

RESUMOS/ABSTRACT

Prognostic and predictive value of biomarkers in canine and feline mammary cancer**Valor prognóstico e preditivo de biomarcadores no cancro da mama de canídeos e felídeos****Maria de Fátima Gärtner****ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e IPATIMUP- Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto**
Email: fgartner@ipatimup.pt**ABSTRACT**

The discovery of cancer biomarkers increased significantly providing better detection and treatment. The cancer biomarkers can include a wide range of biochemical entities, such as nucleic acids, proteins, carbohydrates, lipids, small metabolites, cytogenetic parameters as well as tumor cells detection in the body fluid. Potential applications in oncology may include risk assessment, screening, differential diagnosis, prognosis and monitoring of disease progression [1]. One of the main barriers to progress is the accessibility to identify biological indicators, or cancer biomarkers that can predict who will benefit from a particular targeted therapy. To understand the relevance of each biomarker will be very important not only to diagnose consistently a disease, but help in choosing multiple available therapeutic alternatives and likely to benefit the patients. It is however important that these biological indicators undergo a rigorous evaluation, including analytical validation and clinical evaluation. The research into potential markers that may lead to new therapies in addition to surgery, which still the only way considered effective in the treatment of companion animals, has led to a study involving dogs, which were diagnosed with spontaneous mammary tumors in the routinely visit to the assistant veterinarian [2]. It has been shown that two proteins belonging to the galectin's family, galectin-1 and galectin-3, showed alternating feature of expression in the primary tumors, tumor cells in circulation and lung metastases, suggesting that inverse regulation may be involved in the invasion process, and in the establishment of distant metastasis - the tumor cells have a dynamic and contrasting expression of galectins during different phases of the metastatic process [3,4]. Biomarkers may open new avenues for therapy of this disease.

Keywords: Biomarkers, canine mammary cancer, feline mammary cancer.

RESUMO

A descoberta de biomarcadores de cancro aumentou significativamente proporcionando melhor eficácia na deteção e no tratamento. Os biomarcadores de cancro podem incluir uma ampla gama de entidades bioquímicas, tais como ácidos nucleicos, proteínas, açúcares, lípidos, pequenos metabolitos, parâmetros citogenéticos, bem como células tumorais detetadas no fluido corporal. As suas potenciais aplicações na área da oncologia podem incluir a avaliação de risco, o rastreio, o diagnóstico diferencial, o prognóstico e acompanhamento da progressão da doença [1]. Uma das principais barreiras ao progresso é identificar os indicadores biológicos, ou biomarcadores do cancro, que possam prever quem beneficiará de uma terapia alvo

particular. Compreender a relevância de cada biomarcador será muito importante não só para diagnosticar a doença de forma confiável, mas ajudar na escolha de múltiplas alternativas terapêuticas disponíveis e suscetível de beneficiar os doentes. É contudo importância que estes indicadores biológicos passem por uma avaliação rigorosa, incluindo a validação analítica e avaliação clínica. A pesquisa de potenciais marcadores que possam levar a novas terapias, para além da cirurgia que constitui, ainda, o único modo de tratamento considerado eficaz nos animais de companhia, levou a um estudo envolvendo cadelas, nas quais foram diagnosticados tumores espontâneos da mama em visitas regulares ao Médico Veterinário Assistente [2]. Demonstrou-se que duas proteínas da família das galectinas, galectina-1 e galectina-3, apresentavam expressões alternadas em tumores primários, células tumorais em circulação e metástases pulmonares, sugerindo que a sua regulação inversa poderá estar envolvida no processo de invasão, bem como no estabelecimento de metástases à distância - as células tumorais apresentam uma expressão dinâmica de galectinas durante o processo de metastização [3,4]. Os biomarcadores poderão abrir novos caminhos à terapia desta doença.

Palavras-chave: Biomarcadores, cancro da mama de canídeos, cancro da mama de felídeos.

References

1. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol* 2012; 6(2):140-6.
2. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gärtner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res* 2012; 159(3):165-72.
3. De Oliveira JT, De Matos AJ, Barros R, Ribeiro C, Chen A, Hespanhol V, Rutteman GR, Gärtner F. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in canine non-malignant and malignant mammary tissues and in progression to metastases in mammary tumors. *Anticancer Res* 2104; 34(5):2211-21.
4. De Oliveira JT, Ribeiro C, Gärtner F. Role of galectin-3 in cancer metastasis. *Glycobiol Insights* 2015:5 1-13 doi:10.4137/GBI.S13916.

Determination of the optimal cut off value for the biomarker Ki-67 in Feline Mammary Carcinomas and its clinical importance

Determinação do cut off de positividade do biomarcador Ki-67 em Carcinomas Mamários Felinos e sua importância clínica

Maria Soares, Rita Ribeiro, Sandra Carvalho, Maria Peleteiro, Jorge Correia, Fernando Ferreira

CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

a Corresponding author: Maria Soares, mariajo-soares@gmail.com

ABSTRACT

Ki-67 is a nuclear protein and a proliferation biomarker frequently used in the establishment of prognosis in breast cancer patients [1]. In order to investigate the prognostic value of the Ki-67 proliferation index in female cats presenting mammary carcinomas, a prospective study was conducted with 96 animals. The Ki-67 index of primary tumors (n=96), regional metastasis (n=38) and distant metastasis (n=16) was determined and the optimal cut-off value for the Ki-67 index was 14%. Ki-67 indexes $\geq 14\%$ were detected in 72.9% (70/96) of the primary tumors. Tumors with Ki-67 index equal or higher than 14% were significantly associated with large size ($p=0.022$), poor differentiation ($p=0.009$), presence of necrotic areas ($p=0.008$), estrogen receptor-negative status ($p<0.0001$), fHER2-negative status ($p=0.003$), and shorter overall survival ($p=0.012$). The Ki-67 index of primary tumors was also significantly lower when compared to the Ki-67 index of the distant metastasis and a strong and positive correlation was found between Ki-67 index of primary tumors, regional metastasis and distant metastasis. Based on the above results, we propose the adoption of the 14% value as the optimal cut-off for Ki-67 to identify tumors with high risk of disease progression, being a potential prognostic factor in Feline Oncology.

Keywords: Feline mammary carcinomas, Ki-67 index, prognostic factors, immunohistochemistry.

RESUMO

A proteína Ki-67 é uma proteína nuclear e um biomarcador de proliferação celular, frequentemente utilizado no estabelecimento do prognóstico em pacientes com cancro da mama [1]. Com o objetivo de investigar o valor de prognóstico do índice de proliferação de Ki-67 em gatas com carcinoma mamário, foi conduzido um estudo prospetivo com 96 animais. O índice de Ki-67 de tumores primários (n=96), metástases regionais (n=38) e metástases distantes (n=16) foi determinado e o cut-off de positividade obtido foi de 14%. Índices de Ki-67 $\geq 14\%$ foram observados em 72,9% (70/96) dos tumores primários. Tumores com índice igual ou superior a 14% apresentaram-se significativamente associados a tumores com maiores dimensões ($p=0.022$), indiferenciados ($p=0.009$), com a presença de necrose no tumor ($p=0.008$), com subexpressão do receptor de estrogénio ($p<0.0001$) e do fHER2 ($p=0.003$), e com menores tempos de sobrevida ($p=0.012$). O índice de Ki-67 nos tumores primários

também foi significativamente inferior quando comparado com as metástases distantes e foi ainda observada uma correlação positiva e forte entre o Ki-67 dos tumores primários, metástases regionais e metástases distantes. Com base nos resultados apresentados, os autores propõem a adopção do valor de 14% como o valor de cut-off ótimo para identificar os tumores com elevado risco de progressão da doença e consideram que o Ki-67 é um potencial factor de prognóstico em Oncologia Felina.

Palavras-chave: Carcinomas mamários felinos, índice de Ki-67, factores de prognóstico, imunohistoquímica.

References

1. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(22):1656-64.

Cytokeratins in bovine urothelial bladder tumors: expression and prognostic value
Citoqueratinas em tumores do urotélio em bovinos: expressão e utilidade no prognóstico

João Bettencourt Cota, Sandra Carvalho, Ana Duarte, Luís Tavares, Maria da Conceição Peleteiro

CIISA - Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal
a Corresponding author: João Bettencourt Cota, adjoaobcota@fmv.ulisboa.pt

ABSTRACT

Cytokeratins (CKs) belong to the intermediate filament group of proteins and play a crucial role in the structure, basic functions and differentiation of epithelial cells. There are several CKs, which expression pattern is highly specific being associated with the differentiation of the different types of epithelia. The expression of some CKs may be studied to determine a tumor's origin, as the pattern of CKs of the normal tissue is frequently maintained.

The combined expression of CK7 and CK20 was studied in 27 bovine epithelial bladder tumors using commercially available antibodies. A third commercial antibody, CK MNF116, which reacts with multiple CKs (CK 5, 6, 8, 17 and 19) was also used. The semi-quantification of the CKs expression was performed, and a score (0-4) was attributed to each tumor according to the percentage of neoplastic cells positively stained. Tumors with high grade and stage showed the lower scores for CK7 and CK20; the scores for CK MNF116 were not altered with increasing grade or stage, as nearly all tumors showed 100% positive neoplastic cells. The lower scores of CK7 were statistically associated with increasing tumor grade ($p < 0,001$) and infiltration stage ($p < 0,001$); for CK20 only high tumor grades were statistically associated with lower scores ($p < 0,005$); no statistical associations were found between tumor grade or stage and CK MNF116 scores. It was concluded that the combined expression of CK7 and CK20 is useful to confirm the urothelial phenotype of urinary bladder tumors in cattle, as loss of expression of these CKs is associated with malignant behavior; CK MNF116 antibody proved to be very sensitive, and could be used to help in the staging process of urothelial carcinomas of cattle, as it can point out small numbers of infiltrative neoplastic cells.

Keywords: Cytokeratins, urothelial bladder tumors, cattle, immunohistochemistry.

RESUMO

As citoqueratinas (CKs) pertencem ao grupo de proteínas dos filamentos intermédios e desempenham um papel fundamental na estrutura, funções básicas e na diferenciação das células epiteliais. Existem várias CKs cujo padrão de expressão é altamente específico, estando associado com a diferenciação dos diversos tipos de epitélios. A expressão de algumas CKs pode ser avaliada com o objectivo de determinar a origem celular do tumor, já que o padrão de expressão das CKs do tecido normal é frequentemente mantido.

A expressão concomitante das CK7 e CK20 foi pesquisada em 27 tumores epiteliais da bexiga de bovinos recorrendo a anticorpos comercialmente disponíveis. Um terceiro anticorpo comercial, CK MNF116, o qual reage com múltiplas CKs (CK 5, 6, 8, 17 e 19) também foi utilizado. Foi realizada a avaliação semi-quantitativa da expressão das CK nos tumores, sendo atribuída uma classificação (0-4) de acordo com a percentagem de células neoplásicas marcadas positivamente. Os tumores de alto grau e invasivos demonstraram classificações mais baixas para as CK7 e CK20; as classificações para a CK MNF116 não se alteraram com o grau ou com o estadio de invasão, visto que em quase todos os tumores 100% das células neoplásicas eram positivas. As classificações mais baixas estavam estatisticamente associadas com o aumento do grau ($p < 0,001$) e com o estadio ($p < 0,001$); no caso da CK20 somente o aumento do grau estava estatisticamente associado com classificações de valor mais baixo ($p < 0,005$); não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o grau ou estadio e as classificações para a CK MNF 116. Pode concluir-se que a expressão concomitante de CK7 e CK20 é útil para identificar o fenótipo urotelial nos tumores de bexiga de bovinos, estando a perda da expressão destas CKs associada a comportamento maligno; o anticorpo CK MNF 116 demonstrou ser muito sensível, podendo auxiliar no processo de estadiamento dos carcinomas uroteliais em bovinos, visto que consegue identificar pequenos grupos de células neoplásicas infiltrativas.

Palavras-chave: Citoqueratinas, tumores uroteliais da bexiga, bovinos, imunohistoquímica.

Biomarkers in a One Health perspective: current knowledge of their ability to merge human and animal health

Biomarcadores numa perspetiva de “Uma Só Saúde”: conhecimento atual da sua capacidade de unir a saúde humana e animal

Catarina Lavrador^{1,2,a}, Manuela Vilhena^{1,2}, Ricardo Abreu de Assunção^{3,4}, Paula Soromenho de Alvíto³, Elsa Leclerc Duarte^{1,2}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal.

2. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal.

3. Food and Nutrition Department, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, Portugal

4. Centre for Environmental and Marine Studies, Faculty of Sciences, University of Lisbon, Portugal.

a Corresponding author: Catarina Lavrador, clavrador@uevora.pt

ABSTRACT

Biomarkers are nowadays essential tools to be one step ahead for fighting disease, enabling an enhanced focus on disease prevention and on the probability of its occurrence. Research using a multidisciplinary approach has been an important step towards the repeated discovery of new biomarkers. Biomarkers are defined as measurable biochemical indicators of the presence of disease or as indicators for monitoring disease progression. Biomarkers have been used in several domains such as oncology, neurology, cardiovascular, inflammatory and respiratory disease, and in several endocrinopathies. Bridging biomarkers in a One Health perspective has been proven useful in almost all of these domains.

In oncology, humans and animals are found to be subject to the same environmental and genetic predisposing factors: examples include the existence of mutations in the BR-CA1 gene predisposing to breast cancer, both in humans and in dogs, with increased prevalence in certain dog breeds and human ethnic groups. Also, breast-feeding frequency and duration has been related to a decreased risk of breast cancer in women and animals considered “professional lactators”.

When it comes to infectious diseases, this parallelism is prone to be even more important, for as much as 75% of all emerging diseases are believed to be zoonotic. Examples of successful use of biomarkers have been found in several zoonotic diseases such as Ebola, dengue, leptospirosis and West Nile virus infections.

Acute Phase Proteins (APPs) have been used for quite some time as biomarkers of inflammatory conditions. These have been used in human health and also in the veterinary field, such as in mastitis evaluation and PRRS (porcine respiratory and reproductive syndrome) diagnosis. Advantages rely on the fact that these biomarkers can be much easier to assess than other conventional disease diagnostic approaches (example: measured in easy to collect saliva samples).

Another domain in which biomarkers have been

essential is food safety: the possibility to measure exposure to chemical contaminants or other bio-hazards present in the food chain, which sometimes pose analytical challenges due to their low bioavailability in body fluids, is nowadays a major breakthrough.

Finally, biomarkers are considered the key to provide more personalized therapies, with more efficient outcomes and fewer side effects. This approach is expected to become the correct path to follow in veterinary medicine as well as human medicine in the near future.

Keywords: Biomarkers, One Health.

RESUMO

Os biomarcadores constituem atualmente ferramentas essenciais para estar um passo à frente na luta contra as doenças, permitindo-nos focar na prevenção e na probabilidade da sua ocorrência. Uma abordagem multidisciplinar na investigação tem sido muito importante para a sucessiva descoberta de novos biomarcadores.

Os biomarcadores são definidos como indicadores bioquímicos mensuráveis da presença de uma doença ou ainda utilizados para a monitorização da sua progressão. Atualmente, os biomarcadores têm sido usados em várias áreas, tais como em oncologia, neurologia, doenças cardiovasculares, respiratórias, bem como em doenças inflamatórias e endocrinopatias. Os “bridging biomarkers”, que permitem efectuar ligações numa perspetiva de Uma Só Saúde têm sido úteis em quase todos esses domínios.

Em oncologia, é conhecido o facto de humanos e animais se encontrarem sujeitos aos mesmos fatores predisponentes ambientais e genéticos. Os exemplos incluem a existência de mutações no gene BR-CA1 que predis põem ao carcinoma da glândula mamária, tanto em humanos como em cães, e o aumento da sua prevalência em determinadas raças de cães e grupos étnicos humanos. Além disso, a frequência e a duração da amamentação tem sido relacionada com uma diminuição do risco destas neoplasias tanto em mulheres como em animais de elevada produção leiteira.

No caso das doenças infecciosas, este paralelismo torna-se ainda mais relevante em virtude de cerca de 75% de todas as doenças emergentes serem zoonóticas. Os exemplos de utilização bem-sucedida de biomarcadores neste contexto são encontrados em várias zoonoses tais como o Ébola, dengue, leptospirose ou infeções por vírus do Nilo Ocidental.

As proteínas de fase aguda (Acute Phase Proteins-APPs) têm sido utilizadas há algum tempo como biomarcadores de condições inflamatórias. Estas têm sido usadas em saúde humana, mas também nas ciências veterinárias, tais como nas mastites e na PRRS (síndrome respiratória e reprodutiva porcina). As vantagens decorrem do facto destes biomarcadores poderem ser muito mais fáceis de avaliar comparativamente a outras abordagens de diagnóstico convencionais (por exemplo, o facto de serem medidos em amostras de fácil colheita, como a saliva).

Outro domínio em que os biomarcadores têm sido essenciais é a segurança alimentar: a possibilidade de medir a exposição aos contaminantes químicos ou outros perigos biológicos presentes

na cadeia alimentar, que constituem muitas vezes desafios analíticos devido à sua baixa biodisponibilidade em fluidos corporais, é hoje em dia um significativo avanço.

Finalmente, os biomarcadores são considerados a chave para estabelecer terapias mais personalizadas, com maior eficácia e menos efeitos secundários. Esta abordagem constituirá o melhor caminho a seguir também em medicina veterinária num futuro próximo.

Palavras-chave: Biomarcadores, uma só Saúde.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

Biomarkers of renal failure in human and their application in veterinary medicine
Biomarcadores de insuficiência renal no humano e sua aplicação em medicina veterinária

Elísio Costa^{1,a}, Nuno Alexandre^{2,3,b}

1. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

2. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

3. Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

a Email: emcosta@ff.up.pt; b Email: nmla@uevora.pt

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a common disease in domestic cats and dogs, with an overall prevalence of 1.6 to 20% and 0.5 to 7% in dogs respectively. This prevalence increases to over 31% in cats above 15 years old and to 15% in dogs over 10 years of age. CKD prevalence appears to be increasing and is considered one of the most common causes of illness and death in geriatric cats and dogs. Indeed, together with degenerative joint disease and neoplasia, CKD is the most prevalent disease in elderly cats and dogs. The irreversible loss of kidney function in cats and dogs with CKD makes the disease a serious problem in small animal medicine, especially in geriatric cats. For that reason the identification of reliable biomarkers of early kidney injury, of progression is therefore an emergent area of clinical research. In humans, during the last few decades besides the increasing prevalence of CKD in patients with over 65 years old, there have been several advances in the management of CKD patients and in dialysis techniques, however the mortality continues unacceptably high in these patients increasing the need for biomarkers of early kidney injury, of progression of disease as well the identification of predictive biomarkers of morbidity and mortality.

CKD is a progressive disease characterized by a severe reduction in glomerular filtration rate (GFR) through tubulointerstitial damage. The etiology of feline and canine CKD is heterogeneous and includes specific disease processes that initiate renal damage or dysfunction, such as polycystic kidney disease, renal amyloidosis, renal dysplasia and renal lymphoma. However, in the majority of the cases no specific cause was identified. Although it is often referred that kidneys are capable of adequate filtration until a certain threshold of loss (e.g., loss of 75-80 percent of renal nephrons), there is evidence that this cutoff may not be so sharply defined, as demonstrated in CKD cats induced through surgical reduction of renal mass. Notwithstanding, the clinical relevance of CKD, the early diagnosis can be challenging, in both human and veterinary medicine. Glomerular filtration rate (GFR) is considered the gold standard for assessing renal function. However, in veterinary medicine direct measurement of GFR is impractical in clinical setting. Moreover, the currently used biomarkers, serum levels of creatinine and urea, show a poor performance as surrogates of GFR and their rise above

normal range are related with later stages of CKD (IRIS stages). Therefore, there is a need for better methods to diagnose and monitor patients with renal disease, including its early diagnosis. Novel serum and urine biomarkers are under evaluation in human and veterinary patients in an attempt to improve the ability to diagnose both acute and chronic kidney diseases, by allowing a more specific and sensitive diagnostic capability, and with potential for early disease detection. Furthermore, these biomarkers could help in the identification of the processes occurring during the development of the kidney disease, such as glomerular damage, decreased GFR, and tubular stress or dysfunction. The development and validation of new renal biomarkers is presently an active field of research. Indeed, many human studies have demonstrated that novel biomarkers are superior to the serum levels of urea and creatinine in the assessment of GFR, namely cystatin C. Moreover, several markers have been studied as markers of tubular dysfunction, namely kidney injury molecule-1, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, N-acetyl- β -O-glucosaminidase, γ -glutamyl-transpeptidase, retinol binding protein and interleukin-18. However, markers of renal tubular injury are not routinely used and little is known about their role in kidney diseases (acute or chronic) in cats and dogs. Moreover, higher levels of several biomarkers of systemic inflammation and pro-fibrotic have been associated with low kidney function, namely, transforming growth factor beta, components of the renin-angiotensin-aldosterone system such as angiotensin II, endothelin-1, transglutaminase 2, alpha-1 acid glycoprotein, interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin-18.

Considering that, many of these new biomarkers have not yet been evaluated in cats and dogs, and those that have been already evaluated require a further evaluation in the context of large clinical trials before widespread clinical implementation, it is our believe that cat and dog forth coming studies should focus in the following aspects: 1) compare the performance of a large number of renal-associated biomarkers in the diagnosis, including the potential for early disease detection, and monitoring CKD patients; 2) find a panel of biomarkers with clinical utility for assessing CKD; and 3) evaluate the role of inflammation in the pathophysiology of CKD in cats and dogs.

Key words: Chronic kidney disease, biomarkers, cat, dog, early diagnosis.

RESUMO

A doença renal crónica (DRC) é uma doença comum em gatos e cães, com uma prevalência global de 1,6 a 20% e 0,5 a 7% em gatos e cães respectivamente. A prevalência cresce para mais de 31% em gatos com idade superior a 15 anos de idade e para 15% em cães com mais de 10 anos de idade. A prevalência da DRC aparenta estar a aumentar e é considerado uma das causas mais comuns de doença e de mortalidade em gatos e cães geriátricos. De fato, juntamente com a doença articular degenerativa e as neoplasias, a DRC é a doença mais prevalente em gatos geriátricos. A perda irreversível da função renal em gatos e cães com DRC torna esta doença um problema grave em medicina de animais de companhia, es-

pecialmente em gatos geriátricos. Por esse motivo, a identificação de biomarcadores fiáveis de lesão renal precoce, é, por conseguinte uma área emergente de investigação clínica. Em humanos, durante as últimas décadas, para além do aumento da prevalência de DRC em pacientes com mais de 65 anos, houve vários avanços na terapêutica da DRC e em técnicas de diálise, no entanto, a mortalidade continua inaceitavelmente elevada nestes pacientes aumentando a necessidade da utilização de biomarcadores de lesão renal precoce, de progressão de DRC bem como a identificação de biomarcadores preditivos da morbilidade e mortalidade

A DRC é uma doença progressiva, caracterizada por uma severa redução da taxa de filtração glomerular (TFG) através de danos tubulointersticiais. A etiologia da DRC felina e canina é heterogênea e inclui processos de doenças específicas que iniciam lesão ou disfunção renal, como a doença renal poliquística, a amiloidose renal, a displasia renal e o linfoma renal. No entanto, na maioria dos casos não foi identificada nenhuma causa específica. Embora seja frequentemente referido que os rins são capazes de uma filtração adequada até um certo limiar de perda (por exemplo, a perda de 75-80 por cento de nefrônios renais), há evidências de que este limiar não é assim tão definido, tal como demonstrado em gatos com DRC induzida através de redução cirúrgica da massa renal. Não obstante, a relevância clínica da DRC, o diagnóstico precoce pode ser um desafio, tanto na medicina humana e como na medicina veterinária. A taxa de filtração glomerular (TFG) é considerado o teste padrão para avaliação da função renal. No entanto, na medicina veterinária a medição direta da TFG é impraticável em ambiente clínico. Além disso, os biomarcadores atualmente utilizados, nomeadamente os níveis séricos de creatinina e uréia, mostram um desempenho pobre como substitutos de TFG e a sua elevação acima dos valores normais estão relacionados com estadios mais avançados da doença renal crónica (estadios IRIS). Portanto, existe uma necessidade de melhores métodos para o diagnóstico e monitorização dos pacientes com doença renal, incluindo o seu diagnóstico precoce. Novos biomarcadores de DRC estão sob avaliação em pacientes humanos e veterinários numa tentativa de melhorar a capacidade de diagnosticar doenças renais agudas e crónicas, permitindo uma capacidade de diagnóstico mais específica e sensível, e com potencial para a detecção precoce da doença. Além disso, estes biomarcadores podem ajudar na identificação dos processos que ocorrem durante o desenvolvimento de doença renal, tais como a lesão glomerular, a diminuição da taxa de filtração glomerular, o stress ou disfunção tubular.

O desenvolvimento e validação de novos biomarcadores renais é atualmente um campo de activo de investigação. Com efeito, diversos estudos em humanos têm demonstrado que os novos biomarcadores são superiores aos níveis séricos de ureia e creatinina na avaliação da TFG, nomeadamente cistatina C. Além disso, vários marcadores têm sido estudados como marcadores de disfunção tubular, nomeadamente, a molécula de lesão renal-1, a lipocalina associada a gelatinase dos neutrófilos, a N-acetil- β -O-glucosaminidase, γ -glutamyl-

transpepsidase, a proteína de ligação ao retinol e a interleucina-18. No entanto, os marcadores de lesão tubular renal não são usados rotineiramente e pouco se sabe sobre o seu papel em doenças renais (agudas ou crónicas) em gatos. Além disso, os níveis mais elevados de vários marcadores de inflamação sistémica e pró-fibrótica têm sido associados a uma baixa função renal, nomeadamente, o factor de crescimento transformante beta, os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, tais como a angiotensina II, endotelina-1, transglutaminase 2, alfa-1-glicoproteína ácida, interleucina-6, factor de necrose tumoral- α e interleucina-18.

Considerando que, muitos destes novos biomarcadores ainda não foram avaliados em gatos e cães, e aqueles que foram já avaliadas exigem uma nova avaliação no contexto de grandes ensaios clínicos antes da aplicação clínico generalizada, em nosso entender os estudos clínicos nestes animais de companhia devem incidir nos seguintes pontos: 1) comparar o desempenho de um grande número de biomarcadores-renais no diagnóstico, incluindo o potencial para a detecção precoce da doença, e de monitorização pacientes com DRC; 2) encontrar um painel de biomarcadores com utilidade clínica para avaliar DRC; e 3) avaliar o papel da inflamação na fisiopatologia da DRC em gatos.

Palavras-chave: Doença renal crónica, biomarcadores, gato, cão, diagnóstico precoce.

Discovery and validation of biomarkers by proteomics**Descoberta e validação de biomarcadores por proteómica****Ana Varela Coelho****Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier (ITQBAX), Universidade Nova de Lisboa****Email: varela@itqb.unl.pt****ABSTRACT**

Proteomic approaches are gaining increasing importance in the context of all fields of animal and veterinary sciences, including physiology, productive characterization and tolerance and resistance to disease-causing agents, among others. Proteomic studies aiming biomarkers discovery mainly compare protein differential expression within two or more selected physiological situations. Due to high complexity of total protein extracts proteomics relies heavily on separation procedures, like 2D-electrophoresis and HPLC, as well as on protein identification and peptide quantification using mass spectrometry (MS) based methodologies.

During this presentation, a summary of the main proteomics methodologies available for protein biomarkers discovery and validation and some specific applications in the field of animal science will be provided.

Keywords: Biomarkers, proteomics, mass spectrometry.

RESUMO

As abordagens proteómicas têm adquirido cada vez mais importância no âmbito de várias áreas da ciência animal e das ciências veterinárias, incluindo a fisiologia, a caracterização produtiva, a tolerância e resistência a agentes causadores de doenças, entre outras. Estudos de proteómica que visam a descoberta de biomarcadores comparam, usualmente, a expressão diferencial de proteínas entre duas ou mais situações fisiológicas selecionadas. Devido à elevada complexidade dos extratos de proteína total a proteómica utiliza processos de separação, como electroforese de 2D e HPLC, bem como na identificação de proteínas e na quantificação de péptidos utilizando metodologias baseadas na espectrometria de massa (MS).

Será apresentado um resumo das principais metodologias proteómicas disponíveis para a descoberta e validação de biomarcadores e algumas aplicações específicas no domínio da ciência animal.

Palavras-chave: Biomarcadores, proteomica, espectrometria de massa.

Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus pseudintermedius* by serological proteomic analyses

Identificação de antígenos candidatos vacinais de *Staphylococcus pseudintermedius* por análise do proteoma serológico

Natacha Couto^{1,2,#,a}, Joana Martins^{2,#}, Ana Mafalda Martins³, Constança Pomba¹, Ana Varella Coelho²

1. Antibiotic Resistance Laboratory, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-UL), Av. da Universidade Técnica, 1300-477, Lisbon, Portugal

2. Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal

3. Dermatology and Immunology Service, Clinical Research, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-UL), Av. da Universidade Técnica, 1300-477, Lisbon, Portugal

These authors contributed equally to this work.

a Corresponding author: Natacha Couto, natachacouto@itqb.unl.pt

ABSTRACT

Recent emergence of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) has complicated considerably the treatment of infections caused by these bacteria. Therefore new treatment strategies are urgently needed, namely through the development of vaccines towards the control of bacterial infections. Our study describes how to use the Serological Proteome Analysis (SERPA) approach to identify potential vaccine candidate antigens. In order to assess the immunogenic potential of the *S. pseudintermedius* proteins, a Western blot analysis of two-dimensional gels was carried out with serum from healthy dogs (H), dogs with atopic dermatitis infected (ADI) and not infected (ADH) with *S. pseudintermedius*. Only immunogenic areas identified by $\geq 50\%$ of ADI and/or ADH dog sera and identified by $< 50\%$ of the H sera were excised and identified from Coomassie-colloidal stained gels. Four highly immunogenic areas (each containing more than one spot) were detected in cell wall and membrane associated fractions. We were able to identify by mass spectrometry, 19 unique proteins after in-gel digestion of the highly immunogenic areas. However only 4 of these proteins were surface associated proteins that could potentially be used in a vaccine. The SERPA approach employed in this study revealed novel candidate therapeutic targets for the control of *S. pseudintermedius* infections.

Keywords: Proteomics, MRSP, SERPA, vaccine candidates, *S. pseudintermedius*.

RESUMO

O recente aparecimento de *S. pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) complicou consideravelmente o tratamento de infeções causadas por estas bactérias. Assim sendo novas estratégias de tratamento são urgentemente necessárias, nomeadamente através do desenvolvimento de vacinas para o controlo de infeções bacterianas. Este estudo descreve o uso da abordagem de análise

do proteoma serológico (SERPA) para identificar potenciais antígenos candidatos vacinais. De forma a avaliar o potencial imunogénico das proteínas *S. pseudintermedius*, realizou-se uma análise de Western blot de géis bidimensionais com soro de cães saudáveis (H), cães com dermatite atópica infectados (ADI) e não infectados (ADH) com *S. pseudintermedius*. Apenas as áreas imunogénicas identificados por $\geq 50\%$ de ADI e/ou soros de cão ADH e identificados por $< 50\%$ dos soros de H foram excisadas e identificadas a partir de géis corados com Coomassie coloidal. Quatro áreas altamente imunogénicas (cada uma contendo mais do que uma proteína) foram detectadas nas fracções de parede celular e associada à membrana. Conseguimos identificar por espectrometria de massa, 19 proteínas únicas após a digestão in-gel das áreas altamente imunogénicas. No entanto, apenas quatro destas proteínas eram proteínas associadas à superfície que poderiam, potencialmente, ser utilizadas numa vacina. A abordagem SERPA empregue neste estudo revelou novos candidatos a alvos terapêuticos para o controlo de infeções por *S. pseudintermedius*.

Palavras-chave: Proteómica, MRSP, SERPA, candidatos vacinais, *S. pseudintermedius*

Genetic biomarkers for the traceability of animal products

Biomarcadores genéticos para a traçabilidade de produtos animais

António Marcos Ramos

**Grupo de Genómica Animal e Bioinformática,
CEBAL - Centro de Biotecnologia Agrícola e
Agro-Alimentar do Alentejo, Beja, Portugal**

Email: marcos.ramos@cebal.pt

ABSTRACT

Modern agricultural practices emphasize using highly selected livestock breeds, which constitutes a threat to the indigenous breeds and leads to biodiversity loss of local genetic resources. However, these breeds contain vital genetic variation for traits like adaptation to extreme environmental conditions and disease resistance. Despite their clear importance, the genetic characterization of local breeds is lacking, which hinders the efforts needed for their preservation, improvement and valorization. Moreover, a wide variety of products are derived from farming of these breeds, several of them awarded the PDO (Protected Denomination of Origin) or PGI (Protected Geographical Indication) labels, which are associated with the use of specific breeds of livestock and serve as a guarantee to consumers of the higher quality of these products. In order to avoid frauds, and maintain consumers' confidence, reliable and efficient mechanisms are needed to assure the traceability of these products.

High-throughput sequencing now allows the identification of variation specific to a livestock breed. This variation can then be used to develop methods to assign unknown DNA samples to a specific breed from a panel of breeds, with an associated probability of assignment. This approach has therefore the ability of generating genetic biomarkers for each breed, which will then be useful for controlling the origin of specific food products. An example of this technology will be illustrated using the pig as a model species.

Keywords: Local breeds, biomarkers, traceability, high-throughput sequencing.

RESUMO

As práticas utilizadas em agricultura moderna dão preferência à utilização de raças de animais domésticos selecionadas geneticamente, o que constitui uma ameaça para as raças autóctones e conduz a uma perda acentuada de biodiversidade destes recursos genéticos locais. No entanto, estas raças possuem variação genética de elevada importância para características como a adaptação a condições ambientais extremas ou resistência a doenças. Apesar da sua clara importância, a caracterização genética destas raças é ainda insuficiente, o que afeta negativamente os esforços necessários para a sua preservação, melhoramento e valorização. Além disso, uma grande variedade de produtos tradicionais são derivados da exploração destas raças, muitos deles aos quais é atribuída a designação DOP (Denominação de Origem Controlada) ou IGP (Indicação Geográfica Protegida), associadas com a utilização de raças específicas e garantia para os consumidores da qualidade elevada destes produtos.

A sequenciação de alta capacidade permite a iden-

tificação de variação específica a uma raça. Esta variação pode ser usada para desenvolver métodos para atribuição de amostras desconhecidas de DNA a uma raça específica de um painel de raças, com uma probabilidade de atribuição associada. Esta abordagem tem por isso a capacidade de produzir biomarcadores genéticos para cada raça, o que será posteriormente bastante útil para controlar a proveniência de produtos de origem animal. Um exemplo desta tecnologia será apresentado utilizando os suínos como espécie modelo.

Palavras-chave: Raças autóctones, biomarcadores, traçabilidade, sequenciação de alta capacidade.

Resistance biomarkers to seasonal weight loss in goats: an important tool for breed selection
Biomarcadores de resistência à perda de peso sazonal em cabras leiteiras: um contributo para o melhoramento caprino

Mariana Palma^{1,a}, Lorenzo E. Hernández-Castellano^{2,3}, Noemí Castro², Anastasio Argüello², Juan Capote⁴, Manolis Matzapetakis¹, André Martinho de Almeida^{1,5,6,7}

1. Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa. Oeiras, Portugal

2. Department of Animal Science, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Spain

3. Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland

4. ICIA – Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Valle Guerra, Tenerife, Spain

5. Instituto de Investigação Científica Tropical. Lisboa, Portugal

6. Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica. Oeiras, Portugal

7. Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal

a Corresponding author: Mariana Palma, mpalma@itqb.unl.pt

ABSTRACT

Goat milk and dairy products are an important nutritional and economic resource in the Mediterranean and Sub-Saharan regions [1,2]. However, the yearly production of milk is affected by the scarcity of pastures during the dry season, which leads to seasonal weight loss (SWL) in ruminants [3,4]. The aim of the work is the identification of physiological markers indicative of SWL tolerance in two dairy goat breeds, with different tolerance levels. The results will help to define breed selection strategies in drought prone regions.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was used to compare the observable metabolome present in aqueous extracts of mammary glands and milk serum from two dairy goat breeds; one tolerant to dry environment (Majorera) and another susceptible (Palmera). Ten Palmera and 9 Majorera dairy goats in mid lactation were used in this study. Breed groups were further divided into two groups according to the feed regime, a control and a restricted fed group, resulting in 4 experimental groups (Majorera control, Palmera control, Majorera feed restricted and Palmera feed restricted groups). All groups were fed ad libitum; control groups were fed according to lactation needs of adult goats, whereas underfed animals had their diet restricted so that 15-20% reduction of their body weight were attained in the end of the experiment (23 days). Milk samples were collected daily, from the whole available milk, and it was studied the sample from the last day of experience. Mammary gland biopsies were collected in the end of the study. Aqueous fractions were obtained by tissue aqueous/organic extraction [5] and milk serum was obtained by ultra-centrifugation and filtration [6,7]. We collected 1H NMR spectra (1D-NOESY and CPMG) from the aqueous extract of the mammary gland, and the milk serum.

Profiling analysis has led to the identification of 49 metabolites in the aqueous fraction of mammary glands, being the most abundant: lactose, glutamate, glycine and lactate. Preliminary analysis of milk serum samples allow to the identification of 20 metabolites, namely lactose, citrate glycine and taurine as the more abundant. Complete analysis and statistical evaluation of the differences within and between groups is currently being conducted. Key words: Goat, milk production, metabolome, seasonal weight loss, NMR.

RESUMO

O leite de cabra e os seus derivados são recursos nutricionais e económicos de grande importância nas regiões do Mediterrâneo e da África Subsariana [1,2]. No entanto, a produção anual de leite sofre flutuações devido à escassez de pastagem durante o verão, o que leva ao problema da perda de peso sazonal (SWL) [3,4]. O presente trabalho tem como objectivo a identificação de marcadores fisiológicos de tolerância à SWL, em duas raças de cabras leiteiras, com diferentes níveis de tolerância a este problema. Os resultados serão utilizados no desenvolvimento de programas de selecção de raças caprinas de interesse para estas regiões.

Foram estudados, através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), os metabolomas da fracção aquosa da parte secretora da glândula mamária e de soro de leite, em duas raças de cabras leiteiras: uma tolerante a ambientes secos (Majorera) e outra susceptível (Palmera). Os animais, 10 cabras Palmera e 9 cabras Majorera em lactação, foram divididos respectivamente em grupos controlo e sub-alimentados, resultando em 4 grupos (Majorera controlo, Majorera subalimentado, Palmera controlo e Palmera subalimentado). Os grupos controlo foram alimentados de acordo com as necessidades para adultos lactantes, e os grupos sub-alimentados com alimentação restringida por forma a perderem 15-20% do peso vivo no final da experiência (23 dias). As amostras de leite foram colhidas diariamente, a partir do volume total recolhido, tendo sido estudadas as amostras do último dia. As amostras de glândula mamária foram recolhidas por biópsia no final do tempo de experiência. A fracção aquosa de glândula mamária foi obtida por extracção orgânica/aquosa de tecidos [5] e o soro de leite por ultra-centrifugação e filtração [6,7]. Foram adquiridos espectros de 1H-RMN (1D-NOESY e CPMG) a partir da fracção aquosa e do soro.

A análise de perfil metabólico da fracção aquosa de glândula mamária permitiu a identificação de 49 metabolitos, sendo os mais abundantes: lactose, glutamato, glicina e lactato. A análise preliminar das amostras de soro levou à identificação de 20 metabolitos, nomeadamente lactose, citrato, glicina e taurina, como os mais abundantes. A análise metabólica completa e a avaliação estatística com vista à comparação entre grupos está presente em curso.

Palavras-chave: Caprinos, produção de leite, metaboloma, perda de peso sazonal, RMN

References

1. Haenlein GFW. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. J Dairy

- Sci 2001; 84(9):2097-115.
2. Boyazoglu J, Hatziminaoglou I, Morand-Fehr P. The role of the goat in society: past, present and perspectives for the future. *Small Rumin Res* 2005; 60(1-2):13-23.
3. Lamy E, Van Harten S, Sales-Baptista E, Guerra M, Almeida AM. Factors influencing livestock productivity. In: Sejian V, Naqvi SMK, Ezeji T, Lakritz J, Lal R, editors. *Environmental stress and amelioration in livestock production*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 19-51.
4. Cardoso LA, Almeida AM. Seasonal weight loss - an assessment of losses and implications on animal welfare and production in the tropics: Southern Africa and Western Australia as case studies. In: Makkar HPS, editor. *Enhancing Animal welfare and farmer income through strategic animal feeding: FAO Animal Production and Health Paper No. 175*. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO); 2013. p. 37-44.
5. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8):911-7.
6. Lu J, Fernandes EA, Cano AEP, Vinitwatanakun J, Boeren S, Hooijdonk T, Knegsel A, Vervoort j, Hettinga KA. Changes in milk proteome and metabolome associated with dry period length, energy balance, and lactation stage in postparturient dairy cows. *J Proteome Res* 2013; 12(7):3288-96.
7. Sundekilde UK, Poulsen NA, Larsen LB, Bertram HC. Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *J Dairy Sci* 2013; 96(1):290-9.

The potential of saliva in animal physiology, nutrition and welfare studies
O potencial da saliva em estudos sobre a fisiologia, nutrição e bem-estar animal

Elsa Lamy

ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

Email: ecsl@uevora.pt

ABSTRACT

The use of saliva as a source of biomarkers for physiologic and pathologic conditions is a promising approach, mainly due to the great advantage of the non-invasive nature of this fluid. Although saliva study in humans has attracted too much interest, in the last two decades, less has been made in animal saliva. However, some studies are emerging, demonstrating that saliva composition, and particularly salivary proteome contains information about nutritional requirements and adaptations to diet and environment, and also about welfare and health status of animals. One of the major aspects that slowed advances in animal saliva proteomics was the limited amount of animal proteins present in protein databases. Nowadays, this starts to be less problematic, due to the growing in the number of species with sequenced genome.

The present presentation aims to review the different approaches used for the study of saliva proteome in animal and veterinarian sciences, highlighting the areas in which it has been greatly used. **Keywords:** Biomarkers, saliva, animal physiology, nutrition and welfare.

RESUMO

O uso da saliva como uma fonte de biomarcadores para condições fisiológicas e patológicas é uma abordagem promissora, principalmente devido à grande vantagem da natureza não invasiva deste fluido. Embora o estudo da saliva em seres humanos tenha atraído muito atenção nas duas últimas décadas, menos tem sido feito relativamente à saliva de outras espécies animais. No entanto, alguns estudos estão a surgir, demonstrando que a composição da saliva, e particularmente o proteoma salivar, contém informações sobre necessidades nutricionais e adaptações à dieta e ao meio ambiente, e também sobre o bem-estar e estado de saúde dos animais. Um dos principais aspectos que tem limitado os avanços na proteómica salivar dos animais tem sido a quantidade limitada de proteínas animais presentes em bases de dados de proteínas. Hoje em dia, este aspecto torna-se menos problemático, devido ao crescente número de espécies com genoma sequenciado.

A presente apresentação tem como objetivo fazer a revisão das diferentes abordagens utilizadas para o estudo do proteoma da saliva em ciência animal e ciências veterinárias, com destaque para as áreas em que este tem sido mais utilizado.

Palavras-chave: Biomarcadores, saliva, fisiologia animal, nutrição, bem-estar.

tors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Fac-

Salivary biomarkers of ingestion in small ruminants

Biomarcadores salivares de ingestão em pequenos ruminantes

Elsa Lamy^{1,a}, Fernando Capela e Silva^{1,2}, Ana V Coelho³, Elvira Sales Baptista^{1,4}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

2. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

3. Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

4. Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

a Corresponding author: Elsa Lamy, ecsl@uevora.pt

ABSTRACT

Sheep and goat are species of high value in Mediterranean regions, which are almost always maintained in extensive feeding systems. Despite their frequent co-existence in the same pasture areas, they choose plant species with diverse amounts of plant secondary metabolites (PSMs). Among these, the levels of tannins ingested are considerably different when comparing sheep and goats, with these last having the capacity of being more selective, but tolerating higher levels of these compounds.

Several authors focused in digestive differences between these farm animal species suggesting that goat present mechanisms of defence that are not present in sheep. However, concerning salivary proline-rich proteins (PRPs), which have been referred in species such as rodents, or browsers [1] as key compounds of a defence mechanism, controversy exists about their existence in goats. Aiming to clarify such aspect, we compared the salivary proteome of these two small ruminant species, in presence of their regular diet enriched with increasing levels of tannins.

For the breeds greatly used in Alentejo (sheep - merino branco; goat - serpentina), salivary PRPs were not detect, neither constitutively [2,3], neither after tannin-enriched diet consumption [4]. Nevertheless, changes in their salivary proteomes after tannin consumption were observed, suggesting a salivary response of both species to these PSMs [4]. It is interesting to note that, each species constitutive saliva presents a characteristic proteome profile and that their salivary proteins are differently expressed according to food characteristics.

These results, together with recent research [5] show the potential of salivary proteins in animal science studies and suggest the need of deeper studies to elucidate potential functions of salivary proteins differently expressed between species, in order to deepen knowledge on oral food perception and/or choices. Moreover, it is worthwhile to note the potential of salivary proteins as biomarkers of tannin ingestion and possibly of other PSMs.

Keywords: Non-invasive, salivary proteome, tannins, small ruminants, feeding choices.

RESUMO

Ovinos e caprinos são espécies de pequenos rumi-

nantes com elevado valor económico nas regiões do mediterrâneo, as quais são maioritariamente mantidas em regimes alimentares extensivos. Apesar de, frequentemente, co-existirem nas mesmas áreas de pastoreio, ovelhas e cabras diferem em termos dos níveis de metabolitos secundários (PSMs) que ingerem. Destes, os níveis de taninos ingeridos são consideravelmente diferentes, com as cabras a apresentarem uma capacidade de serem mais seletivas, mas tolerando melhor níveis mais elevados destes compostos.

Vários autores focaram-se nas diferenças, entre as duas espécies animais referidas, a nível digestivo, sugerindo que as cabras apresentam mecanismos de defesa que não estão presentes em ovelhas. No entanto, no que diz respeito a proteínas salivares ricas em prolina (PRPs), as quais têm sido referidas como componentes-chave do mecanismo de defesa contra a ingestão destes compostos secundários, e as quais estão presentes em espécies de roedores, ou em espécies de animais com dietas ricas em arbustivas (browsers) [1] existe alguma controvérsia acerca da sua presença na saliva de cabras. Com o objetivo de clarificar este aspeto, comparámos o proteoma salivar das duas espécies de pequenos ruminantes referidas, quer quando na presença da sua dieta regular, quer quando submetidas a uma dieta rica em taninos.

A nível das raças mais frequentemente utilizadas no Alentejo (ovelhas - merino branco; cabras - serpentina) não foi detetada a presença de PRPs, nem de forma constitutiva [2,3] nem induzida pelo consumo de uma dieta com níveis mais elevados de taninos [4]. É interessante notar que, em animais submetidos a uma dieta "regular" a saliva de cada uma das espécies referidas apresenta um perfil proteico característico. Para além disso, as alterações induzidas por exposição a uma dieta rica em taninos são também características de cada uma das espécies [4].

Os resultados apresentados, em conjunto investigação mais recente [5], evidenciam o potencial do estudo da saliva em ciência animal e sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados para elucidar as possíveis funções das proteínas salivares diferencialmente expressas, entre as espécies, de forma a aprofundar o conhecimento acerca da perceção gustativa e escolhas alimentares. Adicionalmente, é de realçar o potencial das proteínas salivares como biomarcadores da ingestão de taninos e, possivelmente de outros PSMs.

Palavras-chave: Não invasivo, proteoma salivar, taninos, pequenos ruminantes, escolhas alimentares.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

References

1. Shimada T. Salivary proteins as a defense against

- dietary tannins. *J Chem Ecol* 2006; 32(6):1149-63.
2. Lamy E, da Costa G, Capela e Silva F, Potes J, Coelho AV, Baptista ES. Comparison of electrophoretic protein profiles from sheep and goat parotid saliva. *J Chem Ecol* 2008; 34(3):388-97.
3. Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E. Sheep and goat saliva proteome analysis: A useful tool for ingestive behavior research? *Physiol Behav* 2009; 98(4):393-401.
4. Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Baptista ES. Effect of condensed tannin ingestion in sheep and goat parotid saliva proteome. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011; 95(3):304-12.
5. de Sousa-Pereira P, Cova M, Abrantes J, Ferreira R, Trindade F, Barros A, Gomes P, Colaço B, Amado F, Esteves PJ, Vitorino R. Cross-species comparison of mammalian saliva using an LC-MALDI based proteomic approach. *Proteomics* 2015; 15(9):1598-607.

Biomarkers of heat tolerance in dairy cows Biomarcadores de tolerância ao calor em vacas de leite

Ana Mira Geraldo¹, Cristina Pinheiro^{1,2}, Flávio Silva³, Liliana Cachucho³, Catarina Matos³, Elsa Lamy¹, Orlando Lopes^{1,4}, Fernando Capela e Silva^{1,4}, Alfredo Pereira^{1,2,a}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002-554, Évora, Portugal

2. Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal

3. Aluno do mestrado em Engenharia Zootécnica, Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal

4. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Portugal

a Corresponding author: Alfredo Pereira, apereira@uevora.pt

ABSTRACT

High temperatures, present during the hot and dry summers in Mediterranean climate, severely impairs animal's performance, particularly in animals of high genetic merit. Animals best adapted to loss heat without decreasing metabolism can allow the best production in this region. It is important to have non-invasive biomarkers that allow the selection of the animals best adapted with the higher productions. Although often referred, blood cortisol does not allow a full understanding of heat stress, due to its circadian cycle and because the confounding with other types of stress. In the same way, salivary cortisol, which starts to be used as a non-invasive way of measuring this metabolite, also present the referred limitations [1]. More recently, several studies suggest the use of heat shock proteins (HSP) as heat stress biomarkers [2-4]. Consequently, new and better non-invasive methods that allow the assessment of heat tolerance and performance are needed. The hair, milk or saliva fulfil these requirements. Salivary proteins have been extensively studied in humans, due to their potential as non-invasive biomarkers of pathology and physiology and in the last years, research emerged demonstrating the value of saliva in farm animal studies [5]. Based on previous line of research, on ruminant salivary proteome [6] and heat stress [4], we are developing studies to search for salivary, hair and milk biomarkers of heat tolerance, namely HSP70, associated to the production potential and to compare them with other well-known physiological (rectal temperature, respiratory and sweating rates, and hemogram) and endocrine indicators (T3, T4 and prolactin). An experiment was performed with dairy cows with high vs low productivities (6 animals of each group) observed at three different acclimation time points: first, during summer, under hot temperatures; second, under thermoneutrality; and third, during winter, under low temperatures. Hair, skin, milk and saliva samples were collected at each of these points. Samples are being analysed through proteomic technics, as well as using light and electronic microscopy.

Keywords: Biomarkers, dairy, hair, heat tolerance, milk, saliva.

RESUMO

As elevadas temperaturas que se fazem sentir du-

rante os verões quentes e secos em clima Mediterrânico, prejudicam severamente o desempenho do animal, especialmente em animais de elevado potencial genético. Animais melhor adaptados à perda de calor sem diminuição do metabolismo podem permitir uma melhoria na produção nesta região. É importante ter biomarcadores não-invasivos que permitam a selecção dos animais melhor adaptados e com as produções mais elevadas. Embora muitas vezes referido, o cortisol sanguíneo não permite uma compreensão completa do stress térmico, devido ao seu ciclo circadiano e porque está relacionado com outros tipos de stress. Da mesma forma, o cortisol salivar, que começa a ser utilizado como uma forma não-invasiva de medir este metabolito, também apresenta as limitações mencionadas [1]. Mais recentemente, vários estudos sugerem o uso de proteínas de choque térmico (HSP) como biomarcadores de stress térmico [2-4]. Por conseguinte, são necessários novos e melhores métodos não-invasivos, que permitam a avaliação da tolerância ao calor e o desempenho do animal. O pêlo, leite ou saliva cumprem estes requisitos. No caso da saliva, as proteínas têm sido amplamente estudadas em seres humanos devido ao seu potencial como biomarcadores não-invasivos de patologia e fisiologia, e nos últimos anos, a pesquisa surgiu demonstrando o valor deste fluido em estudos com animais de produção [5]. Com base na linha da pesquisa anterior, em proteoma salivar de ruminantes [6] e stress por calor [4], estamos a desenvolver estudos para identificar biomarcadores de tolerância ao calor, nomeadamente HSP70, na saliva, pêlo e leite, associado ao potencial de produção do animal, e compará-los com indicadores fisiológicos (temperatura rectal, frequência respiratória, taxa de sudorese e hemograma) e indicadores endócrinos (T3, T4 e prolactina) bem conhecidos. Foi realizado um experimento com vacas leiteiras de alta vs baixa produtividade (6 animais de cada grupo) observadas em três momentos de aclimação diferentes: primeiro durante o verão, com temperaturas quentes; em segundo em condições de termoneutralidade; e terceiro, durante o inverno, sob baixas temperaturas. Foram colectadas amostras de pêlo, pele, leite e saliva, em cada um desses períodos. As amostras estão a ser analisadas através de técnicas proteómicas, bem como através de microscopia óptica e eletrónica.

Palavras-chaves: Biomarcadores, leite, pêlo, saliva, tolerância ao calor, vacas de leite.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

References

1. Hellhammer DH, Wüst S, Kudiella BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34(2):163-71.
2. Sørensen JG. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and ex-

posure to stress in natural populations. *Curr Zool* 2010; 56(6):703-13.

3. Sharma GT, Nath A, Prasad S, Singhal S, Singh N, Gade NE, Dubey PK, Saikumar G. Expression and characterization of constitutive heat shock protein 70.1 (HSPA1A) gene in vitro produced and in vivo-derived buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim* 2012; 47(6):975-83.

4. Gaughan JB, Bonner SL, Loxton I, Mader TL. Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *J Anim Sci* 2013; 91(1):120-9.

5. Lamy E, Mau, M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *J Proteomics* 2012; 75(14):4251-8.

6. Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E. Sheep and goat saliva proteome analysis: A useful tool for ingestive behavior research? *Physiol Behav* 2009; 98(4):393-401.

Non-invasive biomarkers of welfare and performance in endurance horses
Biomarcadores não invasivos de bem-estar e performance em cavalos de endurance

Monica Mira^{1,2}, Mafalda Pardal³, Marco Lopes⁴, Elsa Lamy¹, Rute Santos^{1,5,a}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

2. Aluno do doutoramento em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Portugal

3. Aluno do Mestrado integrado em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Portugal

4. University of Missouri, USA

5. Instituto Politécnico de Portalegre, Elvas, Portugal

a Corresponding author: Rute Santos, rutesantos@esaelvas.pt

ABSTRACT

Equine endurance is the fastest growing equestrian sport regulated worldwide by the Fédération Equestre Internationale (FEI). The fast growth in horse speed at endurance competitions is a major source of concerns regarding the welfare of horses and riders. Despite the mandatory veterinary examinations during the competitions and high elimination rates due to lameness and metabolic derangements, the incidence of catastrophic injuries, such as severe fractures and metabolic fatalities is rising [1]. The existence of objective and non-invasive biomarkers of welfare and performance is mandatory to achieve the maximum results maintaining welfare and horse integrity. Stress biomarkers, such as salivary cortisol has started to be used by other authors [2]. Nevertheless, and despite its usefulness, the evaluation of stress based only in cortisol levels present limitations, since these are influenced by circadian cycle and other types of stress [3].

In a preliminary study, we investigated the value of salivary cortisol as a non-invasive biomarker of welfare and performance in 40km and 80km controlled speed endurance ridings. Saliva collection (using Salivettes®, STARSTED, Germany) was performed at home (resting), before the beginning of the competition and at each vetgate. Salivary cortisol was assessed through an ELISA technique. A positive correlation between salivary cortisol levels, at each vet gate, and the final speed was observed. Salivary cortisol levels before the race were also negatively correlated to the recovery time. Nevertheless, the value of cortisol levels as marker of performance, at each point, is dependent of the assessment on the animal basal salivary cortisol levels. In conclusion, this first study confirms the value of salivary cortisol, but also limitations in its use in a practical way during a race. Therefore other non-invasive tools to assess welfare and performance during endurance races are warranted. We propose to study the value of salivary proteins, ocular temperature (using infrared thermography) and lameness (using a portable inertial sensor based system) as objective and non-invasive methods to identify horses at risk of developing serious health derangements during endurance competitions.

Keywords: Non-invasive, saliva, ocular tempera-

ture, lameness, endurance horses.

RESUMO

A resistência equestre é a modalidade equestre, regulada pela Fédération Equestre Internationale (FEI), que tem registado maior crescimento nos últimos anos. Os aumentos sucessivos das velocidades atingidas pelos cavalos nas competições tem sido um motivo de preocupação crescente relativamente ao bem-estar dos cavalos e cavaleiros. Apesar dos exames veterinários obrigatórios durante as competições e das elevadas taxas de eliminação por claudicação e problemas metabólicos, a incidência de lesões, tais como fraturas severas e fatalidades de origem metabólica, tem vindo a aumentar [1]. Para alcançar os máximos resultados, mantendo o bem-estar e a integridade do cavalo, a existência de biomarcadores não-invasivos e objetivos de bem-estar e performance é mandatória. Biomarcadores de stress, tais como o cortisol salivar, já foram utilizados por outros autores [2]. No entanto, e apesar da sua utilidade, a avaliação de stress baseada apenas nos níveis de cortisol apresenta limitações, uma vez que estes são influenciados pelo ritmo circadiano e por outros tipos de stress [3].

Num estudo preliminar, investigámos o valor do cortisol salivar como marcador não-invasivo do bem-estar e performance em provas de resistência equestre de 40 e 80 km com velocidade controlada. As recolhas de saliva (utilizando Salivettes, STARSTED, Alemanha) foram efetuadas em casa (repouso), antes do início da prova e em cada grelha veterinária. Os níveis de cortisol salivar foram avaliados através da técnica de ELISA. Observou-se uma correlação positiva entre os níveis de cortisol salivar e a velocidade final, em cada grelha veterinária. Os níveis de cortisol salivar antes da prova estão negativamente correlacionados com o tempo de recuperação. No entanto, o valor dos níveis de cortisol salivar, como marcadores de performance, em cada ponto, depende dos níveis basais de cortisol de cada animal. Em conclusão, este primeiro estudo confirma o valor do cortisol salivar, mas também as suas limitações na sua utilização no contexto de prova. Assim, há a necessidade de pesquisar novas ferramentas objetivas e não-invasivas. Consequentemente, propomos estudar o valor da utilização de proteínas salivares, temperatura ocular (utilizando a termografia por infravermelhos) e a avaliação da locomoção com um sistema portátil baseado em sensores de inércia, como métodos identificação de cavalos em risco de desenvolver problemas de saúde sérios durante as competições.

Palavras-chave: Não-invasivo, saliva, temperatura ocular, claudicação, cavalos de endurance.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

References

1. Coombs SL, Fisher RJ. Endurance riding in 2012: too far too fast? *Vet J* 2012; 194(3):270-1.
2. Peeters M, Closson C, Beckers J-F, Vandenhede M. Rider and horse salivary cortisol levels during competition and impact on performance. *J Equine Vet Sci* 2013; 33(3):155-60.
3. Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34(2):163-71.

Chronic stress in sheep: cortisol as a biological marker for welfare assessment

Stress crónico em ovinos: o cortisol como marcador biológico para a avaliação do bem-estar

Elvira Sales Baptista^{1,2,a}, Rita Marques³, Elsa Lamy¹, Ana Costa^{1,4}, Fátima Baptista^{1,5}, Lopes de Castro^{1,2}

1. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

2. Departamento de Zootecnia, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

3. Mestrado em Engenharia Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

4. Departamento de Química, Universidade de Évora, Évora, Portugal

5. Departamento de Engenharia Rural, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

a Corresponding author: Elvira Sales Baptista, elsaba@uevora.pt

ABSTRACT

Grazing sheep in extensive systems are submitted to numerous stress factors of diverse strength and duration. One important chronic stress condition emerge from severe dietary restrictions, a frequent scenario in the Mediterranean basin that can be extended for almost half a year [1]. As a consequence of hot and dry summers and irregular autumn precipitation levels, natural pastures undergo sharp seasonal changes of both biomass production and nutritive value.

The main objective of this work is to test if the concentration of cortisol (salivary and plasmatic) can be used as a biomarker of chronic stress, providing an important tool for control of animal welfare in extensive grazing systems. In a preliminary study, carried out in the environmental controlled room at the experimental animal facility of the University of Évora, we induced chronic stress in 12 pregnant ewes during a two month period, both environmental (high temperature and humidity) and nutritional (dietary restriction during pregnancy), to determine if cortisol is a relevant indicator of chronic stress. Air temperature and relative humidity were recorded continuously and were used to set up two environmental conditions according to the temperature and humidity index (<25 vs. >25 THI). Ewes were divided in two groups, according to the dietary restriction level (20 g/ kg0.75 vs 50g/ kg0.75). Saliva and blood samples were collected on four occasions during the experimental period, always at the same time (10:00h). Environmental stressors increased cortisol levels on both plasma (28.36 vs. 31.90 ng/ml) and saliva (1.72 vs 2.10 ng/ml), however the nutritional stress induced by higher dietary restriction decreased both cortisol plasmatic levels (35.36 vs. 25.12 ng/ml) and salivary levels (2.23 vs 1.62 ng/ml). Associated with the huge individual variability (CV = 46%), a significant correlation between plasmatic and salivary cortisol was not found ($r = 0.35$). We conclude that cortisol may be up or below pre-stress levels during chronic stress, but the response varies with different stressors. Cortisol is a prospective biomarker of sheep chronic stress in grazing systems, although the existence of many sources of chronic stress in the management of

sheep suggests that cortisol should be coupled with other behavioural and physiological data.

Keywords: Salivary cortisol, plasmatic cortisol, heat stress, nutritional stress, grazing systems

RESUMO

Os ovinos criados em sistemas de pastoreio extensivo encontram-se sujeitos a numerosos factores de stress, de variada intensidade e duração. Um deles está ligado a períodos de restrição alimentar, que é um cenário frequente na bacia do Mediterrâneo, e que pode ser prolongado por quase meio ano [1]. Como consequência dos verões quentes e secos e dos níveis de precipitação irregulares, que podem ocorrer durante o outono, as pastagens naturais sofrem variações sazonais acentuadas, tanto na produção de biomassa como no seu valor nutritivo.

O principal objetivo deste trabalho é testar se a concentração de cortisol (salivar e plasmático) pode ser usado como um biomarcador de stress crónico, fornecendo uma ferramenta importante para o controle do bem-estar animal em sistemas de pastoreio extensivo. Para tal realizou-se um estudo preliminar, que decorreu numa sala de ambiente controlado na Universidade de Évora. Para determinar se o cortisol pode ser um indicador relevante de stress crónico, submetemos durante 2 meses um grupo de 12 ovelhas gestantes, a stressores ambientais (temperatura e humidade relativas altas) e nutricionais (restrição alimentar durante a gestação). A temperatura do ar e humidade relativa foram registados continuamente e foram usados para configurar duas condições ambientais de acordo com o índice de temperatura e humidade (<25 vs. >25 THI). As ovelhas foram divididas em dois grupos, de acordo com o nível de restrição alimentar (20 g/kg0,75 vs 50g/kg0,75). As amostras de saliva e sangue foram recolhidas em quatro ocasiões durante o período experimental, sempre à mesma hora. As condições ambientais mais adversas aumentaram os níveis de cortisol tanto no plasma (28,36 vs 31,90 ng/ml) como na saliva (1,72 vs 2,10 ng/ml), no entanto, o stress nutricional induzido pela restrição dietética mais elevada diminuiu quer os níveis plasmáticos de cortisol (35,36 vs 25,12 ng/ml) quer os níveis salivares (2,23 vs 1,62 ng/ml). Associado com a enorme variabilidade individual (CV=46%), não foi encontrada uma correlação significativa entre o cortisol plasmático e salivar ($r = 0,35$). Conclui-se que durante situações de stress crónico em ovinos, o cortisol pode estar quer elevado quer diminuído, em relação aos níveis de pré-stress, variando a resposta de acordo com os diferentes factores de stress. Apesar disso o cortisol é um biomarcador prospectivo para o stress crónico de ovinos em sistemas extensivos, mas deverá ser conjugado com outros dados comportamentais e fisiológicos. **Palavras-chave:** Cortisol salivar, cortisol plasmático, stress por calor, stress nutricional, sistemas de pastoreio.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and

PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

References

1. Goddard P, Waterhouse T, Dwyer C, Stott A. The perception of the welfare of sheep in extensive systems. *Small Rumin Res* 2006; 62(3):215-25.

Salivary markers of oral food perception: studies in humans and potential use for animal production

Marcadores salivares de percepção oral: estudos em humanos e potencial uso em produção animal

Lénia Rodrigues¹, Cristina Conceição Pinheiro^{1,2}, Francisco Amado^{3,4}, Elsa Lamy^{1,a}

1. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Portugal

2. Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal

3. Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares (QOPNA), Universidade de Aveiro, Portugal

4. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

a Corresponding author: Elsa Lamy, ecsl@uevora.pt

ABSTRACT

Inter-individual variability in taste sensitivity is well known in humans and has been considered a factor contributing to different food acceptances and different dietary choices. Besides the genetic factors having a recognized role, they do not completely explain the inter-individual differences and the influence of peri-receptor events is one possibility [1]. Since saliva is the main component of the external environment of taste receptor cells, this fluid may have a decisive role in taste perception. Consequently, its study deserves attention. Our recent studies in humans present evidences of differences in salivary protein profiles according to individual sensitivities, with salivary carbonic anhydrase VI and cystatin SN being proteins with a probable involvement in bitter taste perception (Rodrigues et al., in preparation).

Despite the importance of palatability in animal food choices, few is known about within-species variation in taste sensitivity. The presence of bitter taste receptors, in farm animals, which are common to humans [2], suggest that the mechanisms involved in taste perception may present similarities. Additionally, one of the proteins widely referred as being related to taste – CA VI – had also been identified in farm animals [3] also reinforces the hypothesis of saliva having similar contributes, in human and animals, to oral taste perception. Recent studies present information about farm animal salivary protein composition [3-5]. Based on what has been stated above, it would be important, in the future, to investigate the salivary proteins that can be involved, and act as biomarkers animal taste sensitivity. Such an information can be useful for nutritional management of farm animals.

Keywords: Carbonic anhydrase VI, cystatin SN, salivary proteome, taste sensitivity.

RESUMO

A variabilidade gustativa, em humanos, é uma característica bem conhecida e tem sido considerada como um fator que contribui para as diferentes aceitações e preferências de alimentos. Apesar da contribuição de fatores genéticos ser conhecida, esta não explica completamente as diferenças

inter-individuais, sendo de considerar também a influência de fatores relacionados com o ambiente envolvente dos recetores gustativos [1]. Sendo a saliva o principal constituinte do ambiente exterior das células recetoras do gosto, este pode ter um papel decisivo na percepção gustativa, pelo que o seu estudo é merecedor de atenção. Estudos recentes, da nossa equipa, evidenciam diferenças no perfil proteico salivar, em função da sensibilidade para o gosto amargo. A anidrase carbónica VI e a cistatina SN são proteínas potencialmente envolvidas na percepção do gosto amargo (Rodrigues et al., em preparação).

Apesar da importância da palatabilidade nas escolhas alimentares dos animais, pouco é conhecido acerca das variações na sensibilidade gustativa entre animais da mesma espécie. A presença de recetores de amargo, em animais de interesse pecuário, comuns aos conhecidos em humanos [2], sugere que os mecanismos envolvidos na percepção gustativa podem ser semelhantes. Por outro lado, o facto de uma das proteínas mais referida como associada ao gosto – CA VI – também ter sido identificada nesses animais [3] vem ainda reforçar a hipótese de que a saliva pode ter um contributo para a percepção gustativa semelhante em humanos e animais. Estudos recentes apresentam informação acerca da composição proteica da saliva, de diferentes espécies animais, a qual pode estar associada a diferentes hábitos alimentares [3-5]. No entanto, não há estudos que atestem a relação entre os perfis salivares e a percepção do gosto. Assim, seria importante, no futuro, avaliar quais as proteínas salivares que podem estar envolvidas (servir como biomarcadores) na sensibilidade gustativa de animais de produção. Essa informação poderá ser valiosa para o manejo nutricional dos animais.

Palavras-chave: Anidrase carbónica VI, cistatina SN, proteoma salivar, sensibilidade gustativa.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

References

1. Genick UK, Kutalik Z, Ledda M, Destito MC, Souza MM, Cirillo CA, Godinot N, Martin N, Morya E, Sameshima K, Bergmann S, le Coutre J. Sensitivity of genome-wide-association signals to phenotyping strategy: the PROP-TAS2R38 taste association as a benchmark. *PLoS One* 2011; 6(11):e27745. doi:10.1371/journal.pone.0027745.
2. Ferreira AM, Araújo SS, Sales-Baptista E, Almeida AM. Identification of novel genes for bitter taste receptors in sheep (*Ovis aries*). *Animal*. 2013; 7(4):547-54.
3. Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela E Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Sales Baptista E. Sheep and goat saliva proteome analysis: a useful tool for ingestive behavior research? *Physiol Behav* 2009; 98(4):393-401.
4. Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F,

Potes J, Pereira A, Coelho AV, Baptista ES. Effect of condensed tannin ingestion in sheep and goat parotid saliva proteome. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011; 95(3):304-12.

5. de Sousa-Pereira P, Cova M, Abrantes J, Ferreira R, Trindade F, Barros A, Gomes P, Colaço B, Amado F, Esteves PJ, Vitorino R. Cross-species comparison of mammalian saliva using an LC-MALDI based proteomic approach. *Proteomics*. 2015; 15(9):1598-607.

Biomarkers of heat stress in dairy cattle: hemogram analysis**Biomarcadores de stresse térmico em vacas de leite: análise do hemograma**

Flávio Silva¹, Liliana Cachucho¹, Catarina Matos¹, João Fragoso, Ana Mira Geraldo², Cristina Pinheiro^{2,3}, Elsa Lamy², Fernando Capela e Silva^{2,4}, Alfredo Pereira^{2,3,a}

1. Aluno do Mestrado em Engenharia Zootécnica, Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal

2. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002-554, Évora, Portugal

3. Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal

4. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Portugal

a Corresponding author: Alfredo Pereira, apereira@uevora.pt

ABSTRACT

High temperatures can greatly affect milk production. Animals with efficient thermolysis mechanisms can maintain higher productions in climates with high temperatures and low humidity, similar to what occurs in Mediterranean region summers. As such, the identification of animals with such potential is valuable. Among the diverse forms of evaluation, changes in hematologic parameters allow to evaluate the consequences of heat stress, acting as biomarkers [1-3]. Cortisol is also frequently used to evaluate heat stress consequences, but this parameter presents several limitations. Since it presents a nictemeral rhythm, the basal values differ among individuals and the values differ according to the transition to heat stress being fast or slow, according to heat stress being chronic or acute. Additionally, the values obtained can be the same as the ones obtained for stress produced by other type of agents. Changes in cellular responses, namely in the levels of heat shock proteins (HSPs), hemogram and in the levels of thyroid hormones T3, T4 and prolactin, can be more adequate to characterize heat stress conditions. Rectal temperature is the variable with high confidence to identify heat storage and the inherent efficacy of the thermolytic pathways during the periods of heat stress [4]. According to Martello (2004) [5], the regular rectal temperature is about 38.3°C. Nevertheless, there is some individual variability [6].

The aim of the present work was to identify serum biomarkers of acclimation. Seven Holstein-Frisian cows (three low and four high producing) were tested in two different acclimation periods: Summer (P1) and Winter (P2). Rectal temperature was measured during 4 days, in each period, with three measurements per day (08h, 13h and 18h). At the end of each period, blood samples were collected for hemogram. It was observed an increase in rectal temperature in P1 comparatively to P2 (39,0°C ± 0,4 vs. 38,0°C ± 0,2, respectively). Hematocrit levels were lower in most of the animals, in P1. The mean concentration of globular haemoglobin (C.H.G.M.) was elevated in both periods, but significantly higher in P1 comparatively to P2 (43.5 g/dL vs 36,1 g/dL, respectively). Nevertheless, the values of haemoglobin did not present differences

between periods and were in the range of physiologically normal values. The reduction in the haematocrit could be explained by a possible hemodilution. In these conditions, it exists an increased water consumption due to the need of this for evaporative thermolysis and also due to its effect in heat transfer through mass transfer. These results present evidences that blood parameter can be useful biomarkers of heat stress.

Keywords: Biomarkers, dairy cattle, heat tolerance, blood, hemogram.

RESUMO

As altas temperaturas presentes durante os verões quentes e secos, característicos do clima mediterrânico, prejudicam severamente o desempenho dos animais, especialmente em animais de alto potencial genético. Assim, animais com mecanismos de termólise mais eficientes conseguem manter melhores produções nesta região. Existem diversas formas de identificar estes animais. As alterações nos parâmetros hematológicos permitem avaliar as consequências do stresse térmico, funcionando como marcador biológico de stresse térmico (HS) [1-3]. O cortisol é frequentemente monitorizado para avaliar as consequências do stresse térmico, porém este apresenta algumas limitações, uma vez que apresenta um ritmo nictemeral, os valores basais são diferentes e entre indivíduos, apresenta variações diferentes consoante a transição para o stresse térmico é rápida ou lenta se o stresse térmico é agudo ou crónico e ainda pode ser confundido com outros tipos de stresse. Todavia, existem alterações nas respostas celulares designadamente nas proteínas de choque térmico (HSP), no hemograma e nas hormonas T3, T4 e a prolactina, que podem ser mais adequadas para caracterizar as condições de stresse térmico. A temperatura retal é a variável mais fiável para identificar os armazenamentos de calor e a inerente eficácia das vias termolíticas durante os períodos de stresse térmico [4]. Segundo Martello (2004) [5], a temperatura retal considerada normal é cerca de 38,3°C. Em todo o caso, os bovinos tendem a apresentar alguma variabilidade individual nos valores basais da temperatura retal [6].

O objetivo deste trabalho foi identificar potenciais marcadores biológicos em vacas leiteiras em resposta a diferentes níveis de aclimação. Foram utilizadas sete vacas Holstein-Frisian (três baixas produtoras e quatro altas produtoras de leite) em dois períodos de aclimação diferentes: Verão (P1) e Inverno (P2). Foram avaliados valores da temperatura retal durante 4 dias em cada período, três medições por dia (08h, 13h e 18h). No final de cada um destes períodos foram recolhidas amostras sanguíneas de cada animal para posterior elaboração de um hemograma. Observou-se valores médios de TR superiores no P1 relativamente a P2 (39,0°C ± 0,4 e 38,0°C ± 0,2, respetivamente). Verificaram-se valores de hematócrito inferiores na maioria dos animais no P1. A concentração média de hemoglobina globular (C.H.G.M.) foi elevada em ambos os períodos, mas foi bastante superior em P1 do que em P2 (43,5 g/dL vs. 36,1 g/dL, respetivamente). Contudo, os valores de hemoglobina não apresentaram diferenças entre períodos e mantiveram-se dentro dos valores fisiologicamente normais. A diminuição do hematócrito poderá ser explicada devido à provável hemodiluição. Nestas

condições ocorre um exagerado consumo de água devido à maior necessidade desta para a termólise evaporativa e também devido ao seu efeito na transferência de calor por transferência de massa. Estes resultados evidenciam que a avaliação de parâmetros sanguíneos poderá ser utilizada como indicador de stresse térmico.

Palavras-chave: Biomarcadores, vacas de leite, tolerância ao calor, sangue, hemograma.

Acknowledgements

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Authors acknowledge also the financial support from the Portuguese Science Foundation (FCT) in the form of Elsa Lamy FCT investigator contract IF/01778/2013.

References

1. Singh SP, Newton WM. Acclimation of young calves to high temperatures: composition of blood and skin secretions. *Am J Vet Res* 1978; 39(5):799-801.
2. Pereira AMF, Baccari Jr F, Titto EAL, Almeida JAA. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. *Int J Biometeorol* 2008; 52(3):199-208.
3. Cwynar P, Kolacz R, Czerski A. Effect of heat stress on physiological parameters and blood composition in Polish Merino rams. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014; 127(5-6):177-82.
4. Pereira AMF. Adaptação ao ambiente geofísico mediterrânico de bovinos nativos e exóticos - tolerância ao calor [PhD dissertation, in portuguese], Universidade de Évora, Portugal; 2004.
5. Martello LS, Júnior HS, Luz e Silva S, Titto EAL. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *R Bras Zoot* 2004; 33(1):181-91.
6. Finch VA. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *J Anim Sci* 1986; 62(2):531-42.

Descriptive and morphometric analysis of renal structures in tench (*Tinca tinca*) after exposure to 17 alpha-ethynylestradiol

Análise descritiva e morfométrica das estruturas renais na tenca (*Tinca tinca*) após exposição a 17 alfa-etinilestradiol

Ana-Lourdes Oropesa Jiménez^{1,a}, Blanca Jiménez Casares¹, Jesús Cuesta², César Fallola Sánchez-Herrera³, Luís Gómez Gordo²

1. Toxicology Area, Animal Health Department, Sciences Faculty, University of Extremadura, Badajoz, Spain

2. Anatomopathology Area, School of Veterinary Medicine, University of Extremadura, Cáceres, Spain

3. Aquaculture Center. Dirección General de Medio Natural. Junta de Extremadura. Villafranco del Gadiana, Badajoz, Spain

a Corresponding author: Ana-Lourdes Oropesa Jiménez, aoropesa@unex.es

ABSTRACT

17-alpha-ethynylestradiol (EE2) is one of the most ubiquitous emergent contaminant found in aquatic environments [1,2]. It is used like a component of combined oral contraceptives and also for the treatment of menopausal and post menopausal symptoms. Alterations on the structure of the excretory system of the kidney were studied in tench (*Tinca tinca*) exposed to sub-lethal doses of EE2 (50, 100 and 500 µg/kg t.w) under semi-static conditions for 30 days. Kidneys from 70 adult tench were collected, processed with routine light histology and a descriptive and morphometric analysis was performed. Histopathological lesions in the excretory system of the kidney of exposed fish were: dilation of glomerular capillaries and increase in the area of the renal corpuscle, hyaline degeneration in the epithelial cells of the proximal tubules leading to necrotic changes, haemorrhages in the interstitial tissue and deposits of eosinophilic material. These lesions were observed with a greater degree of severity as the exposure doses were increased. Our results provide evidence about the negative effects of EE2 on the excretory system of the kidney in tench and consequently on their physiological functions.

Keywords: 17-alpha-ethynylestradiol, histopathology, kidney, *Tinca tinca*.

RESUMO

O 17-alfa-etinilestradiol (EE2) é um dos contaminantes emergentes encontrados com mais frequência nos ambientes aquáticos [1,2]. É usado como componente de contraceptivos orais e também no tratamento de sintomas menopáusicos e da pós-menopausa. Foram estudadas as alterações na estrutura do sistema excretor do rim de tencas (*Tinca tinca*) expostas a doses sub-letais de EE2 (50, 100 and 500 µg/kg p.t.), sob condições semi-estáticas durante 30 dias. Os rins de 70 tencas adultas foram recolhidos, processados por técnicas histológicas de rotina para microscopia fotônica, após o que foi feita a sua análise descritiva e morfométrica. As lesões histopatológicas no sistema excretor do rim dos peixes expostos, foram: dilatação dos capilares glomerulares e aumento da área do corpúsculo renal, degeneração hialina das células epiteliais dos túbulos proximais, levando a

alterações necróticas, hemorragias no tecido intersticial e depósitos de material eosinofílico. O grau de severidade das lesões observadas aumentou com o incremento da dose de exposição. Os nossos resultados evidenciam os efeitos negativos do EE2 nos rins da tenca e, consequentemente, nas suas funções fisiológicas.

Palavras-chave: 17-alfa-etinilestradiol, histopatologia, rim, *Tinca tinca*.

References

1. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 1999; 225(1-2):81-90.
2. Zhang X, Li QZ, Li GX, Wang ZS, Yan CZ. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. *Mar Pollut Bull* 2009; 58(8):1210-6.

Can the disruptor endocrine agent 17-alpha-ethynylestradiol cause alterations on sperm quality of tench (*Tinca tinca*)?

Pode o agente disruptor endócrino 17-alfa-etinilestradiol causar alterações na qualidade do sémen de tencas (*Tinca tinca*)?

Palavras-chave: 17-alfa-etinilestradiol, sémen, testículos, *Tinca tinca*.

Ana-Lourdes Oropesa Jiménez^{1,a}, David Martín-Hidalgo², César Fallola Sánchez-Herrera³, María Cruz Gil Anaya²

1. Toxicology Area, Animal Health Department, Sciences Faculty, University of Extremadura, Badajoz, Spain

2. Animal Medicine Department, School of Veterinary Medicine, University of Extremadura, Cáceres, Spain

3. Aquaculture Center. Dirección General de Medio Natural. Junta de Extremadura. Villafranco del Guadiana, Badajoz, Spain

a Corresponding author: Ana-Lourdes Oropesa Jiménez, aoropesa@unex.es

ABSTRACT

17-alpha-ethynylestradiol (EE2) is one of the most potent endocrine disruptor compounds. It is used like a component of combined oral contraceptives and also for the treatment of menopausal and post-menopausal symptoms. Alterations of sperm quality were studied in tench exposed to sub-lethal doses of EE2 (50, 100 and 500 µg/kg t.w) under semi-static conditions for 30 days. Thus, different biomarkers of sperm quality were assessed: concentration and volume of ejaculate, total number of spermatozoa, percentage of motile spermatozoa and sperm motility. The most relevant alterations observed were significant reductions in the reproductive parameters such as spermatozoa concentration, straight line velocity, curvilinear velocity, average path velocity and wobble in tench exposed to 50 µg/kg t.w. of EE2. These changes were not dependent dose, but our results provide evidence about the negative effects of EE2 on the sperm quality in tench.

Keywords: 17-alpha-ethynylestradiol, sperm, testes, *Tinca tinca*.

RESUMO

O 17-alfa-etinilestradiol (EE2) é um dos mais potentes disruptores endócrinos. É usado como componente de contraceptivos orais e também no tratamento de sintomas menopáusicos e da pós-menopausa. Foram estudadas as alterações da qualidade do sémen de tencas expostas a doses sub-letais de EE2 (50, 100 and 500 µg/kg p.t.), sob condições semi-estáticas durante 30 dias. Os biomarcadores da qualidade do sémen avaliados foram: concentração e volume do ejaculado, número total de espermatozoides, percentagem de espermatozoides móveis e motilidade espermática. As alterações mais relevantes observadas nas tencas expostas à dose de 50 µg/kg p.t. de EE2 foram reduções significativas nos seguintes parâmetros reprodutivos: concentração de espermatozoides, velocidade em linha recta, velocidade curvilínea, velocidade média do trajeto e índice de oscilação. Estas alterações não foram dependentes da dose, mas os nossos resultados evidenciam os efeitos negativos do EE2 na qualidade do semen da tencas.

Biomarkers and toxicological evaluation of Lavandula essential oils

Biomarcadores e avaliação toxicológica de óleos essenciais de Lavandula spp.

Sílvia Arantes^{1,2}, M. Fátima Candeias^{1,2}, Andreia Piçarra^{1,2}, Orlando Lopes^{1,3}, Mónica Lima^{1,3}, Marízia Pereira^{1,4}, Júlio Cruz-Moraes¹, M. Rosário Martins^{1,2,a}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

2. Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

3. Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

4. Departamento de Planeamento, Ambiente e Ordenamento, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

a Corresponding author: M. Rosário Martins, mrm@uevora.pt

ABSTRACT

Lavenders belong to the family Labiatae and are one of the most popular aromatic plants widely used in food industry, perfumery and pharmaceutical preparations. Their oils are traditionally believed to be antibacterial, antifungal, carminative, sedative, antidepressive, disinfectant, and effective for burns and insect bites [1]. Previous studies have shown that the essential oils of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (*L. luisieri*) and *Lavandula viridis* L'Hér have a broad-spectrum antimicrobial activity [2].

In present work we have developed a set of studies in vivo, using animal model, in order to evaluate the toxicological properties of essential oils (EOs) of two aromatic plants endemic of south of Portugal, namely *L. luisieri* from Alentejo and *L. viridis* from Algarve. EOs were obtained from aerial part of plants by hydrodistillation and chemical composition was evaluated by GC-FID. Acute toxicity (LD50) was determined in Swiss mice according to Up-and-Down OECD procedure [3] and oral toxicity assays were performed based on hippocratic screening during 14 days [4], as required by the Direção Geral de Veterinária and FELASA. Histological analyses of the liver and kidney, as well as quantification of biomarkers: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyltransferase (γ -GT), creatinine and urea were performed. The main components of *L. luisieri* EO were 1,8-cineol, trans- α -necrodyl acetate, lavandulol and trans- α -necrodol, while *L. viridis* EO was rich in 1,8-cineol, camphor and linalool. EOs of *L. luisieri* and *L. viridis* showed low toxicity in Swiss mice (LD50 values $\gg$ 2000 mg/kg), with no clinical symptoms. The histological examination of the liver and kidney tissues in combination with analysis of functional biomarkers, such as serum AST, ALT, ALP and γ -GT activities and urea and creatinine serum/urine levels allowed to screening the possible toxic effects and monitor the liver and kidney functions. Results suggest the potential use of essential oils

of *Lavandula* as nutraceutical and/or medicinal agent, however further investigations are required in order to define a safety use dose.

Keywords: *Lavandula luisieri*, *Lavandula viridis*, essential oil, chemical composition, toxicological evaluation, biochemical biomarkers.

RESUMO

As plantas aromáticas do género *Lavandula*, da família das Labiatae são muito utilizadas na indústria alimentar e farmacêutica. Os óleos essenciais (OEs) destas plantas são utilizados na medicina tradicional como antibacterianos, antifúngicos, cicatrizantes, sedativos, antidepressivos e desinfetantes [1]. Alguns estudos referem que os OEs de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (*L. luisieri*) e *Lavandula viridis* L'Hér apresentam um largo espectro de atividade antimicrobiana [2].

Neste trabalho desenvolvemos estudos in vivo, utilizando o modelo animal, com vista a avaliar as propriedades toxicológicas dos OEs de duas espécies aromáticas endémicas do sul de Portugal, *L. luisieri* (Alentejo) e *L. viridis* (Algarve). Os OEs foram obtidos por hidrodestilação e a composição química foi determinada por GC-FID. A toxicidade aguda dos OEs foi determinada em ratinho Swiss, após administração oral dos óleos essenciais, seguindo o procedimento Up-and-Down, da OECD [3] e foi efetuada a triagem farmacológica durante 14 dias [4], segundo as exigências da Direção Geral de Veterinária e da FELASA. Posteriormente, após o sacrifício dos animais, procedeu-se à recolha de sangue e dos órgãos, para análise histológica do fígado e rim e à quantificação dos biomarcadores: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (γ -GT), creatinina e ureia.

Os componentes maioritários do EO de *L. luisieri* foram o 1,8-cineol, acetato de trans- α -necrodilo, lavandulol e trans- α -necrodol, enquanto que no EO da *L. viridis* foram 1,8-cineol, cânfora e linalol. Os óleos apresentaram baixa toxicidade com valores de DL50 $\gg$ 2000 mg/kg e sem manifestação de sintomas clínicos. A análise histológica dos tecidos hepáticos e renal juntamente com a análise dos biomarcadores permitiram monitorizar as funções destes órgãos e despistar possíveis efeitos tóxicos.

Estes resultados sugerem a possível utilização dos óleos essenciais das *Lavandula* como nutracêuticos ou agentes terapêuticos, no entanto é necessário continuar estes estudos com vista a definir a posologia mais eficaz e segura a aplicar.

Palavras-chave: *Lavandula luisieri*, *Lavandula viridis*, óleos essenciais, composição química, avaliação toxicológica, biomarcadores bioquímicos.

Acknowledgments

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

References

1. Cavanagh HM, Wilkinson JM. Biological activities of Lavender essential oil. *Phytother Res* 2002; 16(4):301-8.

2. Arantes S. Caracterização química e atividade biológica dos óleos essenciais e extratos aquosos de *Lavandula* spp. do Sul de Portugal [MSc dissertation, in portuguese]. Universidade de Évora, Portugal; 2013.
3. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity-Up-and-Down Procedure. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment n° 425; 2008.
4. Vogel HG. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2002.

Comparative study of chemical stress by metal nanoparticles and organic pollutants using *Saccharomyces cerevisiae* as alternative model
Estudo comparativo de stress químico por nanopartículas de metais e poluentes orgânicos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo alternativo eucariota

Isabel Alves-Pereira^{1,2,a}, Marta Candeias¹, Joana Capela-Pires¹, Rui Ferreira^{1,2}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002-554, Évora, Portugal

2. Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, 7002-554, Évora, Portugal

a Corresponding author: Isabel Alves-Pereira, iap@uevora.pt

ABSTRACT

The detection of cell responses triggered by exposure to new materials of environmental circulation, such as metal nanoparticles and pesticides, is becoming increasingly relevance in animal health. However, toxicological studies are increasingly less recommended in animals because the high number of individuals used interferes dramatically with animal welfare and compromises the 3Rs paradigm. For this reason, many international organizations have suggested the development of alternative biological models. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is currently described as suitable eukaryotic organism in stress studies, whose responses to the level of the proteome and metabolome may be transposed to eukaryotes with more complex cellular organization.

Thus, the aim of this study was to compare the effects of isoproturon (IPU) a phenylurea herbicide and titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP) in the cell growth of wild-type *S. cerevisiae* UE-ME3 of Alentejo, Portugal, belonging to the yeast collection of Enology laboratory of University of Évora. The biomass produced was monitored by dry weight and cell damages were estimated by malonaldehyde (MDA) level. The results showed an absence of significant changes in biomass produced and in the MDA levels of yeast cells exposed to the phenylurea herbicide as well as a decrease in glutathione disulfide (GSSG) level. This response pointed to an adaptive behaviour of *S. cerevisiae* to the IPU. On the other hand, it was observed a decrease in biomass produced by *S. cerevisiae* grown in the presence of titanium dioxide nanoparticles correlated with an increase in the cell content of glutathione disulphide and MDA. These studies reveal distinct responses to different xenobiotic by *S. cerevisiae*. This response may be transposed for more complex eukaryotes, since international databases such as NCBI (National Center for Biotechnology Information) reveal that *S. cerevisiae* has ORFs (open reading frame) associated to antioxidant response which exhibit high homology with animals ORFs. These findings contributed to illustrate the importance of MDA and GSSG as biomarkers of response to environmental contaminants.

Keywords: Yeast, malonaldehyde, isoproturon, titanium dioxide nanoparticles, cell damages.

RESUMO

A detecção de respostas celulares à exposição a novos materiais com circulação ambiental, como nanopartículas metálicas e pesticidas, tem-se tornado cada vez mais relevante na saúde animal. Contudo, estudos toxicológicos com animais são cada vez menos recomendados devido ao elevado número de indivíduos utilizados que compromete drasticamente o bem-estar animal e o paradigma dos 3Rs. Por essa razão, muitas organizações internacionais têm sugerido o desenvolvimento de modelos biológicos alternativos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é descrita na literatura como um eucariota adequado a estudos de stress cujas respostas ao nível do proteoma e metaboloma podem ser transpostas aos eucariotas superiores.

Assim, o objectivo deste estudo foi comparar os efeitos do isoproturão (IPU) uma fenilureia utilizada como herbicida e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NP) no crescimento celular da *S. cerevisiae* UE-ME3, nativa do Alentejo, Portugal, depositada na colecção de leveduras do laboratório de Enologia da Universidade de Évora. A biomassa produzida foi monitorizada por determinação do peso seco e os danos celulares foram estimados pelos níveis intracelulares de malonaldeído (MDA). Os resultados revelaram que não ocorreram alterações significativas na quantidade de biomassa produzida e nos níveis de MDA, mas detectou-se um decréscimo nos níveis de dissulfureto de glutationo (GSSG) de leveduras expostas à fenilureia. Esta resposta aponta para um comportamento adaptativo de *S. cerevisiae* ao IPU. No entanto, observou-se uma diminuição da biomassa produzida por *S. cerevisiae* crescidas em presença de nanopartículas de dióxido de titânio, correlacionado com um aumento do teor celular de GSSG e de MDA. Estes estudos revelaram que *S. cerevisiae* exibiu comportamento distinto com diferentes xenobióticos. Estas respostas podem ser transpostas a eucariotas mais complexos, uma vez que bases de dados internacionais, como a NCBI (National Center for Biotechnology Information) revelam que *S. cerevisiae* possui ORFs (open reading frame) envolvidas na resposta antioxidante com elevada homologia a ORFs de animais. Estes resultados contribuíram para ilustrar a importância do MDA e do GSSG como biomarcadores da resposta a contaminantes ambientais.

Palavras-chave: Leveduras, malonaldeído, isoproturão, nanopartículas de dióxido de titânio, danos celulares.

Acknowledgments

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

Effect of nanodiamond particles as potential wear debris from prosthetic ceramic materials: study of toxicological markers in erythrocyte
Efeito de partículas de desgaste de materiais cerâmicos para utilização próstética: marcadores toxicológicos em eritrócito

Maria Lameira¹, Andreia Neves¹, Célia Antunes^{1,2}, Orlando Lopes^{3,4}, Fernando Capela e Silva^{3,4}, Margarida Amaral^{5,6}, Ana Costa^{1,3,a}
 1. Departamento de Química, Universidade de Évora, Portugal

2. CNC- Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Rua Larga, Faculdade de Medicina, Pólo I, 1º andar, 3004-504 Coimbra, Portugal

3. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

4. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

5. CICECO, Materials Science and Engineering Department, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

6. I3N, Physics Department, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

a Corresponding author: Ana Costa, acrc@uevora.pt

ABSTRACT

One of the main concerns in prosthetic construction and utilization is related to erosion nanoparticles that eventually accumulates and may evoke deleterious effects in vivo. As such, the main objective of this work was to evaluate the potential toxicological effect of diamond nanoparticles in vivo.

Forty-five male 20 weeks-old Swiss mice, weighing approximately 30-35 g were divided into 2 groups: control group (n = 15) and test group (n = 30). Nanodiamond particles suspensions [mean dimensions 6nm; diamond powder (gray), 98+% Nano, CAS: 7782-40-3, AB255197, ABCR GmbH] were administered through intraperitoneal injection at 40 mg/kg of body weight. Control group received PBS as vehicle. The animals were weighed and assessed every day to check the behavioural changes. The animals were maintained on a 12 h/12 h light/dark cycle at a constant temperature of 22°C with ad libitum access to water and a standard diet. Groups of 5 control animals and 10 test animals were euthanized by exsanguination under ketamine (100mg/Kg)/xilazine (10mg/Kg) anaesthesia at day 5, 15 and 60 of treatment. Blood samples and organs were collected for biochemistry and histological studies. Nanodiamond particles administration induced a 40% decrease of catalase activity, observed throughout the study time. Diminished activities of glutathione reductase (GR; 50%, irrespectively of the time point considered) and peroxidase (GPx; 40% at time points 7 and 14 days followed by a recovery after 2 months) were also observed. These changes were followed by unchanged levels of -SH at time points 7 and 14 days followed by a decrease in -SH levels (40%) 2 months after injection.

These results suggest that the nanodiamond particles negatively affected the antioxidant defenses in erythrocytes, characterized by a diminished capacity of peroxide scavenging mediated by cata-

lase as well as a decreased antioxidant protection dependent on glutathion/ luthation redox system particularly after longer exposure. In summary, a characterization of wear debris particles is highly recommended to warrant user safety.

Keywords: Nanodiamonds, enzymes, GR, GPX, catalase, redox systems.

RESUMO

Um dos problemas dos materiais usualmente utilizados em próteses está relacionado com a formação de partículas de desgaste resultantes da utilização continuada. O objetivo deste trabalho consistiu em proceder a uma avaliação da ação destas partículas in vivo.

Foram utilizados neste estudo 45 murganhos Swiss adultos, com pesos entre 30-35g, subdivididos em 2 grupos: Grupo controlo (n=15) e grupo teste (n=30). Preparou-se uma suspensão de partículas de nanodiamante com dimensão média de 6 nm (diamond poder- gray, 98+% Nano, CAS: 7782-40-3, AB255197, ABCR GmbH) em PBS, que foi administrada ao grupo teste por via intraperitoneal na dose de 40 mg/Kg. O grupo controlo foi administrado com o veículo. Os animais foram pesados e observados diariamente e registadas quaisquer alterações comportamentais. Os animais foram mantidos num ciclo de 12h/12h de luz/escurecimento e à temperatura constante de 22°C com água e dieta ad libitum. Grupos de 5 animais controlo e 10 do grupo teste foram eutanasiados 5, 15 e 60 dias após a administração, por punção cardíaca terminal, sob anestesia com cetamina/xilazina (100mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente). A administração de nanopartículas induziu a diminuição da atividade catalase em cerca de 40%, que se manteve durante todo o período do estudo. Observou-se a diminuição da atividade glutatono-redutase (GR) e glutatono-peroxidase (GPx) em aproximadamente 50 % independentemente do período do estudo (GR) e em 40% após 7 e 14 dias apresentado uma recuperação ao fim dos 2 meses (GPx). Estas foram alterações foram acompanhadas pela manutenção dos níveis dos tióis não proteicos aos 7 e 14 dias do estudo, observando-se um decréscimo de 40% após os 2 meses. Estes resultados sugerem que as nanopartículas em suspensão afetaram a capacidade de defesa antioxidante do eritrócito, expressa pela diminuição da capacidade de eliminação de peróxidos mediada pela catalase bem como pela diminuição da proteção dependente do glutatono cujos níveis, ao fim de 2 meses, eram inferiores aos dos controlos. Em resumo, o nível de partículas de desgaste dos materiais próstéticos deve ser bem caracterizados para garantir condições de segurança aos seus utilizadores.

Palavras-chave: Nanodiamantes, enzimas, GR, GPX, catalase, sistemas redox.

Acknowledgements

This work was conducted under the framework of FCT project HipCerDiam-PTDC/EME-PME/112910/2009. This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

Effect of nanodiamond particles as potential wear debris from prosthetic ceramic materials: study of toxicological markers in liver
Efeito de partículas de desgaste de materiais cerâmicos para utilização próstética: marcadores de toxicidade hepática

Andreia Neves¹, Maria Lameira¹, Ana Costa^{1,2}, Orlando Lopes^{2,3}, Fernando Capela e Silva^{2,3}, Margarida Amaral^{4,5}, Célia Antunes^{1,6,a}

1. Departamento de Química, Universidade de Évora, Portugal

2. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

3. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

4. CICECO, Materials Science and Engineering Department, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

5. I3N, Physics Department, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

6. CNC- Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Rua Larga, Faculdade de Medicina, Pólo I, 1º andar, 3004-504 Coimbra, Portugal

a Corresponding author: Célia Antunes, cmma@uevora.pt

ABSTRACT

One of the main concerns in prosthetic construction and utilization is related to erosion nanoparticles that eventually accumulates and may evoke deleterious effects in vivo. As such, the main objective of this work was to evaluate the potential toxicological effect of diamond nanoparticles in vivo.

Forty-five male 20 weeks-old Swiss mice, weighing approximately 30-35 g were divided into 2 groups: control group (n = 15) and test group (n = 30). Nanodiamond particles suspensions [mean dimensions 6nm; diamond powder (gray), 98+% Nano, CAS: 7782-40-3, AB255197, ABCR GmbH] were administered through intraperitoneal injection at 40 mg/kg of body weight. Control group received PBS as vehicle. The animals were weighed and assessed every day to check the behavioural changes. The animals were maintained on a 12 h/12 h light/dark cycle at a constant temperature of 22°C with ad libitum access to water and a standard diet. Groups of 5 control animals and 10 test animals were euthanized by exsanguination under ketamine (100mg/Kg)/xilazine (10mg/Kg) anaesthesia at day 5, 15 and 60 of treatment. IP injection of nanodiamond particles did not affect catalase activity at the 7 and 14 days time points but induced a 70 % decrease of this enzyme after 2 month. While the GR activity was not affected either during the time of the study, the GPx activity was diminished by 70% after 7 days and slightly recovered afterwards (55% activity was observed at 14 days and 2 month after injection). These changes were paralleled by unchanged -SH levels. Serum AST and ALT transaminases were also unchanged. These results suggest that, despite the nanodiamond particles did not induce hepatotoxicity, evaluated by the serum AST and ALT levels, they lowered the antioxidant defense capacity of the liver, evidenced by a lower peroxide scavenging by catalase dependent pathway while the glutathion/glutathione redox

system was not significantly affected. In summary, a characterization of wear debris particles is highly recommended to warrant user safety.

Keywords: Nanodiamonds, enzymes, GR, GPx, catalase, redox systems.

RESUMO

Um dos problemas dos materiais usualmente utilizados em próteses está relacionado com a formação de partículas de desgaste resultantes da utilização continuada. O objetivo deste trabalho consistiu em proceder a uma avaliação da ação destas partículas in vivo.

Foram utilizados neste estudo 45 murganhos Swiss adultos, com pesos entre 30-35g, subdivididos em 2 grupos: Grupo controlo (n=15) e grupo teste (n=30). Preparou-se uma suspensão de partículas de nanodiamante com dimensão média de 6 nm (diamond poder- gray, 98+% Nano, CAS: 7782-40-3, AB255197, ABCR GmbH) em PBS, que foi administrada ao grupo teste por via intraperitoneal na dose de 40 mg/Kg. O grupo controlo foi administrado com o veículo. Os animais foram pesados e observados diariamente e registadas quaisquer alterações comportamentais. Os animais foram mantidos num ciclo de 12h/12h de luz/escurecimento e à temperatura constante de 22°C com água e dieta ad libitum. Grupos de 5 animais controlo e 10 do grupo teste foram eutanasiados 5, 15 e 60 dias após a administração, por punção cardíaca terminal, sob anestesia com cetamina/xilazina (100mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente). A administração de nanopartículas não teve efeitos imediatos sobre a atividade catalase, observando-se uma diminuição em cerca de 70% da mesma 2 meses após administração. A atividade glutatono-redutase (GR) não foi afetada no período em estudo e a atividade glutatono-peroxidase (GPx) sofreu uma diminuição de 70% após 7 dias, registando-se uma pequena recuperação nos períodos seguintes mantendo-se, no entanto, inferior aos controlos (cerca de 55%). Não se registaram alterações no nível dos -SH não proteicos. Não foram detetados aumentos no soro das transaminases AST e ALT. Estes resultados sugerem que, apesar de não terem induzido toxicidade hepática avaliada pelas transaminases, as nanopartículas em suspensão afetaram a capacidade de defesa antioxidante do fígado, expressa pela diminuição da capacidade de eliminação de peróxidos mediada pela catalase, não tendo sido significativamente alterada a capacidade antioxidante dependente do glutatono cujos níveis se mantiveram inalterados. Em resumo, o nível de partículas de desgaste dos materiais próstéticos deve ser bem caracterizado para garantir condições de segurança aos seus utilizadores.

Palavras-chave: Nanodiamantes, enzimas, GR, GPx, catalase, sistemas redox.

Acknowledgements

This work was conducted under the framework of FCT project HipCerDiam-PTDC/EME-PME/112910/2009. This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

Assessment of central nervous cell proliferation ability in Zebrafish embryos treated with ketamine

Estudo da proliferação celular no sistema nervoso central de embriões de peixe-zebra tratados com cetamina

Carla Santos^{1,8,a}, Luís Félix², Margarida Neves³, Ana Coimbra², Ana Maria Valentim⁴, Luís Antunes^{4,5}, Carlos Gonçalves⁶, Anália do Carmo^{1,7}, Maria de Lurdes Pinto⁸

1. Department of Veterinary Medicine, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal.

2. Life Sciences and Environment School, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

3. Faculty of Science and Technology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

4. IBMC, Institute for Molecular and Cell Biology, University of Porto, Porto, Portugal

5. CITAB, Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences and Veterinary Sciences Department, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

6. Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

7. CNC, Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

8. CECAV, Animal and Veterinary Research Centre, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

a Corresponding author: Carla Santos, carla.alex.santos@gmail.com

ABSTRACT

Zebrafish (*Danio rerio*), is presently one of the most used animal models due to several biological advantages, which has proved to be an excellent strategy both in studies of early vertebrate development as well as in a wide variety of human diseases [1,2]. Zebrafish increased significance led to more invasive studies, with extended exposition to several agents, namely anaesthetics [1]. However the knowledge of the effects of anaesthetic agents such as ketamine (a commonly used anaesthetic both in humans and research) in the development of zebrafish's central nervous system (CNS) is scarce. Our study aims to evaluate the morphological alterations and the toxicological effects of ketamine in the development of zebrafish CNS. Zebrafish (wild-type-AB strain) embryos, in blastula stage were randomly distributed into 4 study groups: negative control (in system water only) and ketamine concentrations at three different dosages 0.2/0.4/0.8 mg/ml (20 min. exposure) based in previous studies. After the exposition to ketamine, zebrafish were maintained until 144 hours post fertilizations (hpf) [3]. All animal procedures were in agreement with European and Portuguese legislation. Larvae, 144 hpf were processed for routine embedding in paraffin, and stained with haematoxylin/eosin to evaluate the morphology of CNS and the eventual cellular alterations induced by the anaesthetic. Since a large number of biomarkers have been successfully applied to zebrafish [2], including Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), we evaluated cell proliferation ability alterations by im-

munohistochemistry using an anti-PCNA antibody (clone PC10, Vector Laboratories, Burlingame). Larvae exposed to 0.8 mg/ml of ketamine displayed a higher percentage of morphological alterations such as altered body shape, body axis and tail curving in agreement with studies by Felix et al (2014) [3]. In CNS, a large number of picnotic cells was observed, along with cellular depletion in cerebellar and medula oblonga areas. PCNA was mainly expressed at telencephalic, mesencephalic, cerebellar and diencephalic regions, areas previously described as proliferative in the zebrafish brain [4]. The higher expression of PCNA was observed in negative controls and larvae treated with 0.2mg/ml of ketamine. In 0.4 mg/ml ketamine treated larvae, PCNA was expressed in the same CNS areas observed in control group, but in the posterior mesencephalic lamina the expression was limited to a more dorsal proliferative zone. PCNA expression in 0.8 mg/ml ketamine treated larvae was further reduced, when compared both with control group and with those treated with 0.4mg/ml. In addition, regarding the cerebellar area only a small number of cells or no cell labelling was observed.

These results suggest that ketamine (0.4 and 0.8mg/ml) induces a reduction in cell proliferation ability in the CNS of 144 hpf larvae. This reduction is specially observed in the cerebellar area. These alterations may compromise the normal development of embryos, larvae and adult zebrafish and may limit the use of this anaesthetic in research studies.

Keywords: Zebrafish, anaesthesia, ketamine, cell proliferation (PCNA).

RESUMO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é actualmente um dos modelos animais mais usados em experimentação devido a várias vantagens biológicas e ao facto de ser um excelente modelo, quer em estudos de desenvolvimento embrionário, quer de várias patologias humanas. A sua utilização exige, em muitos casos, a exposição a doses elevadas de anestésicos, como a cetamina, contudo os estudos sobre o efeito desses agentes anestésicos no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) são ainda escassos. O presente estudo tem como objectivo avaliar as alterações morfológicas e os possíveis efeitos toxicológicos da cetamina no desenvolvimento do SNC do peixe-zebra. Os embriões de peixe-zebra (wild-type-AB strain) foram divididos em grupos e expostos a diferentes doses pré-definidas de cetamina (0.2/0.4/0.8 mg/ml), durante 20 minutos, na fase de blástula. Após as 144 hpf, as larvas foram eutanasiadas, fixadas e submetidas ao processamento de rotina para inclusão em parafina. A avaliação morfológica foi efetuada em cortes corados com hematoxilina e eosina e a proliferação celular foi avaliada através da técnica de imunohistoquímica na qual se utilizou um anticorpo anti-PCNA. As alterações morfológicas registadas, e a diminuição da proliferação celular observada em larvas tratadas com as dosagens de 0.4 e 0.8 mg/ml, especialmente a nível cerebelar, parecem indicar que a cetamina pode comprometer o normal desenvolvimento do peixe-zebra, podendo limitar o uso deste agente anestésico em protocolos experimentais.

Palavras-chave: Peixe-zebra, anestesia, cetamina, proliferação celular (PCNA).

Acknowledgements

FEDER funds through the Operational Competitiveness Programme – COMPETE and National Funds through FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia under the project FCOMP-01-0124-FEDER-028683 (PTDC/CVT-WEL/4672/2012).

References

1. Fleming A. Zebrafish as an alternative model organism for disease modelling and drug discovery: implications for the 3Rs. London: National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, NC3Rs 10; 2007.
2. Verduzco D, Amatruda JF. Analysis of cell proliferation, senescence and cell death in zebrafish embryos. *Methods in Cell Biology* 2011; 101:19-38.
3. Félix LM, Antunes LM, Coimbra AM. Ketamine NMDA receptor-independent toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *Neurotoxicol Teratol* 2014; 41:27-34.
4. Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol* 2006; 295(1):263-77.

Immunohistochemical evaluation of the lesions identified in calves infected with *Theileria annulata*

Avaliação imunohistoquímica das lesões identificadas em vitelos infectados por *Theileria annulata*

Sandra Branco^{1,2}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

2. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

Email: smbb@uevora.pt

ABSTRACT

Various cases of multifocal to coalescent nodular skin lesions and lymph node enlargement, similar to multicentric malignant lymphoma, were registered in very young calves in the south of Portugal [1]. At necropsy, hemorrhagic nodules or nodules with a hemorrhagic halo were seen, particularly in the skin, subcutaneous tissue, skeletal and cardiac muscle, pharynx, trachea and intestinal serosa. Histologically nodules were formed by large, round, lymphoblastoid neoplastic-like cells. Immunohistochemistry identified these cells as mostly CD3 positive T lymphocytes and MAC387 positive macrophages. A marker for B lymphocytes (CD79acy) labelled very few cells. *Theileria annulata* infected cells in these nodules were also identified by IHC, through the use of two monoclonal antibodies (1C7 and 1C12) diagnostic for the parasite. It was concluded that the pathological changes observed in the different organs and tissues were caused by proliferation of schizont-infected macrophages, which subsequently stimulate a severe uncontrolled proliferation of uninfected T lymphocytes.

Keywords: *Theileria annulata*, tropical theileriosis, cattle, lymphoid cell proliferation.

RESUMO

Na região do Alentejo, Sul de Portugal, foram identificados vários casos de infeções por *Theileria annulata* em vitelos muito jovens [1]. Os animais apresentavam lesões cutâneas nodulares multifocais dispersas e hipertrofia generalizada dos linfonodos, fazendo lembrar o quadro lesional de linfoma maligno multicêntrico. Após necrópsia foram também identificadas lesões nodulares hemorrágicas, ou de halo hemorrágico, na pele, tecido conjuntivo subcutâneo, músculos esquelético e cardíaco, faringe, laringe, traqueia e serosa intestinal. Histologicamente as lesões nodulares correspondem a proliferação de células linfóides neoplásicas de morfologia blástica. A caracterização imunohistoquímica destas lesões revelou a presença maioritariamente de linfócitos T (CD3 positivos) e macrófagos (MAC387 positivos). Verificou-se também a presença, embora em pequeno número, de linfócitos B (CD79acy positivos). A presença de *Theileria annulata* nas células infetadas foi confirmada pela marcação com dois anticorpos monoclonais (1C7 e 1C12), específicos para este parasita. As lesões macroscópicas e histológicas observadas e as marcações imunohistoquímicas realizadas permitiram concluir que estas alterações

são o resultado da proliferação de macrófagos infetados por *Theileria annulata*, que estimulam uma reação exuberante de multiplicação e proliferação de linfócitos T, não infetados.

Palavras-chave: *Theileria annulata*, teileriose tropical, bovinos, proliferação de células linfóides.

Acknowledgements

To Professor Brian Shiels (Division of Infection and Immunity, Institute of Comparative Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow, Scotland) for the supply of antibodies 1C7 and 1C12.

This work was funded by a PhD fellowship SFRH/BD31987/2006. This work was also funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

References

1. Branco S, Orvalho J, Leitão A, Pereira I, Malta M, Mariano I, Carvalho T, Baptista R, Shiels BR, Peleteiro MC. Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *J Vet Sci* 2010; 11(1):27-34.

The use of n-alkanes as markers of herbage intake by free range turkeys

Utilização de n-alcenos como marcadores de ingestão de erva em perus de regime extensivo

Maria Isabel Ferraz de Oliveira^{1,a}, Maria da Graça Machado^{1,2}, Alfredo Pereira^{1,2}, Paulo Infante³, Amadeu Borges^{1,2}, Fernanda Alves, Fernando Capela e Silva^{1,4}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

2. Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

3. Departamento de Matemática, Universidade de Évora, 7006-554 Évora, Portugal

4. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

a Corresponding author: Maria Isabel Ferraz de Oliveira, mifo@uevora.pt

ABSTRACT

Turkeys in free range condition ingest herbage as a complement to their diet. The introduction of herbage in the diet of turkeys, otherwise fed on concentrated feed, generates a new feeding context that needs to be investigated, particularly in the Montado/Dehesa where free range turkey production may be a way to add value to this Mediterranean ecosystem. In particular the knowledge of herbage intake and its contribution to the nutritional status of the animals is required. n-Alkanes have been extensively used as faecal markers to estimate intake and digestibility in grazing animals [1], however very few studies have been reported on avian species [2] and, to our knowledge, no study on turkeys was reported in the literature.

The present experiment was conducted to evaluate the behaviour of n-alkane markers in the digestive tract of free range turkeys. The objective was to describe the behaviour of n-alkane markers in the digestive tract and to calculate total faecal recoveries rates of C32 and C36 alkanes. Six male adult black free range turkeys were kept in individual pens and fed a mixture of a commercial concentrate for turkeys and dehydrated lucerne, ad libitum. Each bird received a single dose of C32 (80mg) and C36 (80mg) alkane in a gelatine capsule. The birds were equipped with a harness [3] for excreta collection and an attempt to collect every individual dropping was made over 72 hours after alkane single dose. Individual droppings were freeze dried, weighed and milled. Alkane levels were determined by GC according to Dove and Mayes (2006) [4]. Excretion patterns of external (C32 and C36) n-alkanes were described after a single dose of alkanes. N-Alkane (C32 and C36) faecal recovery rates averaged 74,7 and 69,2% respectively.

Keywords: Free range turkeys, intake biomarkers, n-Alkanes, faecal recovery rates.

RESUMO

Perus (Meleagris gallopavo) produzidos em regime de exploração extensivo ingerem pastagem como complemento da sua dieta. A introdução de erva

(alimento fibroso) na dieta destes animais normalmente alimentados com concentrados, origina um novo contexto alimentar que interessa conhecer e estudar, particularmente no ecossistema Montado/Dehesa onde o acabamento de perus pode constituir uma mais valia. Especificamente, é importante medir a ingestão de erva e avaliar a sua contribuição para o status nutricional dos animais. Os n-alcenos têm sido frequentemente utilizados, como marcadores fecais, para estimar a ingestão e a digestibilidade em animais de pastoreio [1], no entanto, muito poucos estudos com aves [2] e, segundo o nosso conhecimento, nenhum com perús foi reportado na literatura.

O objectivo deste estudo foi o de avaliar o comportamento dos n-alcenos (marcadores) no tracto digestivo de perus de regime de produção extensivo. Para tal foi descrita a curva de excreção e as taxas de recuperação fecal de dois n-alcenos (C32 e C36), potenciais marcadores de ingestão e digestibilidade. Seis animais (perús pretos, machos adultos) foram alojados em parques individualmente e alimentados ad libitum com uma mistura (farinado) de concentrado comercial com luzerna desidratada. Cada animal recebeu uma dose única de C32 (80mg) e C36 (80mg) numa capsula de gelatina. Os animais foram equipados com um arnês [3] para colheita total de excreta. Durante 72h após o fornecimento da dose única de marcadores foram recolhidas, para cada animal, todas as defecações individuais resultando numa colheita total de excreta para cada animal. As defecações individuais foram liofilizadas, pesadas e moídas. O perfil de n-alcenos foi analisado por GC de acordo com Dove e Mayes (2006) [4]. Os padrões de excreção (C32 e C36) dos n-alcenos foram descritos após fornecimento de uma dose única de marcador. As taxas de recuperação fecal dos n-alcenos C32 e C36 foram de 74,7 e 69,2% respectivamente.

Palavras-chave: Perus de regime extensivo, biomarcadores de ingestão, n-Alcanos, taxas de recuperação fecal.

Acknowledgements

This work was also funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014. Maria Isabel Ferraz de Oliveira is in receipt of a Post-Doctoral grant within the research project ALENT-07-0224-FEDER-001744.

References

1. Ferraz-de-Oliveira MI, Lamy E, Bugalho M, Vaz M, Pinheiro C, Cancela-D'Abreu M, Capela e Silva F, Sales-Baptista E. Assessing foraging strategies of herbivores in Mediterranean oak woodlands: A review of key issues and selected methodologies. *Agroforest Syst* 2013; 87(6):1421-37.
2. Hatt JM, Mayes RW, Clauss M, Lechner-Doll M. Use of artificially applied n-alkanes as markers for the estimation of digestibility, food selection and intake in pigeons (*Columba livia*). *Anim Feed Sci Technol* 2001; 94(1-2):65-76.
3. Almeida JA, Baptista ES. A new approach to the quantitative collection of excreta from birds in a true metabolizable energy bioassay. *Poult Sci* 1984;

63(12):2501-03.

4. Dove H, Mayes RW. Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. Nat Protoc 2006; 1(4):1680-97.

The fatty acids as biomarkers used to unlock the secrets of the oceanic phase of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.): an ancestral species adapted to the present day

Os ácidos gordos usados como bio marcadores para desvendar os segredos da fase oceânica da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.): uma espécie ancestral adaptada aos nossos dias

Maria João Lança¹a, Maria Ana Machado¹, Catarina Sofia Mateus², Bernardo Ruivo Quintela^{2,3}, Pedro Raposo de Almeida²

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002 554, Évora, Portugal

2. MARE – Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Largo dos Colegiais, 2, 7002 554, Évora, Portugal

3. Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

a Corresponding author: Maria João Lança, mjlanca@uevora.pt

ABSTRACT

The agnathans probably arose as the first vertebrates about 530 million years ago, in Cambrian period and after the evolutionary “boom” of multicellular organisms. The genus *Petromyzon* comprises only one anadromous and parasitic species, *Petromyzon marinus* L., known as sea lamprey which is widely distributed on both sides of the North Atlantic. Sea lamprey migrates twice during its life cycle between freshwater and seawater. Although the freshwater phase of the life cycle of this species is well studied, the oceanic trophic phase is still poorly understood because few specimens have been captured in this environment. To overcome this lack of knowledge, various studies using fatty acids as biomarkers have been developed by our research group in the last ten years. Recently, we studied the population structure of sea lamprey sampled in the main Portuguese river basins using both morphological characters and heart tissue fatty acid signature. Our results suggest the existence of three sea lamprey stocks entering Portuguese river basins. Due to the paucity of information regarding the feeding ecology of sea lampreys in the marine environment, we used the fatty acids as biomarkers to the extent that fatty acids can be used as general diet indicators and bio markers for identification of food web relationships. With our data we manage to distinguish two feeding strategies in sea lampreys from the west coast of Portugal, one typical of a top predator of a marine food web with a planktonic base, and the other much more diverse. The gathered information has implications in terms of management and conservation of sea lamprey in the Iberia Peninsula. These studies demonstrate the potential for fatty acid profile as a biomarker to discriminate stocks and to distinguish feeding strategies.

Keywords: Fatty acids, sea lamprey, biomarkers.

RESUMO

Os agnatas tiveram a sua origem entre os primeiros vertebrados, aproximadamente há 530 milhões de anos no período Cambriano e após o “boom” evolucionário dos organismos multicelulares. O género *Petromyzon* compreende apenas uma única espécie que é parasítica e anádroma, *Petromyzon marinus* L., denominada vulgarmente por lampreia-marinha encontrando-se distribuída geograficamente em ambos os lados do Atlântico Norte. A lampreia-marinha efetua duas migrações entre o meio dulçaquícola e o meio marinho durante o seu ciclo de vida. Embora a fase do ciclo de vida passada em água doce seja bem estudada, a fase oceânica ainda se encontra pouco documentada devido ao facto de serem escassos os exemplares capturados. A fim de esclarecer algumas questões relacionadas com esta fase do ciclo de vida da lampreia-marinha, a nossa equipa tem vindo, nos últimos dez anos, a desenvolver, estudos utilizando os ácidos gordos como biomarcadores. Recentemente, estudámos a estrutura populacional da lampreia-marinha amostrada nas principais bacias hidrográficas recorrendo à utilização de caracteres morfológicos associados ao perfil em ácidos gordos do tecido cardíaco. Os nossos resultados apontaram para a existência de três stocks de lampreia-marinha que alcançam as bacias hidrográficas. Em virtude da escassez de informação relacionada com a ecologia alimentar da lampreia-marinha durante a sua fase oceânica, novamente recorreremos aos ácidos gordos como biomarcadores, na medida em que estes são indicadores de dieta e biomarcadores frequentemente usados para identificação de relações em cadeias alimentares. Os resultados mostraram que é possível diferenciar duas estratégias alimentares usadas pelas lampreias da costa oeste de Portugal; uma típica de predador de topo com uma teia alimentar marinha com base planctónica e outra muito mais diversa. A informação proveniente destes estudos tem implicação quer em termos de gestão quer em termos de conservação da lampreia-marinha na Península Ibérica. Estes estudos demonstraram o potencial da utilização do perfil em ácidos gordos como biomarcador para discriminar stocks e o potencial dos ácidos gordos para diferenciar estratégias alimentares.

Antioxidant properties and analgesic and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* and *Foeniculum vulgare*

Propriedades antioxidantes e atividades analgésica e anti-inflamatória de *Calamintha nepeta* e *Foeniculum vulgare*

Sílvia Arantes^{1,2}, Andreia Piçarra^{1,2}, M. Fátima Candeias^{1,2}, António Neto Vaz^{1,2}, M. Teresa Tinoco¹, Júlio Cruz-Morais¹, M. Rosário Martins^{1,2,a}

1. ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

2. Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

3. Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

4. Departamento de Planeamento, Ambiente e Ordenamento, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

a Corresponding author: M. Rosário Martins, mrm@uevora.pt

ABSTRACT

Plants are rich in bioactive compounds, some of them have important antioxidant properties useful in prevention of the oxidative stress and neurodegenerative diseases, however their medicinal uses are mainly based on traditional beliefs, without scientific evidence [1]. Some studies reported the ethnoveterinary applications of medicinal plants in feeding and nutrition of livestock, suitable to improve the antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties [2]. Phytotherapeutical use of essential oils (EOs) gain increasing attention in animal nutrition due to their spasmolytic and diuretic activities [3]. However, further scientific research is therefore needed to use essential oils effectively in feeding of livestock.

The aim of this study was to evaluate antioxidant and pharmacological properties of EOs and extracts of two aromatic plants from Alentejo, *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (calamint) and *Foeniculum vulgare* L. (fennel). Antioxidant activity was determined by three methods: diphenylpicrylhydrazil radical, β -carotene/linoleic acid and reducing power assay. Additionally, oxidative stress biomarkers, namely superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) were quantified in serum and hepatocyte. Analgesic and anti-inflammatory properties of EOS and extracts (p.o) were evaluated in Wistar rats [4]. After oral administration, EOs and aqueous extracts of calamint and fennel showed important analgesic and anti-inflammatory activities, which may be correlated with the antioxidant potential of these aromatic plants. Results obtained suggested the promising use of EOs and extracts as food supplement and pharmaceutical formulations, however further investigations are important in order to define safety use doses.

Keywords: *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta*, *Foeniculum vulgare*, essential oil, antioxidants, oxidative stress biomarkers, analgesic and anti-inflammatory activities.

RESUMO

As plantas aromáticas possuem compostos bioativos com propriedades antioxidantes, importantes na prevenção do stress oxidativo e de doenças neurodegenerativas, no entanto, a sua utilização na medicina tradicional tem por base conhecimentos sem fundamentação científica [1]. Alguns estudos referenciam aplicações de plantas medicinais na alimentação de animais e em pecuária com benefícios na Saúde, devido às suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias [2]. A utilização de OEs em Fitoterapia animal tem apresentado particular importância devido às suas propriedades espasmolíticas e diuréticas [3]. No entanto, para validar algumas das propriedades acima referidas, é importante desenvolver estudos de investigação da aplicação de plantas aromáticas e dos seus OEs na pecuária.

Neste trabalho, pretende-se avaliar as propriedades antioxidantes e farmacológicas de OEs e extratos de duas plantas aromáticas do Alentejo, *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (calaminta ou erva-das-azeitonas) e *Foeniculum vulgare* L. (funcho). A atividade antioxidante foi determinada por três métodos distintos: radical difenilpicrilhidrazil, β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor total. Adicionalmente, as atividades enzimáticas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatióno S-transferase (GST) e glutatióno redutase (GR) foram determinados, como biomarcadores associados ao stress oxidativo, no soro e na fração microsomal hepática. Procedeu-se também à avaliação das atividades analgésicas e anti-inflamatórias em rato Wistar [4]. A administração oral dos óleos essenciais/extratos de calaminta ou de funcho mostrou que estes apresentam ação analgésica e anti-inflamatória, a qual poderá estar relacionada com o potencial antioxidante destas plantas aromáticas. Os resultados obtidos sugerem a possível aplicação dos óleos essenciais/extratos de calaminta ou de funcho como suplementos alimentares e em formulações terapêuticas, contudo será necessário efetuar mais estudos com vista a garantir a sua utilização segura.

Palavras-chave: *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta*, *Foeniculum vulgare*, óleos essenciais, antioxidantes, biomarcadores de stress oxidativo, atividades analgésicas e anti-inflamatórias.

Acknowledgments

This work is funded by FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Projects PEst-C/AGR/UI0115/2011 and PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

References

- Anyasor GN, Ogunwenmo KO, Oyelana OA, Akpofunure BE. Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl. (Costaceae). Afr J Biotechnol 2010; 9(31):4880-4.
- Mirzaei-Aghsaghal A. Importance of medical herbs in animal feeding: A review. Ann Biol Res 2012; 3(2):918-23.
- Westendarp H. Essential oils for the nutrition of poultry, swine and ruminants. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2005; 112(10):375-80.
- Vogel HG. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2002.

