e o IFN- γ apresentam papel fundamental na inflamação. Compostos antioxidantes com atividade anti-inflamatória, de uma maneira geral promovem supressão na produção de TNF- α e IFN- γ em estudos *ex vivo* (SCHROECKSNADEL et al., 2007). No presente estudo, no entanto, as produções de TNF- α , IL-4 e IFN- γ foram semelhantes entre os grupos controle e tratados com antioxidantes espirulina e β -caroteno ($P>0,05$).

Tabela 8: Produção de citocinas *ex vivo* em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico de cães, mediante consumo das rações controle, β -caroteno ou espirulina, nos momentos T0, T70, T86 e T98.

Item	Espirulina			Caroteno	Média EPM ¹	Contrastes polinomiais		Contrastes ortogonais	
	0%	0,5%	1%			3%	Linear ⁴	Quadrático ⁵	CON vs ESP ²
IL-4 (pg/mL)									
Dia 0	270,6	408,3	307,2	357,3	396,9	34,81	-	0,012	0,890
Dia 70	447,6	176,4	489,7	145,9	200,1	284,7 ^B	0,96	0,80	0,665
Dia 98	455,7	228,2	483,2	261,2	362,7	350,3 ^A	0,87	0,81	0,983
Médias	391,3	270,9	426,7	254,8	319,9		0,88	0,72	
EPM ¹	107,9	50,55	92,92	138,56	75,88				
IFN- γ (pg/mL)									
Dia 0	14,0	14,3	22,1	16,5	12,7	16,3 ^{AB}		0,583	0,335
Dia 70	19,2	8,3	0,4	11,7	8,2	10,1 ^B	0,15	0,16	0,180
Dia 98	28,1	10,8	11,8	24,9	65,2	33,3 ^A	0,50	0,45	0,946
Médias	20,4	11,1	11,4	17,7	28,7		0,19	0,17	
EPM	6,08	2,55	5,95	7,49	12,38				
IL-10 (pg/mL)									
Dia 0	123,8	124,9	122,6	120,7	128,8	123,7 ^B		0,339	0,735
Dia 70	713,4	412,6	358,1	318,8	488,1	454,7 ^A	0,15	0,25	0,267
Dia 98	89,5	57,0	47,8	12,7	63,6	45,2 ^C	0,53	0,74	0,911
Médias	308,9 ^a	198,2 ^{ab}	176,2 ^b	150,7 ^b	226,9 ^{ab}		0,14	0,23	
EPM	119,05	70,41	55,81	45,80	85,45				
TNF- α (pg/mL)									
Dia 0	224,8	201,2	201,6	203,2	213,4	207,1 ^A		0,362	0,455
Dia 70	291,4	161,4	320,6	83,2	331,2	216,3 ^A	0,78	0,62	0,506
Dia 98	37,1	143,3	92,1	55,6	121,4	76,1 ^B	0,41	0,33	0,733
Médias	159,7	168,7	204,8	113,9	222,0		0,64	0,47	
EPM	121,39	49,35	60,49	29,01	103,72				

¹ - EPM = erro padrão da média, n=7 repetições por dieta;

² - Dieta sem antioxidantes (Controle) versus dieta com espirulina (dietas com 0,5%; 1% e 3% de espirulina);

³ - Dieta beta caroteno versus ração com espirulina (dietas com 0,5%; 1%; 3% de espirulina);

⁴ - Efeito linear (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

⁵ - Efeito quadrático (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

^{a, b} - médias dos tratamentos nas linhas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05);

A, B, C - médias nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). Comparação válida para uma mesma variável.

Por outro lado, a produção de IL-10 foi significativamente reduzida nos grupos tratados com espirulina nas concentrações de 1 e 3% ($p < 0,05$). No presente estudo, a correlação entre a produção *ex vivo* de IL-10 e os valores séricos de TBARS também foi positiva e significativa ($r = 0,64$; $P < 0,001$).

A IL-10 é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativados e está envolvida no controle das reações da imunidade natural e da imunidade mediada por células. É conhecida como um inibidor da produção de IFN- γ (ABBAS et al., 2005). Esta citocina foi descoberta inicialmente, como um fator de inibição pela produção de Th-1. Aparece como um fator crucial da tolerância periferal e o principal supressor da resposta imune e da inflamação. A função inibitória da IL-10 é mediada pela indução das células T regulatórias (FICKENSCHER et al., 2002). A IL-10 também regula a produção de outras citocinas, como IL-1, IL6, IL-8 e TNF- α , as quais são consideradas citocinas pró-inflamatórias em processos agudos e crônicos (MALEFYT et al., 1991).

A IL-10 apresenta um papel importante na regulação da expressão de outra citocina ativadora de respostas Th1, a IL-12, sendo esta produção importante para regular a intensidade da resposta inflamatória. Uyemura et al. (1996) verificaram aumento nas concentrações de IL-12 em placas ateroscleróticas de LDL-oxidada e verificaram, concomitantemente, aumento nas concentrações de IL-10 nestas placas. Este achado sugeriu um efeito modulador da IL-10 frente a este processo oxidativo, comprovado diante da administração exógena de IL-10, o qual induziu a redução de IL-12 nestas placas ateroscleróticas. A indução da produção de IL-10 nestes casos é importante para reduzir a resposta inflamatória local, a qual aumenta os danos oxidativos locais, pela geração de espécies reativas de oxigênio (BOGDAN et al., 1991). Por este motivo a IL-10 é conhecida pelo seu papel na regulação da formação de espécies reativas de oxigênio no organismo, podendo ser mais expressa em situações de maior stress oxidativo (STENVINKEL et al., 2005). No entanto, existem situações de maior stress oxidativo nas quais a expressão desta citocina está mais baixa, conforme verificado por Stenvinkel et al. (2005) em pacientes com uremia elevada por doença renal, nos quais estavam elevadas as concentrações de IL-6 e TNF- α , sendo este último considerado inibidor da expressão de IL-10.

Neste estudo a produção de IL-10 foi significativamente reduzida nos grupos tratados com espirulina nas concentrações de 1 e 3%, além do contraste ortogonal Controle vs. Espirulina após a vacinação, no dia 98, ter demonstrado efeito significativo na redução da produção desta citocina ($P > 0,05$). O status de oxidação-redução (REDOX) do organismo constitui um potencial mecanismo ativador da inflamação em condições de *stress* oxidativo. Recentemente a IL-10 tem sido implicada como uma citocina anti-inflamatória e com propriedades indiretas sobre os sistemas antioxidantes orgânicos, sendo as vias de oxidação-redução correlacionadas positiva ou negativamente com a produção de IL-10 (HADDAD & &, 2002). Drabko et al. (2008) verificaram correlação positiva entre os níveis séricos de Malondialdeído e IL-10 em pacientes humanos com leucemia. Este fato possivelmente se deve à atividade imunomoduladora desta citocina, a qual é mais exigida em situações de *stress* oxidativo. No presente estudo, a correlação entre a produção *ex vivo* de IL-10 e os valores séricos de TBARS também foi positiva e significativa ($r=0,64$; $P < 0,001$), explicando a redução da concentração desta citocina.

Dhingra et al. (2009) verificaram que a produção aumentada de TNF- α em ratos promove aumento nas lesões em cardiomiócitos pelo aumento na produção de radicais livres e a produção de IL-10 antagoniza os efeitos nocivos do TNF- α , demonstrando desta forma as propriedades anti-inflamatórias e mecanismos de atuação antioxidante desta citocina, graças a inibição da fosforilação da enzima κ B-kinase (IKK), a qual está envolvida na estimulação da resposta efetora Th1.

Apesar da maior produção de IL-10 apresentar papel crucial no controle das produções de TNF- α e IFN- γ (NANDI et al., 2010), modulando a resposta inflamatória exacerbada, a utilização de antioxidantes parece reduzir a necessidade orgânica da produção desta citocina. Barker et al. (2009) suplementaram vitaminas C e E em pacientes humanos submetidos a cirurgia reconstrutiva do ligamento cruzado anterior e verificaram que o grupo controle não suplementado apresentou elevação significativa nas concentrações séricas de IL-10 nas primeiras horas após a cirurgia, enquanto estas concentrações foram menores nos grupos suplementados com antioxidantes. Possíveis explicações encontradas pelos pesquisadores foram que a utilização de substâncias com propriedades antioxidantes, por si só, promove melhor regulação do status inflamatório do organismo, podendo ser verificado nestes

casos uma redução na produção de IL-10. No presente estudo, no entanto, o tratamento β -caroteno e espirulina 0,5% não resultaram em redução da oxidação orgânica e também não se associaram à redução da produção de IL-10.

A produção de todas as citocinas teve efeito significativo de período ($P < 0,05$). Em relação ao sistema imune, o experimento pode ser dividido em dois momentos: entre 0 e 70 dias se caracteriza pela ingestão das dietas teste mas sem estimulação imune; dos 70 aos 98 dias pode-se considerar o consumo das dietas após estimulação vacinal dos animais, retratando o dia 98 o perfil das células T e B ativadas 28 dias após a vacinação. Considera-se a vacinação um fator de imunodepressão aos animais. No entanto, conforme verificado por Strasser et al. (2003), cães apresentaram redução na capacidade mitótica de células T e neutrófilos após a vacinação, acompanhada simultaneamente por elevação nas concentrações de IgG, o que sugere, ao contrário de uma imunodepressão, alteração do balanço entre as respostas mediada por células e humoral, com redirecionamento Th1 da resposta imune. Este fato pôde ser verificado no presente experimento, uma vez que a produção de IgG nos dias 86 e 98 (pós-vacinais) foram significativamente elevadas sem a concomitante elevação nas contagens de linfócitos T e B entre os dias 70 (antes da vacinação) e 98 (pós-vacinal).

Mensuração do status oxidativo sérico

Verificou-se tanto efeito de tratamento como de período nas análises de TBARS e de Capacidade Antioxidante Total (TAC) sérica dos animais ($p < 0,05$). Estes dados encontram-se na Tabela 9. Houve redução significativa nas concentrações de TBARS e elevação concomitante na TAC dos animais nos períodos 70 e 98 em relação ao momento inicial ($p < 0,05$), independente de tratamento. Esta melhora no *status* oxidativo em todos os animais, independente do tratamento recebido se deve principalmente às diferenças do valor nutricional entre a dieta de adaptação, fornecida anteriormente ao experimento, e das dietas experimentais. No entanto, não é possível detectar qual o nutriente responsável por estas modificações no *status* oxidativo dos animais, uma vez que as dietas

experimentais e a dieta de adaptação eram muito diferentes em níveis nutricionais, qualidade dos ingredientes e processamento empregado.

Tabela 9: Capacidade antioxidante total, concentração sérica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS-amostra), concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na oxidação induzida in vitro (TBARS-oxid) e diferença entre TBARS-oxid/TBARS-amostra de cães, mediante consumo das rações controle, beta-caroteno ou contendo espirulina, nos momentos inicial, 70 e 98 dias

Item	Espirulina			Caroteno	Média	EPM ¹	Contrastes polinômias		Contrastes ortogonais	
	0%	0,5%	1%				3%	Linear ⁴	Quadrático ⁵	CON vs ESP ²
	TBARS-amostra (λ nm)									
Dia 0	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032 ^A	0,0007			0,193	0,277
Dia 70	0,030	0,026	0,022	0,024	0,030 ^B	0,001	0,04	0,07	0,292	0,168
Dia 98	0,027	0,027	0,021	0,025	0,026 ^B	0,0008	0,09	0,12	0,984	0,670
Médias	0,030 ^a	0,028 ^{ab}	0,025 ^b	0,027 ^{ab}	0,030 ^a		0,005	0,01		
EPM ¹	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001					
	TBARS-oxid (λ nm)									
Dia 0	0,039 ^{abA}	0,039 ^{abA}	0,040 ^{aA}	0,039 ^{aA}	0,039 ^{aA}	0,0008			0,198	0,033
Dia 70	0,041 ^{abA}	0,039 ^{abA}	0,033 ^{abA}	0,034 ^{abA}	0,037 ^{aA}	0,001	0,09	0,17	0,219	0,360
Dia 98	0,036 ^{abA}	0,036 ^{abA}	0,028 ^{abB}	0,031 ^{abA}	0,039 ^{aA}	0,0009	0,06	0,10	0,328	0,05
Médias	0,039	0,038	0,034	0,035	0,040		0,02	0,01		
EPM	0,001	0,0011	0,001	0,005	0,001					
	TBARS-DIFF (λ nm)									
Dia 0	0,007 ^{abA}	0,007 ^{abA}	0,008 ^{abA}	0,008 ^{abA}	0,007 ^{abA}	0,0005			0,948	0,111
Dia 70	0,012 ^{abA}	0,011 ^{aA}	0,010 ^{aA}	0,010 ^{abA}	0,011 ^{abA}	0,0005	0,36	0,40	0,415	0,616
Dia 98	0,009 ^{abA}	0,008 ^{abA}	0,006 ^{abA}	0,006 ^{abA}	0,012 ^{abA}	0,0005	0,02	0,07	0,014	0,003
Médias	0,010	0,009	0,008	0,008	0,010		0,03	0,07		
EPM	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001					
	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (Eq de TROLOX nmol/mL)									
Dia 0	0,227	0,230	0,229	0,233	0,229	0,01			0,884	0,788
Dia 70	0,328	0,344	0,336	0,344	0,319	0,01	0,76	0,82	0,513	0,472
Dia 98	0,276	0,340	0,331	0,328	0,319	0,01	0,10	0,14	0,105	0,633
Médias	0,280	0,306	0,299	0,303	0,290		0,17	0,22		
EPM	0,066	0,092	0,087	0,084	0,083					

¹ – EPM = erro padrão da média, n=7 repetições por dieta;

² – Dieta sem antioxidantes (Controle) versus dieta com espirulina (dietas com 0,5%; 1% e 3% de espirulina);

³ – Dieta beta caroteno versus ração com espirulina (dietas com 0,5%; 1%; 3% de espirulina);

⁴ - Efeito linear (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

⁵ – Efeito quadrático (probabilidade) dos níveis de espirulina 0; 0,5%; 1,0% e 3,0%;

^a, ^b – médias dos tratamentos nas linhas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05);

^A, ^B, ^C – médias nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). Comparação válida para uma mesma variável.

Houve efeito significativo de tratamento para as variáveis TBARS-amostra, TBARS-oxid e TBARS-diff ($P < 0,001$) pela análise de Covariância, conforme verificado na Tabela 9, sendo os menores valores encontrados para o tratamento que recebeu 1% de espirulina. A inclusão de espirulina nas dietas propiciou redução nas concentrações de TBARS, conforme verificado pela relação linear inversa entre a inclusão do ingrediente e os níveis de TBARS. Com relação ao TAC, não foi verificado efeito de tratamento nos períodos estudados, embora possa ser verificada uma diferença numérica entre os grupos que receberam, espirulina e os grupos controle e β -caroteno, considerando significativos valores de probabilidade de até 10%, no período 98 dias verificou-se relação linear para a inclusão de espirulina nesta variável, ocorrendo aumento na Capacidade antioxidante sérica dos animais com a inclusão da alga. O β -caroteno, nas concentrações empregadas não demonstrou melhora na resposta antioxidante dos animais por nenhum dos métodos utilizados.

Esperava-se com este protocolo experimental, considerando-se os dados de literatura disponíveis, que o grupo β -caroteno apresentasse melhora no *status* oxidativo em relação ao grupo Controle, o que não foi observado. Possivelmente as concentrações de β -caroteno empregadas não foram suficientes para promover esta resposta. Chew et al. (2000) observaram aumento nas concentrações plasmáticas de beta-caroteno e na resposta imunológica de cães Beagle que ingeriram 20-100mg de beta-caroteno por dia, porém, estes autores não mensuraram a resposta antioxidante dos animais. No presente estudo, adicionou-se 121ppm de β -caroteno às rações, o que propiciou a ingestão de aproximadamente 25mg/animal/dia de β -caroteno. Parece que estas concentrações não foram suficientes para promover melhora no *status* oxidativo ou resposta imunológica *in vivo* ou *ex vivo*. Em humanos, Erhardt et al. (2002) suplementaram vitamina E e β -caroteno e verificaram redução significativa nas concentrações salivares de TBARS.

A melhora na capacidade antioxidante no plasma é menos sensível do que em outros fluidos corporais, uma vez que grande número de substâncias com atividade antioxidante é encontrado no plasma (ERHARDT et al, 2002). Proteínas e ácido úrico

apresentam atividade antioxidante e podem mascarar os benefícios da suplementação antioxidante, quando esta é verificada no plasma.

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é extensivamente empregada para investigar a peroxidação lipídica, inclusive em cães (VAJDOVICH et al., 1997). A lipoperoxidação é um fenômeno bioquímico que ocorre em diferentes processos fisiológicos (fagocitose, respiração mitocondrial, ativação plaquetária, etc.) e fisiopatológicos (isquemia, hipóxia, processos degenerativos, etc.). O malondialdeído é um produto do catabolismo (hidrólise) dos lipoperóxidos resultantes dos processos acima citados e que reage com o ácido tiobarbitúrico para a formação de composto avermelhado, quantificado espectrofotometricamente pelo método do TBARS (RICHARD et al., 1992).

As propriedades antioxidantes da espirulina e dos seus extratos têm atraído a atenção de pesquisadores. Manoj et al. (1992) verificaram que o extrato alcoólico da espirulina inibiu mais significativamente (65%) a peroxidação lipídica do que outras substâncias antioxidantes como o alfa-tocoferol (35%), BHA (45%) e β -caroteno (48%). Acredita-se que a C-ficocianina seja o principal componente que confere as propriedades antioxidantes da espirulina (CHIPRA et al., 2008). Apesar disto, a maior parte dos estudos que avaliaram a capacidade antioxidante da espirulina foi realizada *in vitro*, sendo importante a realização de estudos *in vivo* para melhor verificação da sua eficácia como antioxidante. No presente estudo foi possível verificar a melhora no *status* oxidativo dos cães que receberam espirulina, visto pelas análises de TBARS. Os resultados de TAC apresentaram uma tendência ($p=0,1$) a melhora da capacidade antioxidante total. Considerando que todos os cães estavam saudáveis e que a dieta controle foi considerada de elevado valor nutricional, os benefícios observados na resposta antioxidante dos animais frente à ingestão de espirulina merecem atenção especial em futuros estudos *in vivo* e *in vitro* com esta alga.

Na Figura 9 encontram-se as variações percentuais nas concentrações de TBARS e TAC séricas de todos os grupos em relação ao grupo controle, aqui considerado como 100%. Pode-se verificar uma considerável redução nas concentrações de TBARS e concomitante elevação na capacidade antioxidante nos

animais que receberam espirulina, especialmente nas concentrações de 1,0% e 3,0%, embora não tenha sido realizada análise estatística destes dados e estes sejam apenas ilustrativos.

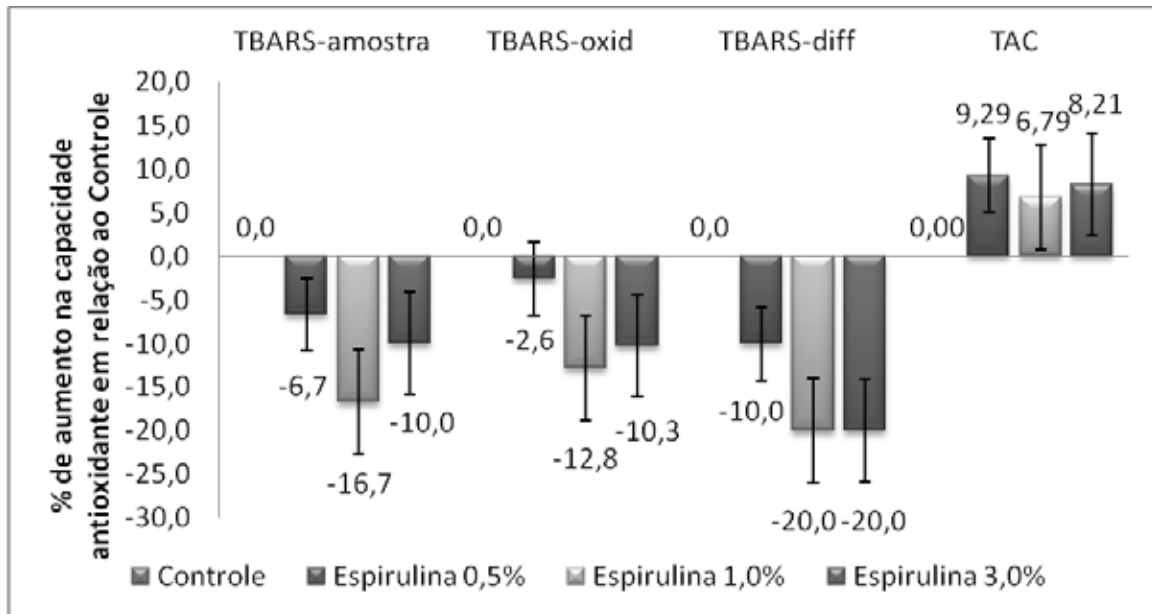


Figura 9: Variação percentual nas concentrações de TBARS sérica (TBARS-amostra), TBARS na oxidação induzida da amostra (TBARS-oxid), na diferença entre TBARS-oxid/ TBARS-amostra e na Capacidade Antioxidante Total (TAC) de cães mediante consumo das rações contendo beta-caroteno e espirulina, em relação ao grupo Controle (100%).

Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização da espirulina até o nível de 3% na dieta demonstrou-se segura para cães. Mais estudos são necessários para se verificar seus efeitos *in vivo* e *ex vivo* sobre o sistema imunológico de cães. Apesar disto, a redução na produção de IL-10 por células mononucleares de cães alimentados com espirulina parece estar relacionada com o melhor status oxidativo dos animais, verificado também pelas menores concentrações séricas de TBARS. A adição de 1% de espirulina favoreceu a melhor resposta antioxidante no presente estudo.

V. REFERENCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª edição, Rio de Janeiro: Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2005, 268-300p.
- ABDALLA, D.S.P. & LIMA, E.S. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- AL-BATSHAN, H.A.; AL-MUFARREJ, S.I.; AL-HOMAIDAN, A.A.; QURESHI, M.A.. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v. 23, p. 281–289, 2001.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, p. 171-176, 2002.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R. Estudo de hepatócitos de rato em cultura primária submetidos à hipóxia e reoxigenação: ação dos citoprotetores prostaglandina E1, superóxido dismutase, verapamil, alopurinol, clorpromazina e efeito citotóxico da actinomicina D [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.
- ANFAL-PET. **Guia nutricional pet**. Ed. ANFAL-PET, São Paulo – Brasil, 1ed., 2007, 72p.
- ANFAL-PET. **Mercado Pet em 2010**. Disponível em: http://anfalpet.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=60&Itemid=136. Acessado em: 13/08/2011.
- AOAC – ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. Official and tentative methods of analysis. 16ed. Arlington, Virginia: **AOAC International**, p.16-9, 1995.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication 2004**. Association of American Feed Control Officials, 2004.

- AYEHUNIE, S.; BELAY, A.; BABA, T.W.; RUPRECHT, R.M. Inhibition of HIV-1 tenses (Arthrospira platensis). **JAIDS: Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirol.** v. 18(11), p. 7–12, 1998.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. c-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 18, 275(1), p. 20–25, 2000.
- BELAY, A. The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. **Journal of the American Nutraceutical Association** v.5; p.27-49, 2003.
- BORCHERS, A.T.; KRISHNAMURTHY, A.; KEEN, C.L.; MEYERS, F.J.; GERSHWIN, M.E. The immunobiology of mushrooms. **Experimental Biology and Medicine.** v.233, n°3, p. 259-276, 2008.
- CHEW, B.P.; PARK, J.S.; WENG, B.C. Dietary b-carotene is taken up by blood plasma and leukocytes in dogs. **Journal Nutrition.** V.130, p.1788-1791, 2000a.
- CHEW, B.P.; PARK, J.S.; WENG, B.C. Dietary b-Carotene Stimulates Cell-Mediated and Humoral Immune Response in Dogs. **Journal Nutrition.** V.130, p.1910-1913, 2000b.
- CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **Journal Nutrition.** V.134. p.257S-261S, 2004.
- COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.43, n.3, p.137-154, 1994.
- COLLA, L.M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, T.A.V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown with different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung C – Journal of biosciences.** v. 59c, p.55-59, 2004.
- DASGUPTA, T.; BANERJEE, S.; YADAV, P.K.; RAO, A.R. Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v. 226, p. 27–38, 2001.

De CAMPOS, S. Imunologia/Imunidade – avaliação laboratorial do sistema imunológico.

Acessado em: 12/01/2011. Disponível em:

<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/14483>

DRABKO, K.; BOJARSKA-JUNAK; KOWALCZYK, J.R. Serum concentration of IL-2, IL-4, IL-10 and TNF- α in children with acute lymphoblastic leukemia – possible role of oxidative stress. **Central European Journal Immunology** v.33, n.3, p.146-149, 2008.

HAYASHI, O.; KATOH, T.; OKUWAKI, Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology** (Tokyo) 40:431–441 1994.

HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; KOJIMA, I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Natural Products**. v. 59(1):83–87, 1996a.

HAYASHI T, HAYASHI K, MAEDA M, KOJIMA IA. Natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **AIDS Research and Human Retroviruses**. v.12(15):1463–1471, 1996b.

HAYASHI, O.; HIRAHASHI, T.; KATOH, T. Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. v.44, p.841-851, 1998.

HAYEK, M.G.; MASSIMINO, S.P.; CEDDIA, M.A. Interaction of nutrition and the aging immune system of the dog and cat. **WSAVA – 2002. Anais Clinical and nutritional management of senior dogs and cats**. p. 37-44, 2002.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*: superalimento del futuro. **Barcelona: Ediciones Urano S.A.**, 1995.

HEATON, P.R.; REED, C.F.; MANN, S.J.; RANSLEY, R.; STEVENSON, J.; CHARLTON, C.J.; SMITH, B.H.E.; HARPER, J.; RAWLINGS, J.M. Role of dietary antioxidants to Protect against DNA Damage in Adult dogs. **Journal Nutrition**. V.132, p. 1720S-1724S, 2002.

- HOSOYAMADA, Y.; TAKAI, T.; KATO, T. Effects of water-soluble and insoluble fractions of Spirulina on serum lipid components and glucose tolerance in rats. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**. v.44, p. 273–277, 1991.
- HUGHES, D.A. Effects of carotenoids on human immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.58, p.713-718, 1999.
- HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E.J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 497-507, 2002.
- ISMAIL, M.F.; ALI, D.A.; FERNANDO, A.; ABDRABOH, M.E.; GAUR, R.L.; IBRAHIM, W.M.; RAJ, M.H.G.; OUHTIT, A. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by Spirulina. **International Journal of Biological Sciences**. v.5(4), p. 377–387, 2009.
- JUAREZ, M.A.; MASCHER, D.; TORRES, P.V.; FARIAS, J.M. Effects of spirulina on vascular reactivity. **Journal of Medicinal Food**. v.12(1), p.15–20, 2009.
- KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S. Nutritional and therapeutic potential of spirulina. *Curr Pharm Biotechnol*. 2005;6(5):373–379.
- KIM, H.W.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. et al. Dietary lutein stimulates immune response in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V.74, p.315-327, 2000.
- KIM, H.W.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. et al. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V.73, p.331-341, 2001.
- KWAK, N.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. v. 12, p. 99-107, 2001.
- MAO, T.K.; VAN DE WATER, J.; GERSHWIN, M.E. Effect of Spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Medicinal Food**. v 3, p.135–140, 2000.
- MEYDANE, S.N.; WU, D.; SANTOS, M.S.; HAYEK, M.G. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.62, p.1462S-1476S, 1995.

- MITTAL, A.; KUMAR, P.V.; BANERJEE, S.; RAO, A.R.; KUMAR, A. Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolizing enzymes in Swiss albino mice. **Phytotherapy Research**. v.13(2), p.111–114, 1999.
- MORAES, F.P. & COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, p.109-122, 2006.
- NANDY, D.; MISHRA, M.K; BASU, A.; BISHAYI, B. Effects of IL-18 and IL-10 pre-treatment on the alterations of endogenous cytokines in liver and spleen of mice with experimental endotoxemia. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.48, p.1103-1110, 2010.
- NEUMANN, A.I.C.P.; ABREU, E.S.; TORRES, E.A.F.S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos...você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**. v. 14, p. 19-23, 2002.
- Subcommittee on Dog and Cat Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council. **NUTRIENT REQUIREMENT OF DOGS AND CATS**. Energy. Cap.3, p. 28-36
- OLIVEIRA, T.M.F.S., FURUTA, P.I., CARVALHO, D., MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 17, p. 7–11, 2008.
- PRICE, J.A., III, SANNY, C.; SHEVLIN, D. Inhibition of mast cells by algae. **Journal of Medicinal Food**. v. 5, p.205–210, 2002.
- QURESHI, M.A.; ALI, R.A.. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v.18 (3), p. 457-463, 1996.
- QURESHI, M.A.; GARLICH, J.D.; KIDD, M.T. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v.18 (3), p. 465–476, 1996.

- REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; MERINO, N.; RODRÍGUEZ, S.; ANCHETA, O. Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. **Mediators of Inflammation**. v. 11, p. 75–79, 2002.
- RICHMOND A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: **CRC Press**; 1990.
- ROBERFROID M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive Liver Disease**. v. 34(2), p. 105-110, 2002.
- SCHLOTZHAUER, S.; LITTELL, R.C. **SAS system for elementary statistical analysis**. 2nd. ed. Cary: Sas institute. p. 456, 1997.
- SCHROECKSNADEL, K.; FISCHER, B.; SCHENNACH, H.; WEISS, G.; FUCHS, D. Antioxidants suppress Th1-type immune response in vitro. **Drug Metabolism Letters**. v.1, p.166-171, 2007.
- SCHWARTZ J.; SHKLAR G. Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 45(6), p. 510–515, 1987.
- SCHWARTZ, J.; SHKLAR, G.; REID, S.; TRICKLER, D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of Spirulina-Dunaliella algae. **Nutrition and Cancer**; v. 11, p. 127-134, 1988.
- SHEAHAN, S.; BELLAMY, C.O.; HARLAND, S.N.; HARRISON, D.J.; PROST, S. TGF beta induces apoptosis and EMT in primary mouse hepatocytes independently of p53, p21Cip1 or Rb status. **BMC Cancer**. v. 8, p. 191–201, 2008.
- SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.; REDDY, M.C.; MALLIKARJUNA REDDY, M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. **Biochemical Pharmacology**. v.68(3), p. 453–462, 2004.
- SWAGGERTY, C.L.; PEVZNER, I.Y.; FERRO, P.J.; CRIPPEN, T.L.; KOGUT, M.H. Association between in vitro heterophil function and the feathering gene in commercial broiler chickens. **Avian Pathology**. v. 32(5), p. 483-488, 2003.
- TAIPINA, M. S.; FONTES, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. **Higiene alimentar**. v. 16 (100), p. 28-29, 2002.

- TAKEUCHI, T.; LU, J.; YOSHIZAKI, G.; SATOH, S. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw Spirulina. **Fisheries Science**. v. 68 (1), p. 34-40, 2002.
- TIZZARD, I.R. **Introducción a inmunología veterinaria**. 8.ed. Barcelona: Elsevier, Espanha, p. 12-33, 2009.
- VON DER WEID D, DILLON JC, FALQUET J. Malnutrition: a silent massacre. Geneve: **Antenna Technology**. p. 13, 2000.
- VONSHAK A. Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis; p. 131-158, 1997.
- YANG, H.N.; LEE, E.H.; KIM, H.M. Spirulina platensis inhibits anaphylactic reaction. **Life Science** v. 61, p. 1237–1244, 1997.
- ZHANG, H.Q; LIN, A.P.; SUN, Y. Chemo and radio protective effects of polysaccharide of spirulina platensis on haematopoietic stem cells in dog and mice. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 22(12), p. 1121–1124, 2001.

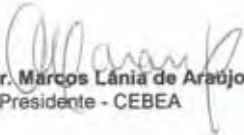
APÊNDICES**APÊNDICE A:**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 017641-08 do trabalho de pesquisa intitulado "**Aplicabilidade da alga cianofícea Spirulina máxima como ingrediente em petfood: avaliação de ação antioxidante e estimulação da resposta imunológica em cães**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 11 de setembro de 2008.

Jaboticabal, 11 de setembro de 2008.


Prof. Dr. Marcos Lânia de Araújo
Presidente - CEBEA

APÊNDICE B:



Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
Rua Tuluá, 718/720 - CEP 03081-015
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 2091-8787 - Fax: +55 11 2091-6387

Controle de qualidade Laudo Técnico e Identificativo

Ref N° Pedido: 0109008339

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
www.santosflora.com.br

Registro IBAMA 3867
CMVS: 355030801-109-000092
Autorização ANVISA: 04.604-1
Registro CRE: 02635-0101
Data: 10/2009

NOMENCLATURA: SPIRULINA

Nome científico (gênero/espécie):	<i>Spirulina maxima</i>	Esterlização:	Não Houve
Identificação botânica:	<i>Spirulina maxima</i>	Família:	Oscillatoriaceae
Parte utilizada:	Alga	Origem:	China
Manufatura/Val (mês/ano):	08/2009 - 08/2012	Lote:	SPIR01/0809
Método de secagem:			

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:

Pó fino e higroscópico de coloração verde. Odor marinho e sabor característico.
Tamanho da partícula: 80 MESH.

Teste de pureza e integridade:

Umidade: 4,78% (*máx 9,0%); Cinzas totais: 6,25% (máx. 26,0%); Mg: 250mg/100g (*esp. 200-400mg/100g); Ca: 1700mg/100g (*1600mg-2200mg/100g); Dens: 0,540 (*0,500-0,900g/mL); Fe: 60 (*55-105mg/100g); K: 1500 (*1000-2000mg/100g).

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

Teor de proteínas: 66,0% (*esp. 60 - 70%); Carotenoides: 450mg/100g (*esp. min. 400 mg/100g); Beta Caroteno: 210mg/100g (*esp. min. 100 -300mg/100g); Clorofila A: 700mg/100g (*esp. min. 600mg/100g); Clorofila B: 400mg/100g (*esp. min. 300mg/100g); Carboidratos: 1600mg/100g (*esp. min. 1500mg/100g). Metais pesados: Pb: 0,7ppm (*esp. máx. 1ppm); Hg: 0,07mg/kg (*esp. <1, 0mg/kg); Cd: 0,15mg/kg (*máx. 0,2mg/kg); As: 0,4ppm (*máx. 1,0 ppm).

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem total	Máx. 10.000 UFC/g	N.R.
Bolores e leveduras	Máx. 1.000 UFC/g	N.R.
Enterobactérias	Ausência/g	N.R.
<i>E. coli</i>	Ausência/10g	N.R.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência/g	N.R.
<i>Pseudomonas sp</i>	Ausência/g	N.R.
<i>Salmonella sp</i>	Ausência/10g	N.R.

*ARMAZENAR EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DE UMIDADE E CALOR.
*SE DIFERENÇA A TESTE NÃO REALIZADO.
*ALTERAÇÃO DE COR PODERA OCORRER DEVIDO SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL.
*A VALIDADE SERA DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAL INADEQUADO.

* Especificação interna
Manter e utilizar este produto em condições anérgicas

FERNANDA BAFFA
CRF/SP: 37.983
Farmacêutica Responsável:

APÊNDICE 1 B: Laudo técnico de composição química da *Spirulina maxima* adquirida para o estudo.