PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUIZ EDUARDO RODRIGUES

PERFIL ENDÓCRINO E REPRODUTIVO DE RATOS MACHOS EM CRESCIMENTO SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS

Presidente Prudente - SP
2015

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUIZ EDUARDO RODRIGUES

PERFIL ENDÓCRINO E REPRODUTIVO DE RATOS MACHOS EM CRESCIMENTO SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal e Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Presidente Prudente – SP
2015

636.086 Rodrigues, Luiz Eduardo
R696p Perfil endócrino e reprodutivo de ratos machos em crescimento suplementados com prebióticos mananoligossacarídeos / Luiz Eduardo Rodrigues. -- Presidente Prudente, 2015.
55f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2015.
Bibliografia.
Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

1. Prebiótico. 2. Levedura. 3. Cortisol. 4. Testosterona. 5. Sistema reprodutor. I. Título.

Catalogação na Fonte: Michele Mologni – CRB 8/6204

LUIZ EDUARDO RODRIGUES

PERFIL ENDÓCRINO E REPRODUTIVO DE RATOS MACHOS EM CRESCIMENTO SUPLEMENTADOS COM PREBIÓTICOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal e Saúde Animal.

Presidente Prudente, 24 de Setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

_____
Profa. Dra. Isabele Picada Emanuelli
Centro de Ensino Superior de Maringá - CESUMAR
Presidente Prudente - SP

_____
Profa. Dra. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

As minhas filhas e a minha esposa, que me deram carinho e amor e compreenderam minha ausência.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente me apoiaram e me ajudaram no decorrer do experimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, que esteve ao meu lado nas piores e melhores horas, me estimulou a nunca desistir, chorou e sorriu junto a mim, ouviu meus desabafos, minhas lástimas e minhas alegrias. Orientador que posso designar como um irmão que DEUS me deu de presente. Agradeço a ti Professor pelo grande homem, mestre e sábio e podendo falar, com certeza, que sem você eu não terminaria o meu mestrado. Fica aqui minha gratidão eterna e a formação de uma grande amizade.

A minha família, pelo grande apoio que me deram durante esta longa caminhada.

As alunos(as) da Biologia: Marina, Renata e Paula, Med. Veterinária: Ariana e do Mestrado em Ciência Animal: Gabriel Z. Sakita.

Aos Funcionários do Laboratório de Biofísica e Biotério Central e Experimental II, pelo apoio e dedicação.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela paciência, ensinamentos e acima de tudo pela amizade.

A todos o meu muito Obrigado.

“Todo trabalho árduo traz proveito,

mas o só falar leva à pobreza.”

Provérbios 14:23

RESUMO

Perfil endócrino e reprodutivo de ratos machos em crescimento suplementados com prebióticos mananoligossacarídeos

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes mananoligossacarídeos (MOS) sobre o perfil endócrino e reprodutivo de ratos Wistar em crescimento. Para a realização do estudo, foram utilizados 128 ratos machos com idade de 23 dias, pesando aproximadamente 45 gramas de massa corporal e divididos em quatro grupos experimentais (n = 32): Grupo controle [dieta basal]; Grupo MOS 1 [dieta basal + 1g de MOS 1 (composto derivado da parede celular da levedura Saccharomyces cerevisae, cepa 1026, composta de 17% de α-mananos), por kg da dieta]; Grupo MOS 2 [dieta basal + 0,4g de MOS 2 (composto de fração ativa, α-1,3 e α-1,6, mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α-manose), por kg da dieta]; e Grupo MOS 3 [dieta basal + 1g de MOS 3 (composto por β-glucanos, mananos, polímeros de manose, quitinas (polímeros de glucosamina) e galactanos (polímeros de galactose), derivado de uma cepa de levedura Saccharomyces cerevisae), por kg da dieta]. As dietas sólidas e hídricas foram fornecidas ad libitum durante todo período experimental de 56 dias. As avaliações histológicas do sistema reprodutor (testículos e glândulas adrenais) assim como as dosagens dos hormônios cortisol e testosterona, foram realizadas em quatro períodos experimentais. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 4x4 (4 tratamentos x 4 períodos de coleta: 14, 28, 42 e 56 dias após o inicio da administração da ração). Para determinar se os escores dos parâmetros histológicos diferiram entre os grupos experimentais e entre os momentos, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls. Para concentrações hormonais, os dados foram submetidos à regressão linear simples considerando o tempo em dias como variável independente e as dosagens séricas como variável dependente. Para todas as análises adotou-se nível de significância de 5%. Os grupos suplementados com MOS apresentaram maiores concentrações de testosterona, quantidades de espermátides, espermatozoides e raio dos túbulos seminíferos e menor concentração de cortisol ($P<0,05$). Conclui-se que os prebióticos MOS, derivados da parede celular da levedura Saccharomyces cerevisiae, em ratos púberes levaram a uma mudança na esteroidogênese, evidenciado pela diminuição de cortisol e aumento da testosterona plasmática, com uma antecipação na puberdade sexual, verificada pela maior proporção de espermátides e espermatozoides e um maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos.

Palavras-chave: Prebiótico, Levedura, Cortisol, Testosterona, Sistema Reprodutor.

ABSTRACT

Endocrine and reproductive profile in gowth males rats supplemented with prebiotics mannan oligosaccharides

The aim of this study was to evaluate the effect of different mannan oligosaccharides (MOS) on the endocrine and reproductive profile of growing Wistar rats. A hundred and twenty eight 23-day- old male rats, weighing 45 grams, were randomly divided into four groups (n = 8): control group [basal diet]; MOS1 Group [basal diet + 1 g MOS 1 (mannan oligosaccharide derived from the cell wall of the yeast Saccharomyces cerevisiae, strain 1026, composed of 17% of α-mannans), per kg diet]; MOS2 Group 2 [basal diet + 0.4 g MOS 2 (active fraction, α-1,3 and α-1,6 derived from a mannan oligosaccharides, with 30% of α-mannans), per kg diet]; and MOS3 Group [basal diet + 1 g of MOS 3 (β-glucans, mannans, mannose polymers, chitin (glucosamine polymer) and galactans (galactose polymer) derived from the yeast strain Saccharomyces cerevisiae) per kg diet]. Food and drinking water were provided ad libitum for 56 days. Histological evaluations of the reproductive system, as well as the doses of the hormones were evaluated in four experimental periods. The design was completely randomized in a 4x4 factorial design (4 treatments x 4 collection periods: 14, 28, 42 and 56 days after the start of administration of feed). To determine whether the scores of histological parameters differ between the experimental groups and between times, he used the nonparametric Kruskal-Wallis test, with contrasts by the Student-Newman-Keuls. For hormone concentrations, the data were submitted to linear regression considering the time in days as an independent variable and the serum levels as the dependent variable. For all analyzes we adopted a significance level of 5%. The groups supplemented with MOS showed higher testosterone concentrations, quantities of spermatozoa, sperm and radius of the seminiferous tubules and lower cortisol levels ($P < 0.05$). It follows that prebiotics MOS derived from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae in pubescent rats led to a change in steroidogenesis, evidenced by reduction of cortisol and increased plasma testosterone with an anticipation of sexual puberty verified by a higher proportion of spermatids and sperm and the further development of the seminiferous tubules.

Keywords: Prebiotic, Yeast, Cortisol, Testosterone, Reproductive system.

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO..... 10
ANEXO A - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)..... 34
ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA..... 36

Perfil endócrino e reprodutivo de ratos machos em crescimento suplementados com prebióticos mananoligossacarídeos

Luiz Eduardo Rodrigues[1]; Gabriel Zanuto Sakita[1]; Marcelo Wainer Motta Abdelnur[2]; Marina Janine Gomes[2]; Osimar de Carvalho Sanches[3]; Inês Cristina Giometti[4]; Caliê Castilho[4]; Hermann Bremer-Neto[4]

1 Discente do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: luizeduardo1975@yahoo.com.br; gabrielsakita@yahoo.com.br

2 Discente do Curso de Medicina e do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: marinajanini@hotmail.com; carolcarrion@hotmail.com; luuh-felix@hotmail.com

3 Centro de Diagnóstico Veterinário CDAPVET, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: osimarsanches@yahoo.com.br

4 Departamento de Ciências Funcionais, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: inesgiometti@unoete.br; calie@unoeste.br; hermann@unoeste.br*

* Autor para correspondência.

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes mananoligossacarídeos (MOS) sobre o perfil endócrino e reprodutivo de ratos Wistar em crescimento. Para a realização do estudo, foram utilizados 128 ratos machos com idade de 23 dias, pesando aproximadamente 45 gramas de massa corporal e divididos em quatro grupos experimentais (n = 32): Grupo controle [dieta basal]; Grupo MOS 1 [dieta basal + 1g de MOS 1 (composto derivado da parede celular da levedura Saccharomyces cerevisae, cepa 1026, composta de 17% de α-mananos), por kg da dieta]; Grupo MOS 2 [dieta basal + 0,4g de MOS 2 (composto de fração ativa, α-1,3 e α-1,6, mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α-manose), por kg da dieta]; e Grupo MOS 3 [dieta basal + 1g de MOS 3 (composto por β-glucanos, mananos, polímeros de manose, quitinas (polímeros de glucosamina) e galactanos (polímeros de galactose), derivado de uma cepa de levedura Saccharomyces cerevisae), por kg da dieta]. As dietas sólidas e hídricas foram fornecidas ad libitum durante todo período experimental de 56 dias. As avaliações histológicas do sistema reprodutor (testículos e glândulas adrenais) assim como as dosagens dos hormônios cortisol e testosterona, foram realizadas em quatro períodos experimentais. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 4x4 (4 tratamentos x 4 períodos de coleta: 14, 28, 42 e 56 dias após o inicio da administração da ração). Para determinar se os escores dos parâmetros histológicos diferiram entre os grupos experimentais e entre os momentos, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com contrastes

pelo método de Student-Newman-Keuls. Para concentrações hormonais, os dados foram submetidos à regressão linear simples considerando o tempo em dias como variável independente e as dosagens séricas como variável dependente. Para todas as análises adotou-se nível de significância de 5%. Os grupos suplementados com MOS apresentaram maiores concentrações de testosterona, quantidades de espermátides, espermatozoides e raio dos túbulos seminíferos e menor concentração de cortisol (P<0,05). Conclui-se que os prebióticos MOS, derivados da parede celular da levedura Saccharomyces cerevisiae, em ratos púberes levaram a uma mudança na esteroidogênese, evidenciado pela diminuição de cortisol e aumento da testosterona plasmática, com uma antecipação na puberdade sexual, verificada pela maior proporção de espermátides e espermatozoides e um maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos.

Palavras-chave: Prebiótico, Levedura, Cortisol, Testosterona, Sistema Reprodutor.

Endocrine and reproductive profile in gowth males rats supplemented with prebiotics mannan oligosaccharides

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of different mannan oligosaccharides (MOS) on the endocrine and reproductive profile of growing Wistar rats. A hundred and twenty eight 23-day- old male rats, weighing 45 grams, were randomly divided into four groups (n = 8): control group [basal diet]; MOS1 Group [basal diet + 1 g MOS 1 (mannan oligosaccharide derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain 1026, composed of 17% of α-mannans), per kg diet]; MOS2 Group 2 [basal diet + 0.4 g MOS 2 (active fraction, α-1,3 and α-1,6 derived from a mannan oligosaccharides, with 30% of α-mannans), per kg diet]; and MOS3 Group [basal diet + 1 g of MOS 3 (β-glucans, mannans, mannose polymers, chitin (glucosamine polymer) and galactans (galactose polymer) derived from the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae*) per kg diet]. Food and drinking water were provided ad libitum for 56 days. Histological evaluations of the reproductive system, as well as the doses of the hormones were evaluated in four experimental periods. The design was completely randomized in a 4x4 factorial design (4 treatments x 4 collection periods: 14, 28, 42 and 56 days after the start of administration of feed). To determine whether the scores of histological parameters differ between the experimental groups and between times, he used the nonparametric Kruskal-Wallis test, with contrasts by the Student-Newman-Keuls. For hormone concentrations, the

data were submitted to linear regression considering the time in days as an independent variable and the serum levels as the dependent variable. For all analyzes we adopted a significance level of 5%. The groups supplemented with MOS showed higher testosterone concentrations, quantities of spermatozoa, sperm and radius of the seminiferous tubules and lower cortisol levels (P <0.05). It follows that prebiotics MOS derived from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae in pubescent rats led to a change in steroidogenesis, evidenced by reduction of cortisol and increased plasma testosterone with an anticipation of sexual puberty verified by a higher proportion of spermatids and sperm and the further development of the seminiferous tubules.

Keywords: Prebiotic, Yeast, Cortisol, Testosterone, Reproductive system.

Introdução

Os suplementos alimentares dietéticos quando administrados por via oral, inevitavelmente, entram em contato com a microbiota no trato gastrointestinal. O trato gastrointestinal abriga mais de 1.000 espécies microbianas, que juntas totalizam aproximadamente 100 trilhões de bactérias, o que é aproximadamente 10 vezes o número de células do corpo (Crow, 2011).

A microbiota pode transformar uma proporção considerável de suplementos em seus metabólitos correspondentes, e em muitos casos para metabólitos bioativos (prebióticos), antes que os ingredientes sejam absorvidos a partir do trato gastrointestinal (Kim, 2012). Alguns suplementos alimentares não digeríveis e classificados como prebióticos, afetam beneficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando assim a saúde do hospedeiro (Gibson *et al*., 2004). Para a determinação de efeitos em humanos, os animais, frequentemente ratos, são utilizados para determinar a natureza de um substrato de prebióticos (Rowland and Tanaka, 1993).

Os prebióticos mananoligossacarídeos (MOS) são moléculas complexas que estão ligadas a porções de proteínas presentes na parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Lesage and Bussey, 2006) e a sua administração

confere benefícios imediatos que estão associados com a fixação e remoção de possíveis agentes patogênicos do sistema digestivo (Ferket, 2003). Além disso, os benefícios dos prebióticos em humanos em crescimento inclui o estabelecimento de microbiota saudável, produção benéfica de ácidos graxos de cadeia curta, aumento da absorção de minerais, diminuição do pH intestinal e modulação da função imunológica (Czarnecki-Maulden, 2008).

Savignac *et al*. (2013) demonstraram em ratos que os prebióticos promovem o crescimento de bactérias intestinais benéficas, lactobacilos e bifidobactérias, que têm efeitos neurotrópicos e reguladores do estresse, medido pelo hormônio cortisol (Crumeyrolle-Arias *et al*., 2014). A composição da microbiota intestinal também foi reconhecida como um ponto importante para a comunicação bidirecional do eixo cérebro-intestinal, as vias neurais, imunológicas e endócrinas (Rhee *et al*., 2009; Cryan and Dinan, 2012). Os hormônios sexuais, em especial estrogênios, desempenham um papel endócrino importante na fisiopatologia do trato gastrointestinal (GI) incluindo a regulação da função motora e sensorial (Ji *et al*., 2008; Hogan *et al*., 2009).

Nesse contexto, podemos dizer que os prebióticos podem ser ferramentas únicas na geração e seleção da microbiota do cólon, influenciando as condições fisiológicas do indivíduo, apesar dos resultados serem muito preliminares (Roberfroid, 2007). É importante salientar que diversas hipóteses têm sido levantadas e que o efeito real dos prebióticos no sistema reprodutor ainda é questionável. Por isso a proposta do presente estudo, foi avaliar a ação de diferentes MOS sobre as concentrações plasmáticas de testosterona e cortisol, assim como o desenvolvimento do sistema reprodutor, mediante parâmetros histomorfométricos dos órgãos reprodutivos de ratos em fase de crescimento e desenvolvimento dos gametas masculinos.

Materiais e métodos

Animais e dietas

Para a realização do experimento foram utilizados 128 ratos machos da linhagem Wistar, com 23 dias de idade, peso corporal de 46,17 ± 4,99 g, alojados em gaiolas individuais com livre acesso à ração e água. Os animais foram mantidos em

temperatura média de 23±1°C e luminosidade controlada (12 horas de luz/escuro). O consumo da ração, água e o peso corporal foram monitorados três vezes por semana e foram utilizados para calcular o consumo alimentar acumulado (CAA), o consumo médio de água (CAG) e o ganho de peso (GP) dos animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 1175 e 1177, em 2012 (Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil).

Foram formuladas quatro rações (Tabela 1), que compuseram os tratamentos durante o período experimental de 56 dias. No grupo controle (GC), os animais foram alimentados com uma ração controle. No grupo MOS 1 (GM1), foi fornecido ração controle acrescida de 1g do produto MOS 1 (mananoligossacarídeo, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 1026, composta de 17% de α-mananos), por kg da ração. A dieta do grupo MOS 2 (GM2) foi composta da ração controle adicionada de 0,4g do produto MOS 2 (fração ativa, α-1,3 e α-1,6 mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α-mananos), por kg da ração. E por fim, a ração do grupo MOS 3 (GM3), que foi composta da ração controle incorporada com 1g do produto MOS 3 [β-glucanos, mananos, polímeros de manose, quitinas (polímeros de glucosamina) e galactanos (polímeros de galactose), derivado de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*], por kg da ração.

Tabela 1. Composição de ingredientes e nutrientes das dietas experimentais[1.]

Ingrediente (g/100g)	Composição da dieta (%)			
	GC[2]	GM1[3]	GM2[4]	GM3[5]
Milho moído	22,18	22,18	22,18	22,18
Trigo moído	22,26	22,26	22,26	22,26
Farelo de trigo	15,00	15,00	15,00	15,00
Farelo de soja (49% proteína)	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de peixe (60% proteína)	4,00	4,00	4,00	4,00
Farinha de alfafa (17% proteína)	7,50	7,50	7,50	7,50
Cascas de aveia	8,50	8,50	8,50	8,50
Celulose purificada	5,50	5,40	5,46	5,40
Óleo de milho	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo de soja	3,00	3,00	3,00	3,00
Levedura seca de cerveja	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	0,30	0,30	0,30	0,30
Fosfato de cálcio	0,40	0,40	0,40	0,40
Carbonato de cálcio	0,90	0,90	0,90	0,90

Cloreto de colina (70% de colina)	0,26	0,26	0,26	0,26
Metionina	0,20	0,20	0,20	0,20
MOS 1[6]	-	0,10	-	-
MOS 2[7]	-	-	0,04	-
MOS 3[8]	-	-	-	0,10
Premix vitamínico[9]	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix mineral[10]	0,50	0,50	0,50	0,50
Total	100	100	100	100
Composição analisada				
Proteína (%)	15,01	14,96	14,97	14,98
Gordura (%)	8,32	14,96	14,97	14,98
Fibra (%)	9,28	9,32	9,22	9,25
Carboidratos (%)	52	52	52	52
Energia (Kcal/g)	3,39	3,40	3,40	3,39

Delineamento experimental

Inicialmente, os 128 ratos foram distribuídos nos quatro grupos experimentais (n = 32). Na sequência, em cada momento de avaliação dos parâmetros hormonais e histológicos (14, 28, 42 e 56 dias após o inicio do período experimental), 8 animais de cada grupo foram retirados aleatoriamente para a realização das análises.

Para tanto, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com uma dosagem de 30 $mg.Kg^{-1}$ de peso vivo de Tiopental 50 $mg.mL^{-1}$ (Thiopentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. – São Paulo/SP, Brasil) e o sangue, colhido por punção cardíaca, foi centrifugado para obtenção do plasma e posteriormente transferido para microtubos de plástico e armazenados em freezer a - 20°C, para análise do perfil hormonal. As dosagens de cortisol e testosterona foram realizadas por *kits* comerciais pela técnica de radioimunoensaio (RIE) (Coat-a-Count, DPC, Los Angeles, CA, USA).

Após a eutanásia por exsanguinação, os órgãos, testículos e glândulas adrenais, foram retirados, pesados em balança analítica digital (Shimadzu - modelo AY220, Japan) e fixados em solução de Davidson por aproximadamente 24 horas e, posteriormente, foram lavados em água corrente e transferidos para uma solução de álcool 70% (Paiva *et al*., 2005).

Análises histológicas

As amostras colhidas foram processadas conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Com o auxílio do micrótomo rotativo, foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 5 μm de espessura de todas as amostras. Os cortes foram dispostos em lâminas e corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE) (Tolosa *et al*., 2003). Para a realização das análises microscópias dos parâmetros histológicos avaliados, utilizou-se no mínimo de 10 fotografias por rato, para cada parâmetro e na objetiva de 200x, com a câmera DM750 Leica e o software de aquisição de imagens ICC50 HD Qwin para Windows. Todos os parâmetros foram medidos com a mesma ampliação, iluminação e as fotografias foram capturadas sempre pelo mesmo técnico.

Foram feitas leituras das lâminas da glândula adrenal quanto aos parâmetros: degeneração cortical, degeneração medular, necrose cortical, necrose medular, hiperplasia cortical, adenoma e adenocarcinoma, através de escores [0: ausência; 1: alteração leve (1 a 3 campos); 2: alteração moderada (4 a 6 campos); e 3: alteração acentuada (> 6 campos).

As leituras dos testículos foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: dilatação tubular, contração tubular, degeneração do epitélio germinativo, necrose do epitélio germinativo, sertolioma, seminoma, tumor de células intersticial [0: ausência; 1: alteração leve (1 a 3 campos); 2: alteração moderada (4 a 6 campos); 3: alteração acentuada (> 6 campos)], quantidade de espermátides, quantidade de espermatozoides (0: ausência; 1: leve; 2: moderada; e 3: acentuada) e ducto seminífero (medida de raio).

Análises estatísticas

Os resultados do consumo acumulado de alimento e água, bem como o ganho de peso foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey.

Para verificar se as concentrações plasmáticas de testosterona e cortisol diferiram entre grupos tratados, foram ajustadas regressões lineares simples, nas quais se considerou o tempo em dias como variável independente e as dosagens séricas como variáveis dependentes. Os interceptos e coeficientes angulares das retas ajustadas foram comparados dois a dois entre diferentes tratamentos pelo teste t.

Os resultados das leituras das lâminas foram calculados, individualmente, através de medianas dos escores das alterações avaliadas. Para determinar se as medianas dos escores das lesões diferiram entre grupos experimentais e entre momentos, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls.

Todas as análises foram conduzidas no software Bioestat 5.3, adotando-se o nível significância de 5% (Ayres *et al*., 2007).

Resultados

Os consumos alimentares médios acumulados não diferiram entre os grupos experimentais. Da mesma forma não foi observada alteração no padrão de consumo médio de água e no ganho de peso com a inclusão dos três diferentes MOS nas dietas (Tabela 2).

Tabela 2. Consumo acumulado alimentar [CAA (g)], consumo médio de água [CAG (mL)] e ganho de peso (GP) nos ratos dos grupos: controle (GC), MOS 1 (GM1), MOS 2 (GM2) e MOS 3 (GM3). Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 8 grupo)[1].

Variáveis	GC	GM1	GM2	GM3
CAA	1053,71 ± 38,85	994,76 ± 40,51	977,97 ± 58,51	976,92 ± 60,66
CAG	26,43 ± 5,21	27,42 ± 4,98	27,87 ± 5,43	27,61 ± 4,75
GP*	550,5 ± 12,1	543,6 ± 11,7	540,8 ± 12,3	536,9 ± 9,0

GC = Grupo controle (dieta basal); GM1 = Grupo MOS 1 (dieta basal + 1g de MOS 1 [mananoligossacarídeo, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 1026, composta de 17% de α-mananos]; GM2 = Grupo MOS 2 (dieta basal + 0.4g de MOS 2 [fração ativa, α-1,3 e α-1,6 mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α-mananos]; GM3 = Grupo MOS 3 (dieta basal + 1g de MOS 3 [β-glucanos, mananos, polímeros de manose, quitinas (polímeros de glucosamina) e galactanos (polímeros de galactose), derivado de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*].
[1] Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
*Resultados expressos em porcentagem.
Fonte: Elaboração dos autores.

Com relação ao peso das glândulas adrenais, não foi encontrada diminuição significativa entre os grupos. Porém, os resultados revelaram que a ingestão de prebiótico, nos grupos GM2 e GM3, ocasionou diminuição significativa na

concentração plasmática do hormônio cortisol (Tabela 3). Os resultados da concentração do cortisol foram comparados através de regressões lineares simples ajustadas dos tratamentos (Tabela 4, Figura 1).

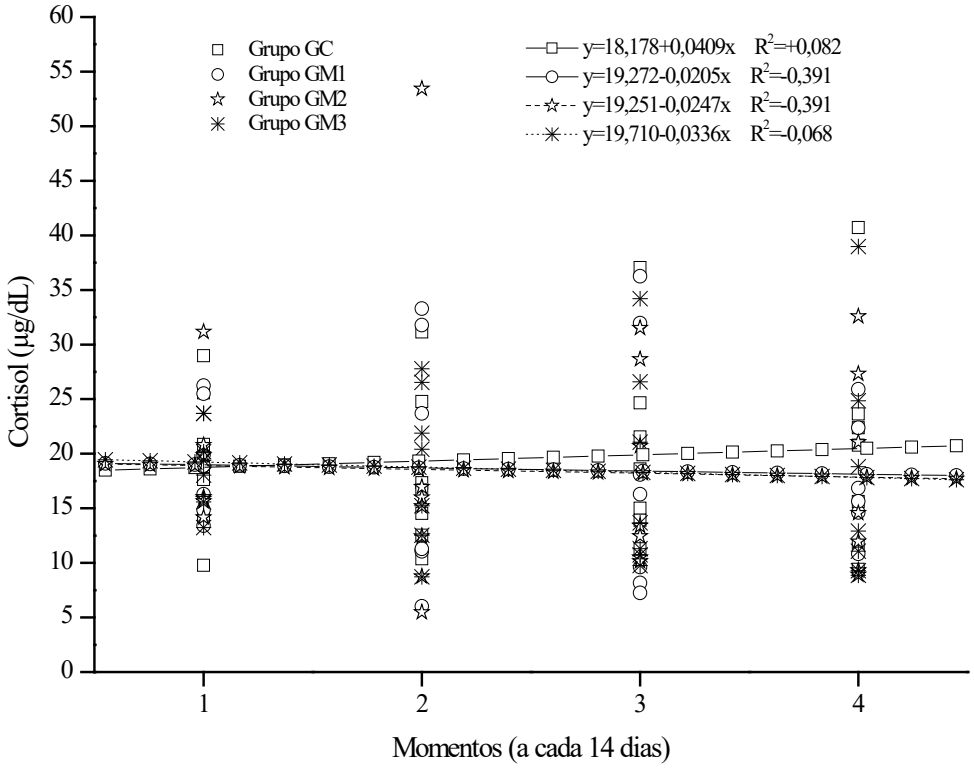
A média do peso dos testículos dos grupos suplementados com MOS não diferiu significativamente do grupo controle (Tabela 3), dentro dos momentos avaliados.

Tabela 3. Efeito da suplementação de mananoligossacarídeos na dieta, em quatro momentos amostrais, sobre o peso das glândulas adrenais e testículos e concentração de cortisol e testosterona de ratos em fase de crescimento. Valores expressos como média e desvio padrão.

Tratamentos	Momentos[1]	Glândulas Adrenais (g) [2]	Cortisol (µg/dL)	Testículos (g) [2]	Testosterona (µg/dL)
GC	1	0,0357 ± 0,0039	19,37 ± 2,48	0,4752 ± 0,0643	0,47 ± 0,13
	2	0,0353 ± 0,0067	19,29 ± 1,89	1,2584 ± 0,1054	0,51 ± 0,42
	3	0,0345 ± 0,0051	19,07 ± 2,21	1,6894 ± 0,1540	0,78 ± 0,21
	4	0,0345 ± 0,0023	19,12 ± 1,47	2,1884 ± 0,1619	1,10 ± 0,18
GM1	1	0,0460 ± 0,0127	18,20 ± 2,77	0,5563 ± 0,0727	0,63 ± 0,29
	2	0,0445 ± 0,0065	18,33 ± 4,20	1,3272 ± 0,1784	0,83 ± 0,29
	3	0,0434 ± 0,0094	19,32 ± 6,06	1,7663 ± 0,1221	1,08 ± 0,24
	4	0,0422 ± 0,0087	18,41 ± 2,70	2,2572 ± 0,1254	1,49 ± 0,30
GM2	1	0,0467 ± 0,0079	20,29 ± 3,29	0,5627 ± 0,0709	0,79 ± 0,19
	2	0,0449 ± 0,0054	18,23 ± 4,40	1,3392 ± 0,1795	1,02 ± 0,22
	3	0,0448 ± 0,0087	18,19 ± 3,36	1,7820 ± 0,1239	1,36 ± 0,47
	4	0,0438 ± 0,0087	18,19 ± 3,55	2,3692 ± 0,1736	1,81 ± 0,20
GM3	1	0,0525 ± 0,0127	20,58 ± 3,93	0,5695 ± 0,0505	0,82 ± 0,35
	2	0,0454 ± 0,0059	18,37 ± 2,01	1,3910 ± 0,1773	1,09 ± 0,39
	3	0,0452 ± 0,0056	17,96 ± 3,50	1,8463 ± 0,1660	1,63 ± 0,30
	4	0,0443 ± 0,0057	17,83 ± 4,14	2,4090 ± 0,1949	1,95 ± 0,33

[1] Momentos amostrais: 1 (14 dias); 2 (28 dias); 3 (42 dias); e 4 (56 dias) após o início do período experimental.
[2] Não houve diferença significativa entre os grupos, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 1. Regressões lineares simples, considerando-se os resultados das dosagens de cortisol (µg/dL) no plasma sanguíneo, a cada 14 dias, de ratos em crescimento e suplementados ou não com três diferentes mananoligossacarídeos adicionados na dieta.



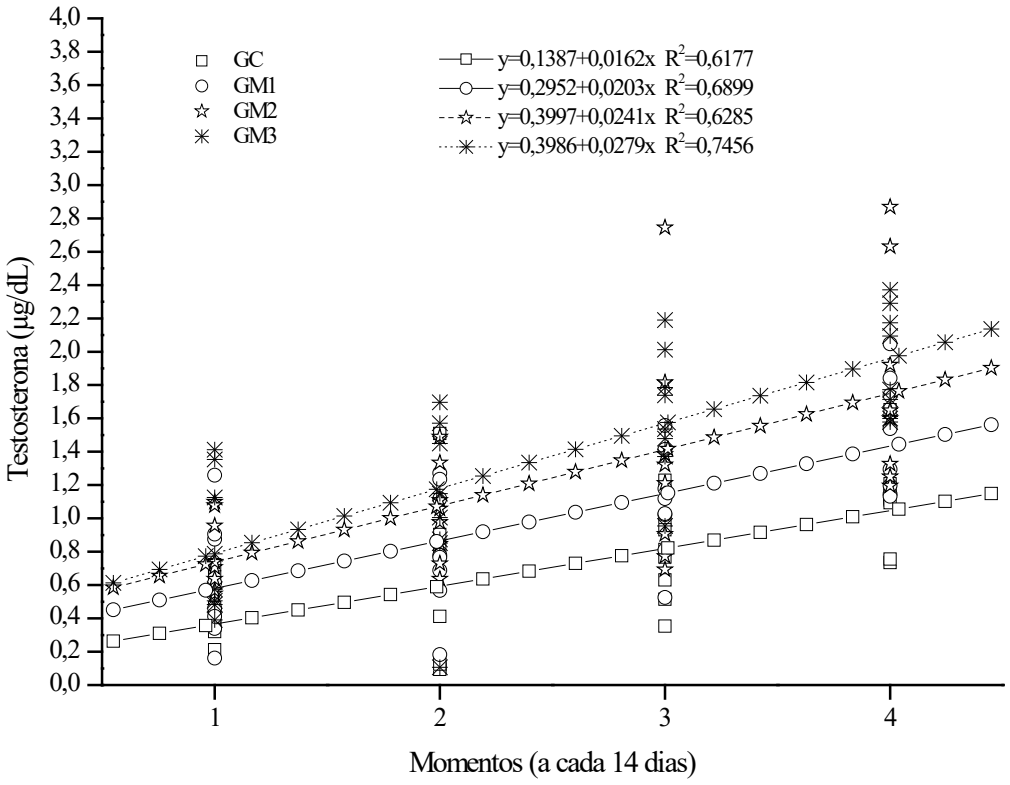
Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 4. Resultado das comparações estatísticas entre interceptos (int.) e coeficientes angulares (beta) dos modelos de regressão linear simples, considerando-se os resultados das dosagens de cortisol (µg/dL) e testosterona (µg/dL) como variável dependente e o tempo em dias como independente.

Parâmetros	Tratamentos							
	GC		GM1		GM2		GM3	
	int.	beta	int.	beta	int.	Beta	int.	Beta
Testosterona	0,1387	0,0162[A]	0,2952	0,0203[B]	0,3997	0,0241[B]	0,3986	0,0279[B]
Cortisol	18,1783	0,0409[A]	19,2725	-0,0205[B]	19,2511	-0,0247[B]	19,7103	-0,0336[B]

Parâmetros seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Regressões lineares simples, considerando-se os resultados das dosagens de testosterona (µg/dL) no plasma sanguíneo, a cada 14 dias, de ratos em crescimento e suplementados ou não com três diferentes mananoligossacarídeos adicionados na dieta.



Fonte: Elaboração dos autores.

Foram avaliadas também as frequências dos escores relativos às alterações visualizadas em cortes histológicos dos testículos (Tabela 5) e as mensurações dos raios dos túbulos seminíferos (Tabela 6). Os parâmetros medidos de degeneração cortical, degeneração medular, necrose cortical, necrose medular, hiperplasia cortical, adenoma e adenocarcinoma da glândula adrenal não apresentaram diferença significativa entre os grupos ou entre os momentos.

Os resultados das leituras dos testículos: dilatação tubular, contração tubular, degeneração do epitélio germinativo, necrose do epitélio germinativo, sertolioma, seminoma, tumor de células intersticial foram comparadas entre os grupos e entre os momentos e não revelaram diferença significativa.

No parâmetro quantidade de espermátides, houve aumento significativo entre os grupos suplementados com MOS e o grupo controle e também dentro dos momentos 1, 2 e 3. Porém, no momento 4 não foi determinada diferença estatística entre os grupos suplementados com MOS e o grupo controle. O mesmo observou-se em relação à quantidade de espermatozoides, pois os grupos suplementados com o prebiótico MOS apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle e nos momentos 2, 3 e 4 (Tabela 5).

Tabela 5. – Frequências dos escores relativos ao número de células espermáticas em cortes histológicos do testículo de ratos submetidos a quatro dietas diferentes, em quatro momentos amostrais.

Grupos	Escores relativos à quantidade de espermátides																p*
	Momentos[1]																
	M1				M2				M3				M4				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
GC	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
GM1	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
GM2	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
GM3	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
p**	0,0002				0				0,0029				1,000				

Grupos	Escores relativos à quantidade de espermatozoides																p*
	Momentos[1]																
	M1				M2				M3				M4				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
GC	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (80%)	2 (20%)	0
GM1	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	7 (70%)	0
GM2	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	3 (30%)	40 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	6 (60%)	0
GM3	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
p**	0,5767				0				0,0214				0,0035				

[1] Momentos amostrais após o início do período experimental: 1 (14 dias); 2 (28 dias); 3 (42 dias); e 4 (56 dias).
p* = valores de significância no teste de Kruskall-Wallis para comparações entre tratamentos;
p** = valores de significância no teste de Kruskall-Wallis para comparações entre momentos;
Os escores relativos foram classificados de 0 a 3, sendo 0 = ausência em 10 campos; 1= leve (1 a 3 de 10 campos); 2 = moderada (4 a 6 de 10 campos); e 3 = acentuada (> 6 de 10 campos).
Fonte: Elaboração dos autores.

No que diz respeito aos raios dos túbulos seminíferos, no presente estudo foi observada diferença estatística entre os grupos suplementados com MOS e o grupo controle nos momentos 2, 3 e 4, com maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos nos grupos tratados com MOS. (Tabela 6).

Tabela 6. Medidas dos raios dos túbulos seminíferos de testículos de ratos em crescimento suplementados com diferentes mananoligossacarídeos. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tratamentos	Momentos[1] / Túbulos Seminíferos (µm)			
	1	2	3	4
GC	30,62 ± 0,99[A*]	43,12 ± 1,32[A]	48,73 ± 1,01[A]	54,83 ± 1,86[A]
GM1	30,90 ± 0,76[A]	50,21 ± 1,85[B]	56,44 ± 1,00[B]	63,65 ± 2,76[B]
GM2	31,07 ± 0,71[A]	53,11 ± 1,30[B]	60,96 ± 2,05[B]	65,57 ± 3,32[B]
GM3	31,37 ± 0,71[A]	54,29 ± 1,23[B]	61,95 ± 1,91[B]	65,72 ± 3,15[B]

1 Momentos amostrais após o início do período experimental: 1 (14 dias); 2 (28 dias); 3 (42 dias); e 4 (56 dias).
[*]Letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.
Fonte: Elaboração dos autores.

Discussão

Apesar da diminuição do consumo alimentar dos grupos suplementados com MOS não ter sido significativa (P>0,05), estudos utilizando outro prebiótico, oligossacarídeo, revelaram que a suplementação foi associada à diminuição do consumo alimentar (Daubioul *et al*., 2002; Cani *et al*., 2009). Os prebióticos podem estar relacionados à modulação de peptídeos gastrintestinais envolvidos na regulação da ingestão de alimentos, os quais são produzidos pelas células L endócrinas do trato gastrintestinal, e a expressão dos genes pro-glucagon nestas células que leva à secreção de diferentes peptídeos, tais como GLP-1, GLP-2, grelina e oxintomodulina, envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e consumo de energia (Pereira, 2013).

Esperava-se que o consumo médio de água fosse aumentar nos grupos suplementados com prebióticos, pois a inclusão desse aditivo na dieta (Kawauchi, 2008), aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e estimula a absorção de água e eletrólitos (Kawauchi, 2008), principalmente no cólon (Elsen and Bistrian, 1991), alterando beneficamente o tempo de trânsito intestinal (Rosenfeldt *et al*., 2004) e a

produção de fezes sólidas (Elsen and Bistrian, 1991). Em ratos e humanos, a utilização de oligofrutose e inulina, exerceu um efeito osmótico no trato gastrintestinal, transferindo água para o intestino grosso (Kaur and Gupta, 2002) e aumentando o seu consumo (Diez *et al*., 1998). Em cães, Hesta *et al*. (2003) verificaram uma menor consistência das excretas e aumento do consumo de água, quando incorporaram um frutoligossacarídeo na dieta, esse resultou numa maior retenção de água.

Como observado na Tabela 2, não foi observada diminuição significativa (P>0,05) com a inclusão dos três diferentes MOS nas dietas, apesar de vários estudos, em roedores e humanos, terem constatado a esse prebiótico tal efeito (Piche *et al*., 2003), devido à benéfica modulação da microbiota intestinal, ao efeito fibra-preenchimento e a redução da absorção de gordura, mesmo com a manutenção da ingestão normal da dieta (Keithley and Swanson, 2005; Asano *et al*., 2005, 2006; Kumao and Fujii, 2006; Kumao *et al*., 2006; Ley *et al*., 2006; Takao *et al*., 2006; Roberfroid *et al*., 2010).

Os estudos realizados por Davis *et al*. (2004) e Grela *et al*. (2006) poderiam explicar as diferenças encontradas no presente estudo, pois esses autores relatam que concentração maior (0,2%) do que as que foram utilizados nesse estudo (0,04 a 0,1%) seria necessária para que o efeito quelante sobre as bactérias seja potencializado. Vandenplas *et al*. (2014) relatam que diferenças entre os prebióticos, no nosso caso, cepas de leveduras e dosagens, podem também resultar em variação no ganho de peso. Além disso, compostos diferentes nas suas frações podem não ser tão seletivos, fermentando não somente bifidobactérias e/ou lactobacilos (Mitsuoka, 1992; Mosenthin and Bauer, 2000) e diminuindo com isso o seu efeito benéfico.

Todos os grupos de animais foram submetidos às mesmas condições de manejo, visando à redução do nível de estresse e o aumento do bem-estar animal no macro e microambiente (Allmann-Iselin, 2000), contribuindo para o aumento da confiabilidade e reprodutibilidade dos dados experimentais, pois segundo Wellman (2001), o estresse contínuo, em animais, estimula as adrenais, pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), levando ao aumento de peso destas glândulas (Wellman, 2001; Bloss *et al*., 2011) e a retirada ou atenuação da fonte estressora, pode levar à diminuição da peso da adrenal em ratos (Azevedo, 1994).

A administração dos prebióticos MOS podem modular o eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (HPA) de uma forma semelhante como observada na administração direta de estirpes probióticas em roedores (Sudo *et al*., 2004; Gareau *et al*., 2007) e humanos (Messaoudi *et al*., 2011; Schmidt *et al*., 2015). Segundo Pruessner *et al*. (1997) e Kunz-

Ebrecht *et al*. (2004), a concentração do hormônio cortisol é um marcador confiável da atividade do eixo HPA e em humanos em situação de estresse, a concentração desse hormônio foi encontrado aumentado (Pruessner *et al*., 1997; Kunz-Ebrecht *et al*., 2004), assim como em indivíduos com alto risco de depressão (Mannie *et al*., 2007).

Os prebióticos utilizados atuaram beneficamente no eixo HPA, evidenciado pela diminuição do hormônio cortisol. Além disso, foi observado aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona nos grupos tratados com MOS, o que provavelmente está relacionado à diminuição dos níveis de cortisol nesses grupos, refletindo um menor estresse nesses animais. Pesquisas demonstraram que estressantes ambientais, tais como temperatura, instalações, manejo, social, etc aumentam a secreção endógena de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), levando ao aumento de peso das glândulas adrenais (Wellman, 2001; Bloss *et al*., 2011).

O hormônio ACTH estimula a adrenal a produzir cortisol e esteroides sexuais, os quais inibem ou alteram a secreção de hormônios gonadotróficos, causando problemas de infertilidade ou baixa eficiência reprodutiva (Hennessy and Williamson, 1983; Tsuma *et al*., 1996; 1998; Kirby *et al*., 2009). A alteração endócrina dos animais ocorre centralmente pela ativação do eixo HPA e consequentemente supressão da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG), por meio da inibição da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Rivier and Rivest, 1991). Essa alteração dos eixos endócrinos causa a supressão da liberação do hormônio luteinizante (LH) da hipófise (Du Ruisseau *et al*., 1979; González-Quijano *et al*., 1991), principalmente no estresse crônico (Marić *et al*., 1996), podendo acarretar na supressão do comportamento sexual (Retana-Márquez *et al*., 2003).

Outros trabalhos demonstram que o estresse agudo também pode levar a uma diminuição da testosterona sem alterar os níveis de LH (Charpenet *et al*., 1981; Mann and Orr, 1990; Marić *et al*., 1996). O estresse leva a uma diminuição das enzimas esteroidogênicas, citocromo 17 α hidroxilase (P45017α, liase) e 3β hidroxidesidrogenase (3βHSD) nas células de Leydig, responsáveis pela lise da pregnenolona e produção de androgênios, respectivamente, e consequente redução na produção de testosterona (Marić *et al*., 1996).

A média do peso dos testículos dos grupos suplementados com MOS não diferiu significativamente do grupo controle (P>0,05) (Tabela 3), dentro dos momentos avaliados. Entre os momentos não foi feita a análise estatística da média do peso dos testículos dos grupos suplementados com MOS, pois nessa espécie o desenvolvimento testicular pós-

natal começa cedo e a maturação progride de forma constante (Marty *et al*., 2003), embora a produção por unidade de peso do testículo rapidamente atinge um valor máximo (Setchell, 1978). Esse prebiótico foi estudado em aves e não resultou no aumento do peso dos testículos (Sojoudi *et al*., 2012), porém, indiretamente, acarretaram um aumento significativo (P<0,05) na concentração do hormônio testosterona no plasma sanguíneo (Tabela 3 e 4; Figura 2), pois o MOS quando adicionados à dieta, aumentam o número de bactérias probióticas ácido láticas (Van Der Wielen *et al*., 2002). Em humanos, a suplementação com MOS também acarreta o aumento direto dos níveis sanguíneos de testosterona (Poutahidis *et al*., 2014).

Ojeda *et al*. (1980) descreveram o desenvolvimento sexual de rato pós-natal do sexo masculino em quatro fases: um período neonatal desde o nascimento até 7 dias de idade, um período de dias pós-natal infantil, 8-21 um período juvenil que se estende até cerca de 35 dias de idade, e um período peripuberal até 55 a 60 dias de idade, que terminam quando espermatozóides maduros são vistos no canal deferente. Neste estudo, o aumento na quantidade de espermátides observada nos momentos 1, 2 e 3, pode ser devido à ação indireta do aumento do hormônio testosterona, permitindo que as células germinativas completassem a meiose (Walker *et al*., 2011). O mesmo se observou em relação à quantidade de espermatozoides, pois os grupos suplementados com MOS apresentaram diferença significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle e nos momentos 2, 3 e 4 (Tabela 5). Esses achados condizem com estudos prévios em que os glicocorticoides afetam a espermatogênese e podem causar parada meiótica nas células germinativas, já que os glicocorticoides têm receptores localizados nas células de Leydig e em espermatócitos na prófase I da meiose (Page *et al*., 2001; Nair *et al*., 2002).

A regulação da espermatogênese depende de hormônio folículo-estimulante (FSH) e testosterona. Enquanto o FSH tem função principal no desenvolvimento do testículo imaturo, causando a proliferação das células de Sertoli e a progressão da espermatogônia A para espermatogônia B, a testosterona sozinha pode manter a completa espermatogênese (Walker and Cheng, 2005; Wahbah *et al*., 2010). O FSH e a testosterona têm receptores nas células de Sertoli e provavelmente modulam a espermatogênese regulando a função das células de Sertoli (Sofikitis *et al*., 2008).

Juntos esses dados indicam uma antecipação da puberdade nos ratos machos tratados com prebióticos MOS, pela mudança nos eixos esteroidogênicos e pela maior espermatogênese aos 51 e 65 dias de idade.

Os resultados apresentados na Tabela 6 confirmam os dados anteriores e reforçam a hipótese de que o tratamento com o prebiótico acelerou a maturidade sexual dos ratos. Mais além, Wahbah *et al*. (2010) demonstraram que os glicocorticoides interferem negativamente na puberdade de ratos machos, a aplicação de dexametasona levou a uma desordem na morfologia dos túbulos seminíferos, apresentando membrana basal irregular e desorganizada em algumas áreas, com células do epitélio germinativo estratificado apresentando vacúolos no seu citoplasma. O período da puberdade é crítico e o cortisol tem grande influência nessa fase na secreção de testosterona e na proliferação das células de Sertoli e germinativas (Fracavilla *et al*., 2000; Wahbah *et al*., 2010).

Conclui-se que os prebióticos MOS, derivados da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em ratos púberes levaram a uma mudança na esteroidogênese, evidenciado pela diminuição de cortisol e aumento da testosterona plasmática, com uma antecipação na puberdade sexual, verificada pela maior proporção de espermátides e espermatozoides e um maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos.

Referências bibliográficas

Allmann-Iselin, I. Husbandry. In: Krinke, G. J. (2000) (Ed.). *The Laboratory Rat* “The Handbook of Experimental Animals”. Academic Press: San Diego.

Asano, I.; Fujii, S.; Kanost, M.R.; Takehara, I.; Fukuhara, I. (2006). Investigation of mannooligosaccharides blended coffee beverage on abdominal fat reduction in humans. *Japan Journal of Food Engineering,* Machida-Shi, **n. 55**, p. 93–10.

Asano, I.; Fujii, S.; Ozaki, K.; Takehara I.; Yi, N.; Fukuhara I. (2005). Effects of "Coffee Beverage" containing mannooligosaccharides from coffee on human abdominal fat by long term ingestion. *Japan Journal of Food Engineering*, Machida-Shi, **n. 6**, p. 133–141.

Ayres, M.; Ayres, J. R. M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. (2007). BioEstat 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Brasília.

Azevedo, J. R. M. (1994). Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados, durante e após exercício agudo de natação. Campinas: UNICAMP. 139p. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiológicas) - Departamento de Fisiologia e Biofísica da Univ. de Campinas.

Bloss, E. B.; Janssen, W. G.; Ohm, D. T.; Yuk, F. J.; Wadsworth, S.; Saardi, K. M.; Mcewen, B. S.; Morrison, J. H. (2011). Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, Washington, **n. 31**, p. 7831–7839.

Cani, P. D.; Possemiers, S.; Van de Wiele, T.; Guiot. Y.; Everard, A.; Rottier, O.; Geurts, L.; Naslain, D.; Neyrinck, A.; Lambert, D. M.; Muccioli, G. G.; Delzenne, N. M. (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, London, **n. 58**, p. 1091–1103.

Charpenet, G.; Tache, Y.; Forest, M. G.; Haour, F.; Saez, J. M.; Bernier, M.; Ducharme, J. R.; Collu, R. (1981). Effects of chronic intermittent immobilization stress on rat testicular androgenic function. *Endocrinology*, Washington, **v. 109**, **n. 4**, p. 1254–1258.

Crow, J. M. (2011) Microbiome: that healthy gut feeling. *Nature*, London, 480:S88e9.

Crumeyrolle-Arias M.; Jaglin M.; Bruneau A.; Vancassel, S.; Cardona**,** A.**;** Dauge, V.; Naudon, L.; Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, Madison, **n. 42**, p. 207–217.

Cryan, J. F.; Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, London, **n. 13**, p. 701-712.

Czarnecki-Maulden, G. L. (2008). Effect of dietary modulation of intestinal microbiota on reproduction and early growth. *Theriogenology*, Milan, **n. 70**, p. 286-290.

Daubioul, C.; Rousseau, N.; Demeure, R.; Gallez, B.; Taper, H.; Declerck, B.; Delzenne, N.(2002) Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, **n. 132**, p. 967–973.

Davis, M. E.; Maxwell, C. V.; Erf, G. V.; Brown, D. C.; Wistuba, T. J. (2004) Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, **v. 82, n. 6**, p. 1882-1891.

Diez, M.; Hornick, J. L.; Baldwin, P.; Van Eenaeme, C.; Istasse, L. (1998). The influence of sugar-beet fibre, guar gum and inulin on nutrient digestibility, water consumption and plasma metabolites in healthy Beagle dogs. *Research in Veterinary Science*, London, **v. 64, n. 2**, p. 91–96.

Du Ruisseau, P.; Taché, Y.; Brazeau, P.; Collu, R. (1979). Effects of chronic immobilization stress on pituitary hormone secretion, on hypothalamic factor levels, and on pituitary responsiveness to LHRH and TRH in female rats. *Neuroendocrinology*, Edinburgh, **v. 29, n. 2**, p. 90–99.

Elsen, R. J.; Bistrian, B. R. (1991) Recent developments in short-chain fatty-acid metabolism. *Nutrition*, Philadelphia, **v. 7, n. 1**, p. 7–10.

Ferket, P. R. (2003) Controlling gut health without the use of antibiotics. En: Proceedings of the 30th Annual Carolina Poultry Nutrition Conference; 2003 octubre 30, Research Triangle Park (NC, EUA): Carolina Feed Industry Association. p. 57-68.

Francavilla, S.; D'abrizio, P.; Rucci, N.; Silvano, G.; Properzi, G.; Straface, E.; Cordeschi, G.; Necozione, S.; Gnessi, L.; Arizzi, M.; Ulisse, S. (2000). Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Washington, **v.85, n.8**, p.2692-2700.

Gareau, M. G.; Jury, J.; Macqueen, G.; Sherman, P. M.; Perdue, M. H. (2007). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*, London, **n. 56**, p. 1522–1528.

Gibson, G. R.; Probert, H. M.; Van Loo, J.; Rastall, R. A.; Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, London, **n. 17**, p. 259–275.

González-Quijano, M. I.; Ariznavarreta, C.; Martín, A. I.; Treguerres, J. A.; López-Calderón, A. (1991). Naltrexone does not reverse the inhibitory effect of chronic restraint on gonadotropin secretion in the intact male rat. *Neuroendocrinology*, Edinburgh, **v. 54,** n. 5, p. 447–453.

Grela, E. R.; Semeniuk, V.; Czech, A. (2006). Efficacy of fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides in piglet diets. *Medycyna Weterynaryjna*, Lublin, **v. 62, n. 7**, p. 762-766.

Hennessy, D. P.; Willianson, P. (1983). The effects of stress and of ACTH administration in hormone profiles, oestrus and ovulation. *Theriogenology*, Philadelphia, **n. 20**, p. 13-26.

Hesta, M. W.; Roosen, G. P. J.; Janssens, S.; Millet, R.; Wilde, D. E. (2003) Prebiotics affect nutrient digestibility but not faecal ammonia in dogs fed increased dietary protein levels. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, **n. 90**, p. 1007–1014.

Hogan, A. M.; Collins, D.; Baird, A. W.; Winter, D. C. (2009). Estrogen and its role in gastrointestinal health and disease. *International Journal of Colorectal Disease*, New York, **n. 24**, p. 1367-1375.

Ji, Y.; Tang, B.; Traub, R. J. (2008). The viscera motor response to colorectal distention fluctuates with the estrous cycle in rats. *Neuroscience*, New York, **n. 154**, p. 1562-1567.

Kaur, N.; Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, Karnataka, **n. 27**, p. 703-714.

Kawauchi, I. M. (2008). Farelo de glúten de milho 21 na alimentação de cães adultos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal.

Keithley, J.; Swanson, B. (2005). Glucomannan and obesity: a critical review. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, Eagan, **v. 11, n. 6**, p. 30-34.

Kim, D. H. (2012). Chemical diversity of Panax ginseng, Panax quinquifolium, and Panax notoginseng. *Journal of Ginseng Research*, Seoul, **n. 36**, p. 1-15.

Kirby, E. D.; Geraghty, A. C.; Ubuka, T.; Bentley, G.E.; Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, New York, **v. 106, n. 27**, p. 11324–11329.

Kumao, T.; Fujii, S. Mannooligosaccharides blended coffee beverage intake increases the fat level in feces. *Journal of Health Science*, Radom, **v. 52, n. 3**, p. 329–32, 2006.

Kumao, T.; Fujii, S.; Asakawa, A.; Takehara, I.; Fukuhara, I. (2006). Effect of coffee drink containing mannooligosaccharides on total amount of excreted fat in healthy adults. *Journal of Health Science*, Radom, **v. 52, n. 4**, p. 482–485.

Kunz-Ebrecht, S. R.; Kirschbaum, C.; Marmot, M.; Steptoe, A. (2004). Differences in cortisol awakening response on work days and week-ends in women and men from the Whitehall II cohort. *Psychoneuroendocrinology*, London, **n. 29**, p. 516–528.

Lesage, G.; Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, **n. 70**, p. 317–343.

Ley, R. E.; Peterson, D. A.; Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, New York, **v. 124**, p. 837–848.

Mann, D. R.; Orr, T. E. (1990). Effect of restraint stress on gonadal proopiomelanocortin peptides and the pituitary-testicular axis in rats. *Life Sciences*, Columbus, **v. 46, n. 22**, p. 1601-1609.

Mannie, Z. N.; Harmer, C.; Cowen, P. J. (2007). Increased waking salivary cortisol levels in young people at familial risk of depression. *The American Journal of Psychiatry*, Arlington, **n. 164**, p. 617–621.

Marić, D.; Kostić, T.; Kovačević, R. (1996). Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Oberschleissheim, **v. 58, n. 3**, p. 351-355.

Marty, M. S.; Chapin, R. E.; Parks, L. G.; Thorsrud, B. A. (2003). Development and Maturation of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research (Part B)*, Hoboken, **n. 68**, p. 125–136.

Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Violle, N.; Javelot, H.; Desor, D.; Nejdi, A.; Brisson, J. F.; Rougeot, C.; Pichelin, M.; Cazaubiel, M.; Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, **n. 105**, p. 755–764.

Mete, F.; Kilic, E.; Somay, A. (2012). Effects of heat stress on endocrine functions & behavior in the pre-pubertal rat. *The Indian Journal of Medical Research*, New Delhi, v.135, n.2, p.233-239.

Mitsuoka, T. (1992). Intestinal flora and aging. *Nutrition Reviews*, Hoboken, **v. 50, n. 12**, p. 438-446.

Mosenthin, R.; Bauer, E. (2000). The potential use of prebiotics in pig nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul. Proceedings... Seoul: Seoul National University, p.515-528.

Nair, A. K.; Kash, J. C.; Peegel, H.; Menon, K. M. (2002). Post-transcriptional regulation of luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary by a novel mRNA-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, Rockville, **v. 277**, p. 21468–21473.

Ojeda, S.; Andrews, W.; Advis, J.; White, S. (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Reviews*, Washington, **v. 1**, p. 228–257.

Page, K. C.; Sottas, C. M.; Hardy, M. P. (2001). Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. *Journal of Andrology*, Schaumburg, **v. 22, n. 6**, p. 973-980.

Paiva, F. P.; Maffili, V. V.; Santos, A. C. S. (2005). Curso de manipulação de animais de laboratório. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador – BA, maio. Disponível em: http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio_apostila.pdf.

Pereira, J. A. R. (2013). Respostas metabólicas em camundongos submetidos à dieta indutora de obesidade alimentados com iogurtes probióticos e yacon (*Smallanthus sonchifolius*). 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Piche, T.; Des Varannes, S. B.; Sacher-Huvelin, S.; Holst, J. J.; Cuber, J. C.; Galmiche, J. P. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*, Bethesda,. **n. 124**, p. 894–902.

Poutahidis, T.; Springer, A.; Levkovich, T.; QI, P.; Varian, B. J.; Lakritz, J. R.; Ibrahim, Y. M.; Chatzigiagkos, A.; Alm, E. J.; Erdman, S. E. (2014). Probiotic Microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *PLoS One*, Cambridge, **v. 9, n. 1**, e84877.

Pruessner, J. C.; Wolf, O. T.; Hellhammer, D. H.; Buske-Kirschbaum, A.; Von Auer, K.; Jobst, S.; Kaspers, F.; Kirschbaum, C. (1997). Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sciences*, Columbus, **n. 61**, p. 2539–2549.

Queipo-Ortuño, M. I.; Seoane, L. M.; Murri, M.; Pardo, M.; Gomez-Zumaquero, J. M.; Cardona, F.; Tinahones, F. J. (2013). Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One*, Cambridge, **v. 8, n. 5**, e65465.

Rao, G. N. (1996). New diet (NTP-2000) for rats in the National Toxicology Program toxicity and carcinogenicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, Oxford, **n. 32**, p. 102–108.

Retana-Márquez, S.; Bonilla-Jaime, H.; Vazquez-Palacios, G.; Martinez-Garcia, R.; Velazquez-Moctezuma, J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior*, Atlanta, **v. 44, n. 4**, p. 327–337.

Rhee, S. H.; Pothoulakis, C.; Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, Hampshire, **n. 6**, p. 306-314.

Rivier, C; Rivest, S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*, Madison, **v. 45, n. 4**, p. 523–532.

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, **n. 137**, p. 830S–837S.

Roberfroid, M.; Gibson, G. R.; Hoyles, L.; Mccartney, A. L.; Rastall, R.; Rowland, I. (2010). Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, **n. 104**, p. S1–63.

Rosenfeldt, V.; Benfeldt, E.; Valerius, N; H., Paerregaard, A.; Michaelsen, K. F. (2004). Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatrics*, Burlington, **v. 145**, p. 5, p. 612–616.

Rowland, I. R.; Tanaka, R. (1993). The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, Washington, **n. 74**, p. 667-674.

Savignac, H. M.; Corona G.; Mills, H.; Chen, L.; Spencer, J. P.; Tzortzis, G.; Burnet, P. W. (2013). Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N- methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine. *Neurochemical Research*, Heidelberg, **n. 63**, p. 756–764.

Schmidt, K.; Cowen, P.J.; Harmer, C.J.; Tzortzis, G.; Errington, S.; Burnet, P.W. (2015) Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. Psychopharmacology, Berlin, **v. 232, n. 10**, p. 1793-801.

Setchell, B. P. (1978). Spermatogenesis. In: THE MAMMALIAN TESTIS. Ithaca, NY: Cornell University Press. p.181–232.

Sojoudi, M. R.; Dadashbeiki, M.; Bouyeh, M. (2012). Effect of different levels of prebiotics TechnoMos on carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, Cairo, **v. 2, n. 7**, p. 6778-6794.

Sudo N.; Chida Y., Aiba Y., Sonoda, J.; Oyama, N.; Yu, X.-N.; Kubo, C.; Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, Cambridge, **n. 558**, p. 263–275.

Takao I., Fujii S., Ishii A., Han, L. K., Toshio, K, Ozaki, K.; Asakawa, A. (2006). Effects of mannooligosaccharides from coffee mannan on fat storage in mice fed a high fat diet. *Journal of Health Science*, Radom, **v. 52, n. 3**, p. 333–7.

Tolosa, E. M. C.; Rodrigues, C. J.; Behmer, O. A.; Neto, A. G. F. (2003). Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Manole.

Tsuma V.T., Einarsson S., Madej A., Kindahl H., Lundheim N. (1996). Effect of food deprivation during early pregnancy on endocrine changes in primiparous sows. *Animal Reproduction Science*, Cambridge, **n. 41**, p. 267-278.

Tsuma, V. T.; Einarsson, S.; Madej, A.; Forsberg, M.; Lundheim, N. (1998). Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lacting sows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Copenhagen, **n. 39**, p. 71-76.

Van Der Wielen, P. W.; Lipman, L. J.; Van Knapen, F.; Biesterveld, S. (2002). Competitive exclusion of Salmonella enterica serovar Enteritidis by Lactobacillus crispatus and Clostridium lactatifermentans in a sequencing fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **n. 68**, p. 555–559.

Vandenplas, Y.; De Greef, E.; Veereman, G. (2014). Prebiotics in infant formula. *Gut Microbes*, London, **v. 5, n. 6**, p. 681-687.

Walker, W. H. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, Washington, **v. 1, n. 2**, p. 116–120.

Walker, W. H.; Cheng, J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction, Nottingham, **v. 130, n. 1**, p. 15-28.

Wellman, C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *Journal of Neurobiology*, Washington, **v. 49, n. 3**, p. 245–253.

Tabela 1. Composição de ingredientes e nutrientes das dietas experimentais[1].

Ingrediente (g/100g)	Composição da dieta (%)			
	GC[2]	GM1[3]	GM2[4]	GM3[5]
Milho moído	22,18	22,18	22,18	22,18
Trigo moído	22,26	22,26	22,26	22,26
Farelo de trigo	15,00	15,00	15,00	15,00
Farelo de soja (49% proteína)	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de peixe (60% proteína)	4,00	4,00	4,00	4,00
Farinha de alfafa (17% proteína)	7,50	7,50	7,50	7,50
Cascas de aveia	8,50	8,50	8,50	8,50
Celulose purificada	5,50	5,40	5,46	5,40
Óleo de milho	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo de soja	3,00	3,00	3,00	3,00
Levedura seca de cerveja	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	0,30	0,30	0,30	0,30
Fosfato de cálcio	0,40	0,40	0,40	0,40
Carbonato de cálcio	0,90	0,90	0,90	0,90
Cloreto de colina (70% de colina)	0,26	0,26	0,26	0,26
Metionina	0,20	0,20	0,20	0,20
MOS 1[6]	-	0,10	-	-
MOS 2[7]	-	-	0,04	-
MOS 3[8]	-	-	-	0,10
Premix vitamínico[9]	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix mineral[10]	0,50	0,50	0,50	0,50
Total	100	100	100	100
Composição analisada				
Proteína (%)	15,01	14,96	14,97	14,98
Gordura (%)	8,32	14,96	14,97	14,98
Fibra (%)	9,28	9,32	9,22	9,25
Carboidratos (%)	52	52	52	52
Energia (Kcal/g)	3,39	3,40	3,40	3,39

[1] Adaptado de Rao (1996); [2] Grupo controle; [3] Grupo MOS 1; [4] Grupo MOS 2; [5] Grupo MOS 3; [6] Mananoligossacarídeo, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 1026, composta de 17% de α-mananos; [7] Fração ativa, α-1,3 e α-1,6 mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α-mananos; [8] β-glucanos, mananos, polímeros de manose, quitinas (polímeros de glucosamina) e galactanos (polímeros de galactose), derivado de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*; [9] Premix vitamínico/kg: ácido nicotínico, 23 mg; pantotenato, 10 mg; piridoxina, 6,3 mg; tiamina, 4 mg; riboflavina, 3,3 mg; ácido fólico, 1,1 mg; biotina, 0,2 mg; vitamina B12, 52mg; vitamina E, 75UI; vitamina A, 4000UI; vitamina D3, 1.000 UI; vitamina K, 1 mg; colina, 1000 mg; com farelo de trigo como veículo; e [10] Premix mineral mg/kg: magnésio, 514; ferro, 35; zinco, 12; manganês, 10; cobre, 2; iodo, 0,2; crômio 0,2; carbonato de cálcio como veículo.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 2. Consumo acumulado alimentar [CAA (g)], consumo médio de água [Ca (mL)] e ganho de peso (GP) nos ratos dos grupos: controle (GC), MOS 1 (GM1), MOS 2 (GM2) e MOS 3 (GM3). Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 8 grupo)[1].

Variáveis	GC	GM1	GM2	GM3
CAA	1053,71 ± 38,85	994,76 ± 40,51	977,97 ± 58,51	976,92 ± 60,66
Ca	26,43 ± 5,21	27,42 ± 4,98	27,87 ± 5,43	27,61 ± 4,75
GP*	550,5 ± 12,1	543,6 ± 11,7	540,8 ± 12,3	536,9 ± 9,0

GC = Grupo controle (dieta basal); GM1 = Grupo MOS 1 (dieta basal + 1g de MOS 1 [mananoligossacarídeo, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 1026, composta de 17% de α-mananos]; GM2 = Grupo MOS 2 (dieta basal + 0.4g de MOS 2 [fração ativa, α-1,3 e α-1,6 mananoproteína, derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α-mananos]; GM3 = Grupo MOS 3 (dieta basal + 1g de MOS 3 [β-glucanos, mananos, polímeros de manose, quitinas (polímeros de glucosamina) e galactanos (polímeros de galactose), derivado de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*].
[1] Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
*Resultados expressos em porcentagem.
Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 3. Efeito da suplementação de mananoligossacarídeos na dieta, em quatro momentos amostrais, sobre o peso das glândulas adrenais e testículos e concentração de cortisol e testosterona de ratos em fase de crescimento. Valores expressos como média e desvio padrão.

Tratamentos	Momentos[1]	Glândulas Adrenais (g) [2]	Cortisol (µg/dL)	Testículos (g) [2]	Testosterona (µg/dL)
GC	1	0,0357 ± 0,0039	19,37 ± 2,48	0,4752 ± 0,0643	0,47 ± 0,13
	2	0,0353 ± 0,0067	19,29 ± 1,89	0,5563 ± 0,0727	0,51 ± 0,42
	3	0,0345 ± 0,0051	19,07 ± 2,21	0,5627 ± 0,0709	0,78 ± 0,21
	4	0,0345 ± 0,0023	19,12 ± 1,47	0,5695 ± 0,0505	1,10 ± 0,18
GM1	1	0,0460 ± 0,0127	18,20 ± 2,77	1,2584 ± 0,1054	0,63 ± 0,29
	2	0,0445 ± 0,0065	18,33 ± 4,20	1,3272 ± 0,1784	0,83 ± 0,29
	3	0,0434 ± 0,0094	19,32 ± 6,06	1,3392 ± 0,1795	1,08 ± 0,24
	4	0,0422 ± 0,0087	18,41 ± 2,70	1,3910 ± 0,1773	1,49 ± 0,30
GM2	1	0,0467 ± 0,0079	20,29 ± 3,29	1,6894 ± 0,1540	0,79 ± 0,19
	2	0,0449 ± 0,0054	18,23 ± 4,40	1,7663 ± 0,1221	1,02 ± 0,22
	3	0,0448 ± 0,0087	18,19 ± 3,36	1,7820 ± 0,1239	1,36 ± 0,47
	4	0,0438 ± 0,0087	18,19 ± 3,55	1,8463 ± 0,1660	1,81 ± 0,20
GM3	1	0,0525 ± 0,0127	20,58 ± 3,93	2,1884 ± 0,1619	0,82 ± 0,35
	2	0,0454 ± 0,0059	18,37 ± 2,01	2,2572 ± 0,1254	1,09 ± 0,39
	3	0,0452 ± 0,0056	17,96 ± 3,50	2,3692 ± 0,1736	1,63 ± 0,30
	4	0,0443 ± 0,0057	17,83 ± 4,14	2,4090 ± 0,1949	1,95 ± 0,33

[1] Momentos amostrais: 1 (14 dias); 2 (28 dias); 3 (42 dias); e 4 (56 dias) após o início do período experimental.
[2] Não houve diferença significativa entre os grupos, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.
Fonte: Elaboração dos autores.

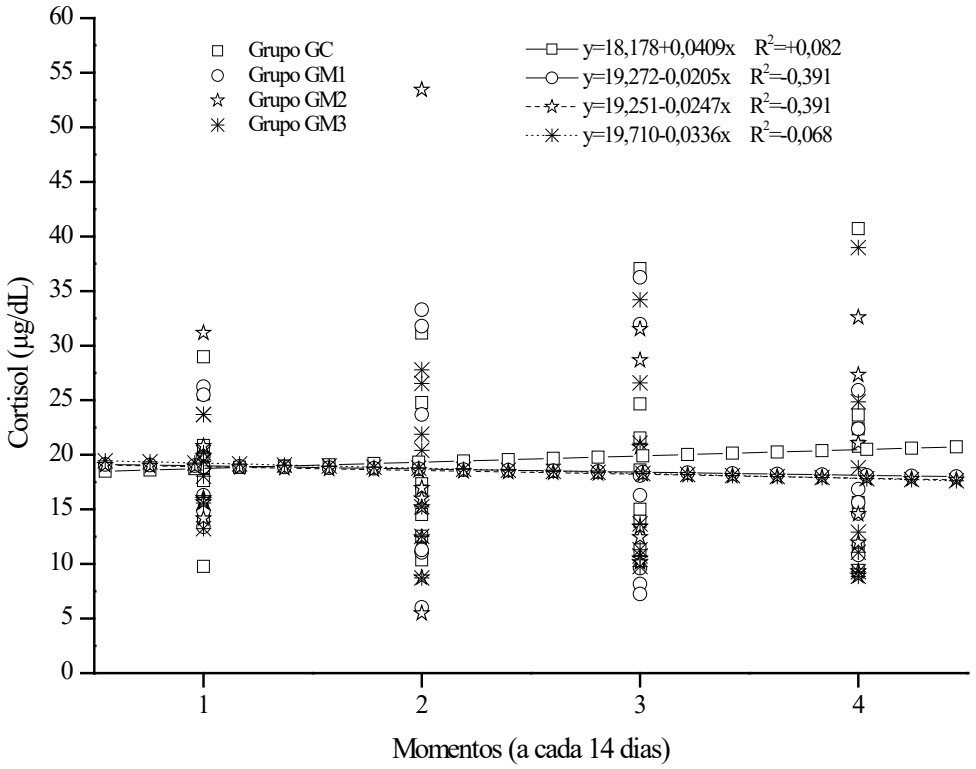
Tabela 4. Resultado das comparações estatísticas entre interceptos (int.) e coeficientes angulares (beta) dos modelos de regressão linear simples, considerando-se os resultados das dosagens de cortisol (µg/dL) e testosterona (µg/dL) como variável dependente e o tempo em dias como independente.

Parâmetros	Tratamentos							
	GC		GM1		GM2		GM3	
	int.	beta	int.	beta	int.	beta	int.	beta
Testosterona	0,1387	0,0162[A]	0,2952	0,0203[B]	0,3997	0,0241[B]	0,3986	0,0279[B]
Cortisol	18,1783	0,0409[A]	19,2725	-0,0205[B]	19,2511	-0,0247[B]	19,7103	-0,0336[B]

Parâmetros seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

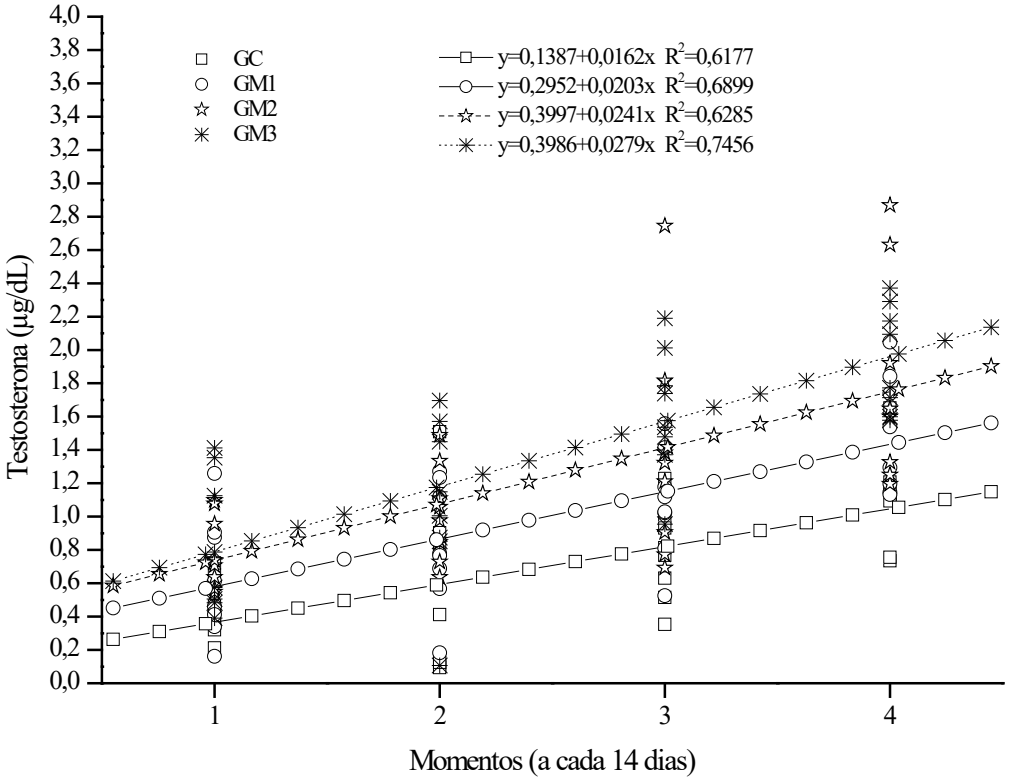
Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 1. Regressões lineares simples, considerando-se os resultados das dosagens de cortisol (µg/dL) no plasma sanguíneo, a cada 14 dias, de ratos em crescimento e suplementados ou não com três diferentes mananoligossacarídeos adicionados na dieta.



Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Regressões lineares simples, considerando-se os resultados das dosagens de testosterona (µg/dL) no plasma sanguíneo, a cada 14 dias, de ratos em crescimento e suplementados ou não com três diferentes mananoligossacarídeos adicionados na dieta.



Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 5. – Frequências dos escores relativos ao número de células espermáticas em cortes histológicos do testículo de ratos submetidos a quatro dietas diferentes, em quatro momentos amostrais.

Grupos	Escores relativos à quantidade de espermátides																p*
	Momentos[1]																
	M1				M2				M3				M4				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
GC	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
GM1	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
GM2	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
GM3	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
p**	0,0002				0				0,0029				1,000				

Grupos	Escores relativos à quantidade de espermatozoides																p*
	Momentos[1]																
	M1				M2				M3				M4				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
GC	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (80%)	2 (20%)	0
GM1	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	7 (70%)	0
GM2	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	3 (30%)	40 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	6 (60%)	0
GM3	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0
p**	0,5767				0				0,0214				0,0035				

[1] Momentos amostrais após o início do período experimental: 1 (14 dias); 2 (28 dias); 3 (42 dias); e 4 (56 dias).
p* = valores de significância no teste de Kruskall-Wallis para comparações entre tratamentos;
p** = valores de significância no teste de Kruskall-Wallis para comparações entre momentos;
Os escores relativos foram classificados de 0 a 3, sendo 0 = ausência em 10 campos; 1= leve (1 a 3 de 10 campos); 2 = moderada (4 a 6 de 10 campos); e 3 = acentuada (> 6 de 10 campos).
Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 6. Medidas dos raios dos túbulos seminíferos de testículos de ratos em crescimento suplementados com diferentes mananoligossacarídeos. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tratamentos	Momentos[1] / Túbulos Seminíferos (µm)			
	1	2	3	4
GC	30,62 ± 0,99[A*]	43,12 ± 1,32[A]	48,73 ± 1,01[A]	54,83 ± 1,86[A]
GM1	30,90 ± 0,76[A]	50,21 ± 1,85[B]	56,44 ± 1,00[B]	63,65 ± 2,76[B]
GM2	31,07 ± 0,71[A]	53,11 ± 1,30[B]	60,96 ± 2,05[B]	65,57 ± 3,32[B]
GM3	31,37 ± 0,71[A]	54,29 ± 1,23[B]	61,95 ± 1,91[B]	65,72 ± 3,15[B]

1 Momentos amostrais após o início do período experimental: 1 (14 dias); 2 (28 dias); 3 (42 dias); e 4 (56 dias).
[*]Letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.
Fonte: Elaboração dos autores.

ANEXO A – Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

22/06/2015 Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado **"O EFEITO DO PREBIÓTICO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TESTOSTERONA E CORTISOL EM RATTUS NOVERGICUS LINHAGEM WISTAR"**, cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº **1175** e tendo como participante(s) **HERMANN BREMER NETO (responsável), CALIE CASTILHO SILVESTRE (docente), GABRIEL ZANUTO SAKITA (discente), MARCELO WAINER MOTTA ABDELNUR (discente), SORAIA YOUNAN COLUNA (discente)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 22 de Junho de 2015.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

Profª Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**O EFEITO DO PREBIÓTICO SOBRE O APARELHO REPRODUTOR DE RATTUS NOVERGICUS LINHAGEM WISTAR**", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº **1177** e tendo como participante(s) **HERMANN BREMER NETO (responsável), CALIE CASTILHO SILVESTRE (docente), GABRIEL ZANUTO SAKITA (discente), KAREN CRISTINE DA SILVA (discente), SORAIA YOUNAN COLUNA (discente)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 22 de Junho de 2015.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

Profª Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA

REVISTA SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS
ISSN: 1676-546X

Normas para publicação

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente **traduzidos para o inglês.**

Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

American Journal Experts
Editage
Elsevier
http://www.proof-reading-service.com
http://www.academic-editing-services.com/
http://www.publicase.com.br/formulario.asp

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** dessa correção na página de submissão em "**Docs. Sup**."

OBSERVAÇÕES:

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados

observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento cientifico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação; b) Não tenha sido realizado o **cadastro completo** de todos os autores nos metadados de submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função

c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;

d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar "**Docs. Sup**." no ato da submissão;

e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)

f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

RESTRIÇÃO POR ÁREA:

PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já padronizados ou que não forneçam novas informações na área;

b) Os experimentos de campo não incluam dados de pelo menos dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;

c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;

d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;

e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não em fronteiras políticas.

PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

a) A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do conhecimento para a área relacionada.

Categorias dos Trabalhos

a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;

b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;

b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;

c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Alem disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em "Docs Supl." na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo titulo.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: **Fonte:** IBGE (2014), ou **Source**: IBGE (2014).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos**... *Áreas de estudo...1. Área rural...2.Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1.Título do trabalho*,* acompanhado de sua tradução para o inglês.

2.Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3.Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4.Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.

b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.

c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha^{-1}. Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.

d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L^{-1}, e não g.L^{-1} ou gL^{-1}.

e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que .....

b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....

c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....

d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).

e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espacejamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

E**x**: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes**. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem

divisão de tópicos, porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados e discussão (podem ser incluídas tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, resultados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agronômico, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da revista mediante convite de membro(s) do comitê editorial da Revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "*Ad hoc*" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.

2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (http://www.uel.br/revistas/uel).

4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

6. Numero de autores: Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas

que tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a **formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO**.
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão**.

Utilize o botão "**incluir autor**"

1. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: titulo em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.
2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.
2. **Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar** "**Docs. Sup**."

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Semina: Ciências Agrárias
Londrina - PR
ISSN 1676-546X
E-ISSN 1679-0359
semina.agrarias@uel.br

1.1.1 Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Informo que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplentares serão carregados, ESTANDO CIENTE que a**formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DO MÉRITO**.
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no processo de submissão**.

Utilize o botão "**incluir autor**"

4. **No passo seguinte preencher os metadados em inglês.**

   Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em portugues, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: titulo em ingles, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

5. A **identificação de autoria** do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.

6. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB).

   O texto está em espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL);

   O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

7. Atesto que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação por Comitê de Ética e Termo de Livre consentimento caso sejam solicitados. Tendo sido citado no texto a obediência aos preceitos éticos cabíveis.

8. Deve ser incluído no campo **COMENTÁRIOS PARA O EDITOR**, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas

9. **Taxa de Submissão de novos artigos**

1.1.2 Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. Nesses casos, os artigos, depois de adequados, deverão ser submetidos a nova apreciação.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

1.1.3 Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.