



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE
ANIMAL**

MARCELO FERNANDES TRIBST

**EFEITOS DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS NA QUALIDADE ÓSSEA DE RATOS
EXPOSTOS AO TABAGISMO PASSIVO CRÔNICO: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS
RANDOMIZADOS**

Presidente Prudente – SP
2018



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE
ANIMAL**

MARCELO FERNANDES TRIBST

**EFEITOS DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS NA QUALIDADE ÓSSEA DE RATOS
EXPOSTOS AO TABAGISMO PASSIVO CRÔNICO: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS
RANDOMIZADOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Presidente Prudente – SP
2018

636.213
S729u

Tribst, Marcelo Fernandes.

Efeitos dos alimentos funcionais na qualidade óssea de ratos expostos ao tabagismo passivo crônico: estudos pré-clínicos randomizados / Marcelo Fernandes Tribst. – Presidente Prudente, 2018.

47f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

1. Tabagismo Passivo. 2. Alimentos Funcionais. 3. Tecido ósseo. 4. Probiótico. 5. Prebiótico. 6. Simbiótico.
I. Título.

MARCELO FERNANDES TRIBST

**EFEITOS DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS NA QUALIDADE ÓSSEA DE
RATOS EXPOSTOS AO TABAGISMO PASSIVO CRÔNICO: ESTUDOS PRÉ-
CLÍNICOS RANDOMIZADOS**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Profa. Dra. Regina Celi Trindade Camargo
Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual Paulista – UNESP
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual Paulista - UNESP
Presidente Prudente – SP

Profa. Dra. Rogéria Keller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Luis Souza Lima Souza Reis
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me dando coragem, conforto, paciência, perseverança, iluminando o meu caminho e me dando sabedoria e discernimento nesta almejada conquista.

Dedico aos meus pais Dimas Tribst (em memória) e Maria Celia Tribst, que sempre foram exemplo de trabalho e dedicação.

Dedico a minha amada esposa Marcelina, que sempre me apoio, colaborando e incentivando na travessia desse longo caminho.

Aos meus filhos queridos, Catarina, Marcela e Lucas, que foram combustíveis para enfrentar e concluir esse projeto tão esperado em minha de vida.

Aos meus amigos que não mediram esforços em me ajudar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, por seus ensinamentos e orientação segura, por seu exemplo de profissional competente, por seu caráter e integridade e pela oportunidade desta tese.

Ao caro amigo Helliard Rodrigues dos Santos Caetano, agradeço pela amizade, apoio e dedicação.

Aos colegas Weber Gutemberg Alves de Oliveira e Marco Rufino pela ajuda, amizade e apoio.

Aos Profs. Dr. José Carlos Camargo e Dra. Regina Trindade - Departamento de Fisioterapia da UNESP - Presidente Prudente, agradeço pelas orientações e estímulo.

Ao Prof. Dr. Mario Jeferson Quirino Louzada, da Universidade do Estado de São Paulo (Unesp / Araçatuba), pelo empenho dedicado aos ensaios de Biomecânica.

À secretária Keid Ribeiro Kruger, pela ajuda e dedicação.

A todos os docentes do Programa de Pós Graduação de Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, pela amizade, ensinamentos e incentivo.

"O que não se tem ou o que não se sabe, também a outro não se poderia dar ou ensinar".

"Calarei os maldizentes continuado a viver bem; eis o melhor uso que podemos fazer da maledicência"

(Platão)

RESUMO

Efeitos dos alimentos funcionais na qualidade óssea de ratos expostos ao tabagismo passivo crônico: estudos pré-clínicos randomizados

O tabagismo é uma preocupação global devido ao impacto na saúde pública, particularmente em causar doenças crônicas e sofrimento de milhões de pessoas e é uma das principais causas de mortes evitáveis em todo o mundo. Estima-se em US\$ 422 bilhões o custo global anual dos serviços de saúde associados ao tabagismo, equivalente a US\$ 56,34 por pessoa. Isso representa 5,7% do gasto total em saúde no mundo. A mistura da fumaça do cigarro contém por volta de 4.700 substâncias tóxicas que estão associados à diminuição de massa óssea e influenciando no processo de consolidação e remodelação óssea. O tecido ósseo por ser multifuncional e sujeito a diferenciação celular em diferentes estágios de desenvolvimento é mais susceptível a receber a ação deletéria da nicotina, principal agente agressor da fumaça do cigarro. Os alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, devido sua capacidade de melhorar a absorção intestinal e competir com microrganismos patogênicos podem contribuir para a melhora da qualidade óssea. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação na dieta de suplementos alimentares: probiótico, prebiótico e simbiótico, na composição mineral, histomorfometria, propriedades biomecânicas e dimensão fractal do fêmur de ratos em fase de crescimento, expostos cronicamente a fumaça do cigarro (PT). Sessenta e quatro ratos machos jovens foram randomicamente distribuídos em oito grupos (n=8): controle (C) [dieta basal (DB)]; probiótico (Pro) [DB + probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada)]; prebiótico (Pre) [DB + prebiótico (mananoligossacarídeo)]; simbiótico (Sym) (DB + probiótico + prebiótico); controle fumante (CT) [DB + protocolo de exposição ao tabagismo passivo (PT)]; probiótico fumante (ProT) (DB + probiótico + PT); prebiótico fumante (PreT) (DB + prebiótico + PT); e simbiótico fumante (SymT) (DB + prebiótico + probiótico + PT). Os ratos foram sacrificados após a 189 dias de período experimental e os resultados revelaram que a suplementação com probióticos, prebióticos e simbióticos melhoraram significativamente (P<0,05) os parâmetros: P, Ca, Mg, DMO, CMO, resistência, resiliência, dimensão fractal e tamanho da área das diáfises dos fêmures dos ratos expostos cronicamente ou não a fumaça do cigarro. Concluímos que a suplementação dos alimentos funcionais, probiótico, prebiótico ou simbiótico, melhorou a saúde óssea de ratos em fase de crescimento expostos cronicamente a fumaça do cigarro.

Palavras-chave: Composição mineral; Histomorfometria; Propriedades Biomecânicas; Dimensão Fractal.

ABSTRACT

Effects of functional foods tissue of rats bone chronically exposed to cigarette smoke: studies pre-clinical randomized

Smoking is a global concern because of the impact on public health, particularly in causing chronic illness and suffering for millions of people and is a leading cause of preventable deaths worldwide. The global annual cost of health services associated with smoking is estimated at US\$ 422 billion, equivalent to US\$ 56.34 per person. This represents 5.7% of total health expenditure in the world. The blend of cigarette smoke contains around 4.7000 toxic substances that are associated with decreased bone mass and influencing the process of bone healing and remodeling. Bone tissue being multifunctional and subject to cell differentiation at different stages of development is more susceptible to receiving the deleterious action of the main smoking agent of cigarette smoke. Functional, probiotic, prebiotic and symbiotic foods due to their ability to improve intestinal absorption and compete with pathogenic microorganisms may contribute to the improvement of bone quality. The objective of this study was to evaluate the effects of dietary supplementation of probiotic, prebiotic and symbiotic supplements on mineral composition, histomorphometry, biomechanical properties and fractal dimension of the femur of growing rats, chronically exposed to cigarette smoke (PT). Sixty-four young male rats were randomly assigned to eight groups (n = 8): control (C) [basal diet (DB)]; probiotic (Pro) [DB + probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium longum* (2-5 10^9 CFU each))], prebiotic (Pre) [DB + prebiotic (mannan oligosaccharide)], symbiotic probiotic + prebiotic + PT), prebiotic smoker (PreT) (DB + prebiotic + PT), smoker control (PT + The rats were sacrificed after 189 days of experimental period, and the results showed that probiotic, prebiotic and symbiotic supplementation improved significantly ($P < 0.05$), as well as symbiotic smoker (SymT) (DB + prebiotic + probiotic + PT). The results showed that the functional food supplementation, probiotic, prebiotic, and the presence of the functional, probiotic, optical or symbiotic improved bone health in growing rats chronically exposed to cigarette smoke.

Keywords: Mineral composition; Histomorphometry; Biomechanical properties; Fractal Dimension.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO A.....	9
2	ARTIGO CIENTÍFICO B.....	26
ANEXO 1	PARECER COMITÊ DE ÉTICA E USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO (CEUA).....	39
ANEXO 2	NORMAS PARA AUTORES: SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS.....	40

1 ARTIGO CIENTÍFICO A

2

3 **Composição mineral, histomorfometria e propriedades biomecânicas óssea são melhoradas com a**
 4 **suplementação de probióticos, prebióticos e simbióticos em ratos expostos cronicamente ao tabagismo**
 5 **passivo: estudo pré-clínico randomizado**
 6

7 **Mineral composition, histomorphometry and bone biomechanical properties are improved with**
 8 **probiotic, prebiotic and symbiotic supplementation in rats chronically exposed to passive smoking:**
 9 **randomized preclinical study**
 10

11

12 Marcelo Fernandes Tribst¹; Leticia Rocha Magalhães²; Heliard Rodrigues dos Santos Caetano¹; Weber
 13 Gutemberg Alves de Oliveira¹; Marcos Natal Rufino¹; Osimar Sanches³; Mario Jefferson Quirino Louzada⁴;
 14 Hermann Bremer-Neto¹
 15

16

RESUMO

17 A fumaça de cigarro em grandes centros é uma das causas mais importantes de doenças inflamatórias
 18 crônicas em saúde pública e esta associada à diminuição de massa óssea, processo de consolidação e
 19 remodelação óssea. Os alimentos funcionais suplementados na dieta, devido sua capacidade de melhorar a
 20 absorção intestinal e competir com microrganismos patogênicos, podem contribuir para a melhora da
 21 qualidade óssea. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de alimentos
 22 funcionais, probiótico, prebiótico ou simbiótico, na composição mineral, histomorfometria e nas
 23 propriedades biomecânicas ósseas de ratos em fase de crescimento expostos cronicamente a fumaça do
 24 cigarro (T). Sessenta e quatro ratos machos jovens foram randomicamente distribuídos em oito grupos (n=8):
 25 controle (C) [dieta basal (DB)]; probiótico (Pro) [DB + probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus*
 26 *faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada)]; prebiótico (Pre)
 27 [DB + prebiótico (mananoligossacarídeo)]; simbiótico (Sym) (DB + probiótico + prebiótico); controle
 28 fumante (CS) [(DB + protocolo de exposição ao tabagismo passivo(PT)]; probiótico fumante (ProS) (DB +
 29 probiótico + PT); prebiótico fumante (PreS) (DB + prebiótico + PT); e simbiótico fumante (SymS) (DB +
 30 prebiótico + probiótico + PT). Os ratos foram sacrificados após 189 dias de período experimental os
 31 resultados revelaram que a suplementação com probióticos, prebióticos e simbióticos melhoraram
 32 significativamente (P<0,05) os parâmetros: P, Ca, Mg, DMO, CMO, resistência, resiliência e tamanho da
 33 área das diáfises dos fêmures dos ratos expostos cronicamente ou não a fumaça do cigarro. Os resultados
 34 permitem concluir que a suplementação dos alimentos funcionais melhorou a saúde óssea de ratos expostos
 35 cronicamente ou não a fumaça do cigarro.

36

37 **Palavras Chaves:** Alimentos Funcionais, Fêmur, Massa Óssea, Nutrição, Fumaça do cigarro.

38

39

ABSTRACT

40 Cigarette smoke in large centers is one of the most important causes of chronic inflammatory diseases in
 41 public health and this is associated with a decrease in bone mass, consolidation process and bone
 42 remodeling. Functional foods supplemented in the diet, because of their ability to improve intestinal
 43 absorption and compete with pathogenic microorganisms, may contribute to the improvement of bone

¹ Departamento de Ciências Funcionais, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente - SP, Brasil

² Estudante de Medicina, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente - SP, Brasil

³ Departamento de Patologia, Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo – SP, Brasil

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araçatuba – SP, Brasil.

1 quality. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of functional, probiotic, prebiotic or
2 symbiotic food supplementation on the mineral composition, histomorphometry and bone biomechanical
3 properties of chronically exposed chronically smoked (T) mice. Sixty-four young male rats were randomly
4 assigned to eight groups (n = 8): control (C) [basal diet (DB)]; probiotic (Pro) [DB + probiotic (*Lactobacillus*
5 *acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium longum* (2-5 10⁹
6 CFU each)], prebiotic (Pre) [DB + prebiotic (mananoligosaccharide)], symbiotic probiotic + probiotic + PT),
7 prebiotic smoker (PreS) (DB + prebiotic + PT), smoker control (CS + (DB + prebiotic + probiotic + PT) .The
8 animals were killed after 189 days of experimental period, the results showed that probiotic, prebiotic and
9 symbiotic supplementation improved significantly (P <0.05) the parameters: P, Ca, Mg, BMD, CMO,
10 resistance, resilience and size of the femur diaphysis area of chronically or non-chronically exposed animals.
11 The results suggest that supplementation of functional foods improved bone health of exposed rats
12 chronically or not cigarette smoke.

13 **Key Words:** Functional Foods, Femur, Bone Mass, Nutrition, Cigarette Smoke.

14

15 **Introdução**

16

17 A fumaça do tabaco (T) é uma mistura complexa, dinâmica e reativa contendo cerca de
18 5.000 produtos químicos (NAGAIE et al., 2014) e que está associada a uma diminuição da massa óssea,
19 sendo, portanto, considerada um fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose em seres humanos
20 (HERMIZI et al., 2009), além disso, a nicotina da fumaça tem uma ação direta sobre o metabolismo ósseo,
21 influenciando o processo de remodelação óssea na proteogênese do osteoblasto. (ELSHAWARBI et al.,
22 2014).

23 O tecido ósseo é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído por
24 uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação. Esse tecido pode ser alterado
25 por uma série de condições: idade, doenças ósteo-metabólicas, mobilidade diminuída e ação de drogas,
26 podendo levar a um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea e que tem como consequência o
27 desenvolvimento de doenças esqueléticas, dentre elas a osteoporose. Essa doença esquelética se caracteriza
28 como sistêmica, progressiva, baixa massa óssea, deterioração da microarquitetura do tecido ósseo e
29 diminuição da densidade mineral óssea (DMO) (AMUGONGO et al., 2014; CHANG et al., 2017).

30 Os minerais mais importantes na composição óssea são o fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio
31 (Mg) e são fixados de forma organizada sobre uma matriz orgânica, cujo principal constituinte é o colágeno
32 (ELKOMY; ELSAID, 2015; HERNÁNDEZ-BECERRA et al., 2017). Alguns alimentos funcionais e
33 ingredientes bioativos têm demonstrado atuar beneficemente na composição mineral e nas propriedades
34 biomecânicas ósseas, melhorando a saúde óssea (COSMAN et al., 2014; HERNÁNDEZ-BECERRA et al.,
35 2017).

36 Dentre os alimentos funcionais, os probióticos são microrganismos vivos que promovem
37 benefício para o hospedeiro ao regular a homeostase da microbiota (UMBRELLO; ESPOSITO, 2016). Os
38 prebióticos são componentes alimentares naturais ou sintetizados com carboidratos em sua estrutura e que

1 são metabolizados seletivamente pelos microrganismos probióticos, conferindo benefícios ao hospedeiro
2 (CORRIE; CASTILLO, 2017). O simbiótico é composto da associação de probióticos e prebióticos e que
3 tem demonstrado poder modificar beneficemente a composição da microbiota intestinal e o metabolismo
4 mineral, assim, colaborando para um melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta e proporcionando uma
5 estrutura óssea com maior conteúdo mineral (SCHOLZ-AHRENS et al., 2016).

6 Poucos estudos pré-clínicos investigaram mudanças na composição mineral, parâmetros
7 histomorfométricos e propriedades biomecânicas ósseas em ratos suplementados com alimentos funcionais:
8 probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e
9 *Bifidobacterium longum*), prebiótico [mananoligossacarídeo (MOS), oligossacarídeo da parede celular de
10 *Saccharomyces cerevisiae*] e simbiótico em ratos expostos cronicamente a fumaça do cigarro.

11 Utilizou-se o rato como modelo animal, por ser fisiologicamente semelhante aos humanos
12 (ABBOTT, 2004). Portanto, objetivou-se avaliar o efeito benéfico da suplementação de alimentos
13 funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, na composição mineral, propriedades biomecânicas e
14 parâmetros histomorfométricos de ratos em fase de crescimento e expostos ou não cronicamente à fumaça do
15 cigarro.

16 **Material e Métodos**

17
18
19 O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos da Declaração Universal
20 dos Direitos Animais da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO).
21 O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos em Animais da instalação de teste
22 antes do início do experimento, sob o protocolo nº 2686, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE),
23 Presidente Prudente, Brasil.

24 *Animais e cuidados com os animais*

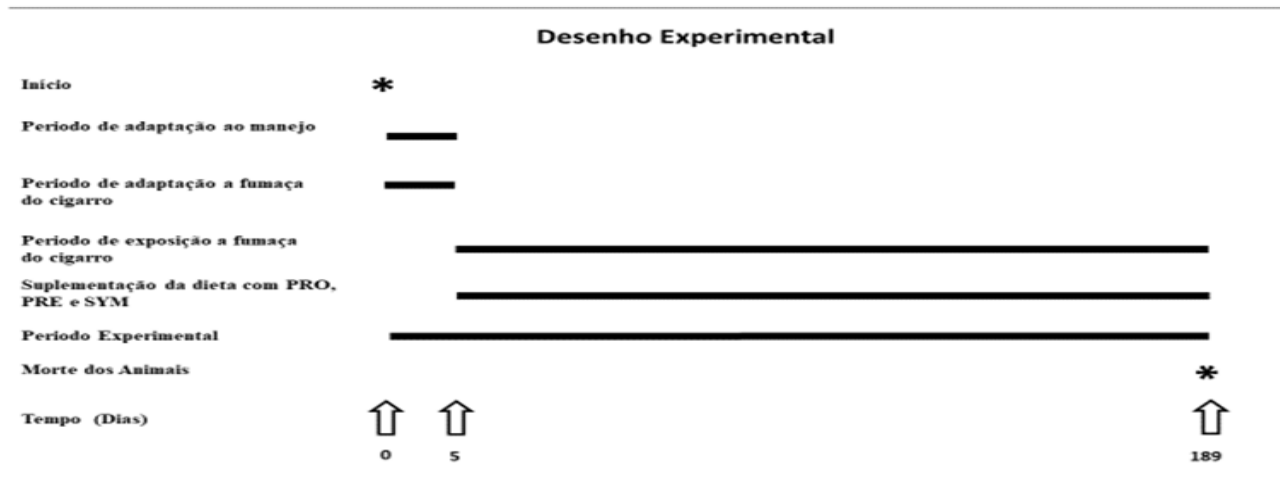
25
26
27 Os ratos utilizados neste estudo foram provenientes do Biotério Central da Universidade do
28 Oeste Paulista (Presidente Prudente, São Paulo, Brasil). A dieta basal foi formulada para atender às
29 necessidades nutricionais dos ratos de acordo com os padrões NRC (Tabela 1) (HAN et al., 2016) e água
30 potável da torneira (Cidade de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil), a vontade, exceto durante os períodos
31 de exposição.

32 Sessenta e quatro ratos Wistar machos em fase de crescimento (*Rattus norvegicus albinus*),
33 com massa corpórea inicial média de $46,3 \pm 2,6$ g, 21 dias de idade, foram alojados em gaiolas individuais,
34 em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $55 \pm 10\%$ e média de trocas
35 de ar de 15 trocas/hora.

36 Foi realizada ocultação da alocação, estratégia de manejo e tratamentos dos animais para
37 reduzir viés no estudo (MA et al., 2017). O experimento durou 189 dias, sendo 5 dias de adaptação e 184

1 dias experimental à estratégia de manejo e a exposição a fumaça do cigarro e alimentação com dietas basal e
 2 ou experimentais (Figura 1).

3



4

5 **Figura 1:** Representação gráfica da linha do tempo. Grupos: A= Grupos não expostos a fumaça do cigarro;
 6 B = Grupos expostos a fumaça do cigarro. Tratamentos/Grupos: C: dieta basal; Pro: dieta basal suplementada
 7 com 2 g de probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e
 8 *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada)]; Pre: dieta basal suplementada com 1g de
 9 mananoligossacarídeo (fração activa, α -1,3 e α -1,6 derivada de um mananoligossacárideo, apresentando 30%
 10 de α -mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym: dieta basal suplementada
 11 com 2 g Probióticos e 1 g Prebiótico; CS: dieta basal + protocolo tabagismo passivo (PT); ProS: dieta basal
 12 suplementada com 2 g probiótico + PT; PreS: dieta basal suplementada com 1g prebiótico + PT; e SymS:
 13 dieta basal suplementada com 2 g probiótico + 1 g prebiótico + PT.

14

15

16 *Delineamento do estudo*

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

Os ratos foram aleatoriamente agrupados por meio de uma tabela de sequências geradas pelo programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016) e distribuídos em oito grupos experimentais (n=8), os quais foram alimentados com: Controle (C), dieta basal; Probiótico (Pro), dieta basal suplementada com 20 g Kg⁻¹ de uma associação de microrganismos probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada) (Brazilian Enterprise to Increase Livestock Productivity – Embrapec, Paranavaí – PR, Brasil)]; Prebiótico (Pre), dieta basal suplementada com 10 g Kg⁻¹ de prebiótico [mananoligossacarídeo (MOS), composto da fração activa α -1,3 e α -1,6, apresentando 30% de α -mananos e derivado de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*]; Simbiótico (Sym), dieta basal suplementada com 20 g Kg⁻¹ de uma associação de microrganismos probióticos e 10 g Kg⁻¹ de prebiótico; Controle Tabagista (C), dieta basal e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça de cigarro; Probiótico Tabagista (ProS), dieta basal suplementada com 20 g Kg⁻¹ de uma associação de microrganismos probióticos e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça do cigarro; Prebiótico Tabagista (PreS), dieta suplementada com 10 g Kg⁻¹ de prebiótico e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça do cigarro; e Simbiótico (SymS), dieta basal suplementada com 20 g Kg⁻¹ de uma

1 associação de microrganismos probióticos e 10 g Kg⁻¹ de prebiótico e submetidos ao protocolo de exposição
2 a fumaça do cigarro.

3

4 **Tabela 1.** Composição dos ingredientes e nutrientes das dietas basal e experimentais.

Ingredientes (g)	Dieta basal e experimentais			
	Basal	Prob	Pre	Sym
Farelo de milho	82.95	80.95	81.95	79.95
Óleo de Soja	7.00	7.00	7.00	7.00
L-Cisteína	0.30	0.30	0.30	0.30
Celulose	5.00	5.00	5.00	5.00
Cloreto de Sódio	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamina mix*	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix**	3.50	3.50	3.50	3.50
Probiótico***	0.00	2.00	0.00	2.00
Prebiótico****	0.00	0.000	1.00	1.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

5 * Vitamina mix/Kg: Ácido nicotínico, 30 mg; Pantotenato, 15 mg; Piridoxina, 6 mg; Tiamina, 5 mg; Riboflavina, 6 mg;
6 Ácido fólico, 2 mg; Biotina, 0,2 mg; Vitamina B12, 25 mg; Vitamina E, 75UI; Vitamina A, 4000 UI; Vitamina D3,
7 1000 UI; Vitamina K, 900 mg; Colina, 1000 mg. ** Mineral mix mg/Kg: Cálcio, 5000; Fósforo, 1,561; Potássio, 3600;
8 Enxofre, 300; Sódio, 1019; Cloro, 1,574; Magnésio, 507; Ferro, 35; Zinco, 30; Manganês, 10; Cobre, 6; Iodo, 0,2;
9 Molibdênio, 0,15; Selênio, 0,15. *** *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e
10 *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada). **** Mananoligossacarídeo (MOS), composto da fração activa α -1,3 e α -
11 1,6, apresentando 30% de α -mananos e derivado de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

12

13 *Cigarro e geração da fumaça*

14

15 No período de adaptação e experimental foram utilizados cigarros de marca comercial
16 (Tabacalera del Este S.A., Hernandarias, Paraguai) e apresentou valores de alcatrão, nicotina e CO de 10
17 mg/cigarro, 0,8 mg/cigarro de nicotina e 10 mg/cigarro de monóxido de carbono, respectivamente, segundo
18 ISO (International Organization for Standardization) 3402. Os cigarros foram fumados em conformidade
19 com a norma ISO 4387. Os métodos de condicionamento a exposição e geração de fumaça foram realizados
20 conforme descritos por Tsuji et al. (2013).

21

22 *Caracterização da atmosfera de exposição à fumaça*

23

24 As concentrações de material particulado total úmido (WTPM) e monóxido de carbono (CO)
25 foram monitoradas via monitor de aerossol em tempo real (RAM; Microdust, Pro; Casella, Amherst, NH,
26 EUA) e monitor de CO (TxiPro® - BioSystems Diagnostics Pvt. Ltd., EUA), respectivamente. O coeficiente
27 de variação (% CV) da concentração de exposição (WTPM) estava dentro de \pm 10% por análise gravimétrica
28 usando filtro de fibra de vidro Cambridge 47 mm (Performance Systematix Inc., Grand Rapids, MI, EUA).

1 As concentrações reais médias de exposição foram calculadas a partir da massa coletada nos filtros e o
2 volume total de ar extraído pelos filtros (TSUJI et al., 2013).

3 A temperatura e a umidade da atmosfera de exposição foram medidas diariamente a partir de
4 uma porta de exposição animal representativa para cada grupo de exposição (Vaisala Inc., Woburn, MA,
5 EUA).

6
7 *Protocolo e período de exposição ao tabagismo passivo*

8
9 Durante cinco dias, período de adaptação, os animais dos grupos CS, ProS, PreS e SymS
10 foram expostos diariamente à fumaça do cigarro numa câmara, com temperatura controlada de 22°C, por um
11 período de 10 minutos e os ratos dos grupos C, Pro, Pre e Sym foram expostos ao ar forçado pelo mesmo
12 período. Após esse período, iniciou-se o período experimental de 184 dias, no qual os grupos CS, ProS, PreS
13 e SymS foram expostos à fumaça de cigarro por 60 minutos diários, sendo 30 minutos no período da manhã
14 (7:00 h) e 30 minutos no período da tarde (19:00 h), cinco dias por semana e os grupos C, Pro, Pre e Sym
15 foram expostos ao ar forçado pelo mesmo período de tempo e períodos do dia. A concentração média da
16 fumaça do cigarro foi ajustada diariamente para conter 350 partes por milhão (ppm) de monóxido de carbono
17 (CO) durante o período de exposição (TxiPro® - BioSystems Diagnostics Pvt. Ltda, EUA) (KOZMA et al.,
18 2014).

19
20 *Sacrifício e histomorfometria*

21
22 Aos 210 dias de idade, todos os ratos foram anestesiados (Thiopentax, Cristália - Produtos
23 Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil), sacrificados por exsanguinação e os fêmures
24 direito e esquerdo de todos os animais foram desarticulados do quadril e removidos os tecidos moles
25 circundantes.

26 Os fêmures direito foram clivados no plano frontal e retirado o seguimento da diáfise, em
27 seguida foram desmineralizados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5,5% em solução
28 de formol a 10%, por um período de duas a três semanas, testando a descalcificação a cada dois a três dias,
29 quando a solução era trocada.

30 As amostras foram processadas para inclusão em parafina e posterior análise microscópica
31 em cortes histológicos de 5 µm corados com hematoxilina e eosina (HE). Foram feitos cortes transversais das
32 diáfises e analisada a espessura do osso cortical através das imagens adquiridas das partes medial da diáfise,
33 com aumento final de 40x (ocular de 10x e objetiva de 4x). Foram efetuadas três medições de cada região:
34 proximal, medial e distal, de cada corte histológico (BERGMANN DE CARVALHO et al., 2010).

35
36 *Determinação da densidade mineral óssea (DMO), área, Fmax, resiliência, rigidez e conteúdo mineral*
37 *ósseo (CMO)*

1
2 Nos fêmures esquerdos dissecados foi mensurado a densidade mineral óssea (DMO) e a área
3 óssea (g/cm^2 e cm^2 , respectivamente), através da densitometria de dupla emissão de raio-X (DXA) (modelo
4 DPX-ALFA, GE Medical Systems Lunar - EUA), com um programa especial para pequenos animais.
5 Posteriormente, os fêmures foram submetidos a ensaios mecânicos (flexão a três pontos e compressão axial)
6 em máquina universal EMIC[®], modelo DL 3000 (Instron Brasil, Brasil) e determinado à força máxima,
7 resiliência e rigidez. Todos os fragmentos ósseos que foram utilizados nos ensaios DMO e biomecânicos
8 foram reidratados, pesados e colocados em uma mufla a 800°C , durante 6 horas, para a obtenção das cinzas
9 por calcinação. Após resfriamento em dessecador, estas amostras foram pesadas para a determinação da
10 quantidade de matéria mineral (cinzas) (BARBOSA, 2009; BARBOSA et al., 2011; PAJAMÄKI et al.,
11 2008).

12 As cinzas foram usadas para as quantificações de fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg),
13 através da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e usando o equipamento
14 ICP-EOS Variant 730-ES (Kyoto, Japão). Todos os testes foram realizados seguindo os métodos oficiais
15 (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (OMA), 2016).

16

17 *Análise estatística*

18

19 Todos os resultados por grupo foram expressos como média e desvio padrão, sendo
20 avaliados estatisticamente utilizando o programa Bioestat versão 5.3 (Bioestat 5.3, Sociedade Civil de
21 Mamirauá, Belém, PA, Brasil). Os resultados foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de
22 Shapiro Wilk. Como a distribuição normal foi demonstrada, ANOVA one-way foi utilizado, seguido do teste
23 de Tukey. Todos os testes foram aplicados com significância estabelecida a 5%.

24

25 **Resultados**

26

27 *Exposição e observações clínicas*

28

29 A atmosfera de exposição à fumaça do cigarro foi bem controlada durante no estudo. Não
30 houve remoção não programada devido à morte prematura ou condição moribunda após exposição crônica à
31 fumaça do cigarro ou a ventilação do ar. Imediatamente após a exposição, os animais do grupo CS exibiram
32 atividade locomotora diminuída, marcha atáxica, respiração irregular, náusea e ruído nasal.

33

34 *Densitometria óssea, Ensaio mecânico e Histomorfometria*

35

36 As médias da DMO e CMO dos grupos suplementados com os alimentos funcionais e não
37 expostos a fumaça do cigarro foram maiores e apresentaram significância em relação ao grupos que
38 receberam alimentos funcionais e foram expostos ao cigarro do que o grupo CS,. Os grupos expostos à

1 fumaça de cigarro não diferiram do grupo C ($P>0,05$). Os grupos suplementados com os alimentos
2 funcionais e não expostos a fumaça de cigarro não diferiram a DMO significativamente somente dos grupos
3 C e SymS ($P>0,05$). Os grupos suplementados com os alimentos funcionais e não expostos a fumaça de
4 cigarro diferiram significativamente ($P<0,05$) dos grupos expostos à fumaça de cigarro em relação ao
5 parâmetro CMO (Tabela 2).

6 As médias das áreas dos fêmures do grupo CS foram menores em relação ao grupo SymS,
7 porém não significativamente ($P>0,05$), entretanto foi significativo em relação aos demais tratamentos
8 ($P<0,05$). Os grupos suplementados e não expostos à fumaça do cigarro foram significativamente maiores do
9 que os grupos expostos a fumaça do cigarro ($P<0,05$) (Tabela 2).

10 No parâmetro Força Máxima, os grupos suplementados com os alimentos funcionais e C
11 apresentaram as médias dos resultados significativamente maiores ($P<0,05$) do que do grupo CS. O grupo
12 ProS diferiu significativamente ($P<0,05$) do grupo CS. As médias da Força Máxima foram maiores nos
13 grupos suplementados com alimentos funcionais do que no grupo C, porém essa diferença não foi
14 significativa ($P>0,05$) (Tabela 2).

15 As médias do parâmetro Resiliência do grupo CS foi menor ($P<0,05$) do que os grupos não
16 expostos a fumaça de cigarro. As médias dos grupos suplementados com os alimentos funcionais e não
17 expostos a fumaça de cigarro foram maiores do que do grupo C, porém essa diferença não foi
18 significativa ($P>0,05$) (Tabela 2).

19 A média do parâmetro Rigidez (R) do grupo CS foi menor ($P<0,05$) do que as médias dos
20 grupos não expostos a fumaça de cigarro. A suplementação dos alimentos funcionais aumentaram as médias
21 da desse parâmetro nos grupos expostos ou não a fumaça de cigarro (Tabela 2).

22

23 *Concentração de Minerais no Fêmur*

24

25 A média da concentração de P, Ca e Mg no grupo CS foi significativamente ($P<0,05$) menor
26 em relação ao grupo C e os demais grupos. A suplementação com alimentos funcionais aumentou
27 significativamente ($P<0,05$) a média da concentração de P, Ca e Mg nos grupos expostos ou não a fumaça do
28 cigarro. A concentração média de Mg dos grupos suplementados com alimentos funcionais e expostos ao
29 tabagismo passivo não diferiram ($P>0,05$) do grupo C (Tabela 2).

1 **Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão da concentração de minerais e da densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO), área, força máxima
 2 (Fmáx), resiliência e rigidez (R) obtidos para os grupos de ratos suplementados ou não com probiótico, prebiótico e simbiótico e expostos ou não por 189 dias ao
 3 tabagismo passivo.

Tratamentos*	Parâmetros								
	Densitometria Óssea e Ensaio Mecânico					Concentração de minerais no fêmur (mg/g)			
	DMO (g/cm ²)	CMO (g)	Área (cm ²)	Fmáx (N)	Resiliência (mJ)	R (10 ³ N/m)	Fósforo	Cálcio	Magnésio
C	0.15 ± 0.01 ^{AB}	0.28 ± 0.02 ^{AB}	1,85 ± 0,02 ^C	138.18 ± 11.27 ^{BC}	59.65 ± 6.24 ^{BC}	275,92 ± 15.01 ^{BCD}	172,59 ± 2,08 ^B	350.59 ± 3.69 ^B	5.99 ± 0.11 ^B
Pro	0.17 ± 0.02 ^B	0.30 ± 0.02 ^{BC}	1,90 ± 0,02 ^D	147.36 ± 10.50 ^C	61.62 ± 5.89 ^{BC}	296,18 ± 10,62 ^D	179,47 ± 2,61 ^C	364.81 ± 3.41 ^C	6.73 ± 0.17 ^D
Pre	0.17 ± 0.01 ^B	0.32 ± 0.01 ^{BC}	1,90 ± 0,04 ^D	145.37 ± 13.19 ^C	63.58 ± 6.66 ^{BC}	288,64 ± 21,49 ^{CD}	177,79 ± 1,84 ^C	362.28 ± 2.00 ^C	6.44 ± 0.20 ^C
Sym	0.17 ± 0.01 ^B	0.33 ± 0.03 ^C	1,88 ± 0,03 ^{CD}	139.92 ± 8.61 ^{BC}	67.24 ± 1.93 ^C	276,31 ± 15,66 ^{BCD}	179,43 ± 3,01 ^C	363.75 ± 3.30 ^C	6.45 ± 0.22 ^{CD}
CS	0.13 ± 0.01 ^A	0.25 ± 0.01 ^A	1,72 ± 0,02 ^A	117.88 ± 8.94 ^A	50.26 ± 4.64 ^A	225,01 ± 12,39 ^A	162,98 ± 3,33 ^A	340.32 ± 2.65 ^A	5.23 ± 0.09 ^A
ProS	0.14 ± 0.01 ^A	0.26 ± 0.01 ^A	1,80 ± 0,03 ^B	137.24 ± 9.71 ^B	57.39 ± 2.91 ^{AB}	273,82 ± 15,53 ^{BCD}	169,92 ± 2,67 ^B	348.76 ± 5.61 ^B	5.87 ± 0.19 ^B
PreS	0.14 ± 0.01 ^A	0.26 ± 0.01 ^A	1,80 ± 0,04 ^B	125.68 ± 7.54 ^{AB}	57.22 ± 3.80 ^{AB}	268,48 ± 11,78 ^{BC}	168,83 ± 3,41 ^B	347.50 ± 5.89 ^B	5.75 ± 0.22 ^B
SymS	0.14 ± 0.01 ^{AB}	0.26 ± 0.03 ^A	1,76 ± 0,02 ^{AB}	121.40 ± 8.35 ^A	58.11 ± 3.35 ^{AB}	255,76 ± 13,13 ^B	170,17 ± 2,97 ^B	348.62 ± 4.55 ^B	5.72 ± 0.22 ^B

4 Os valores correspondem à média ± SD. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p>0,05). * C: grupo controle (dieta basal); Pro: dieta
 5 basal + 2 g probiótico [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada)]; Pre: dieta basal + 1 g
 6 prebiótico (fração activa, α-1,3 e α-1,6 derivada de um mananligossacárideo, apresentando 30% de α-mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym:
 7 grupo simbiótico (dieta basal + 2 g probiótico + 1 g prebiótico); CS: grupo controle + protocolo tabagismo (PT); ProS: grupo probiótico + PT; PreS: grupo prebiótico + PT; SymS:
 8 grupo simbiótico + PT.

1 *Espessura da Diáfise*

2

3 As médias (μm) das medidas da diáfise dos fêmures direito (regiões proximal, medial e
 4 distal), estão dispostas na Tabela 3 e Figuras 2, 3 e 4. Elas revelaram um aumento significativo ($P < 0,05$) na
 5 espessura média dos ossos dos animais dos grupos Pro, Pre e Sym nas regiões analisadas, quando
 6 comparadas ao grupo C, também foi possível observar uma diminuição significativa da espessura média da
 7 diáfise dos fêmures dos animais do grupo CS quando comparado ao grupo C. Os resultados revelaram
 8 aumento significativo ($P < 0,05$) das médias da diáfise dos fêmures dos animais dos grupos ProS, PreS e
 9 SymT em comparação com o grupo CS.

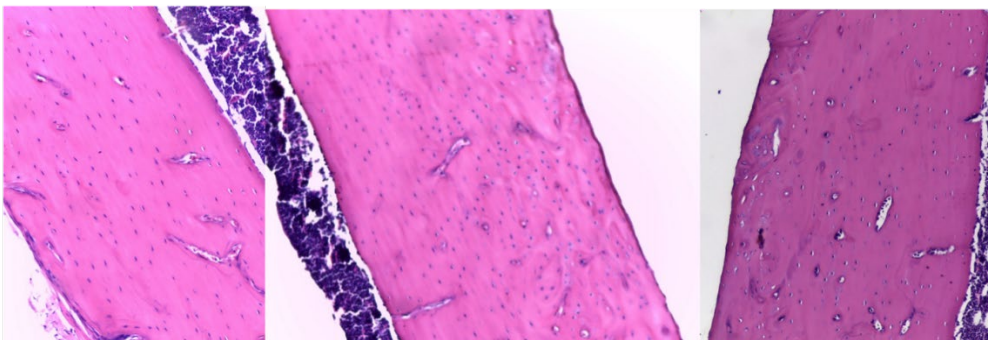
10

11 **Tabela 3.** Espessura (μm) da diáfise de três regiões do fêmur de ratos alimentados com dietas suplementadas
 12 ou não com probiótico, prebiótico ou simbiótico e expostos ou não por 189 dias ao tabagismo passivo.

Tratamentos	Regiões		
	Proximal	Medial	Distal
C	589,30 \pm 46,50 ^D	580,90 \pm 59,44 ^{BCD}	558,35 \pm 80,16 ^{BCD}
Pro	632,83 \pm 59,44 ^E	614,59 \pm 120,12 ^{DE}	582,86 \pm 57,67 ^{CD}
Pre	649,83 \pm 65,52 ^E	596,55 \pm 96,39 ^{CDE}	588,36 \pm 162,25 ^{CD}
Sym	623,88 \pm 57,26 ^E	626,11 \pm 62,84 ^E	608,36 \pm 99,49 ^D
CS	440,29 \pm 49,50 ^A	504,93 \pm 100,21 ^A	510,78 \pm 77,85 ^A
ProS	501,30 \pm 59,60 ^B	544,04 \pm 78,00 ^{AB}	551,90 \pm 80,99 ^{BC}
PreS	554,09 \pm 67,12 ^C	554,30 \pm 114,68 ^B	550,31 \pm 66,10 ^{AB}
SymS	516,94 \pm 38,34 ^B	561,24 \pm 53,11 ^{BC}	591,87 \pm 73,44 ^{CD}

13 Os valores correspondem à média \pm SD. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de
 14 Tukey ($P > 0,05$). * C: grupo controle (dieta basal); Pro: dieta basal + 2 g probiótico [*Lactobacillus acidophilus*,
 15 *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* ($2-5 \times 10^9$ UFC cada)]; Pre: dieta basal
 16 + 1 g prebiótico (fração activa, α -1,3 e α -1,6 derivada de um mananligossacárideo, apresentando 30% de α -mananos,
 17 derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym: grupo simbiótico (dieta basal + 2 g probiótico + 1 g
 18 prebiótico); CS: grupo controle + protocolo tabagismo (PT); ProS: grupo probiótico + PT; PreS: grupo prebiótico + PT;
 19 SymS: grupo simbiótico + PT.

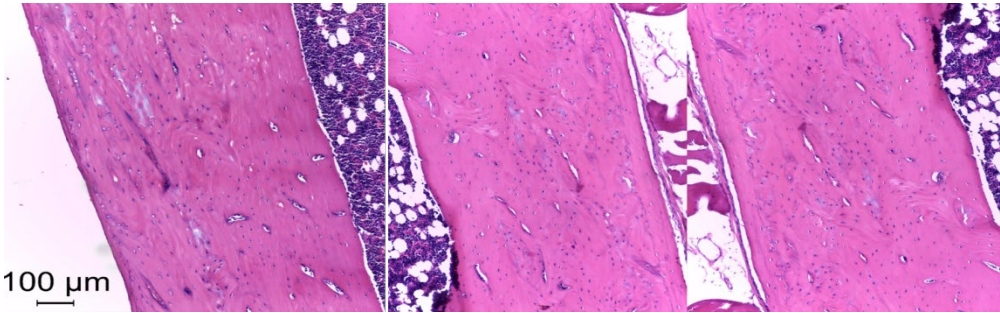
20



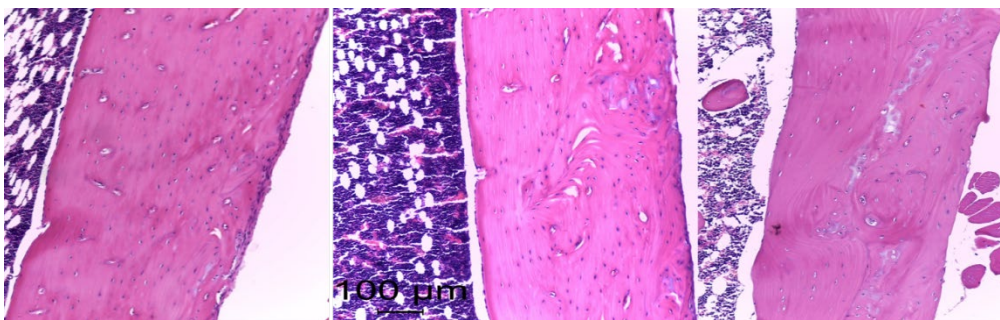
21

22 **Figura 2.** Espessura da diáfise dos fêmures, regiões proximal, médio e distal do grupo de ratos não expostos
 23 cronicamente a fumaça do cigarro (grupo C).

24



1
2 **Figura 3.** Espessura da diáfise dos fêmures, regiões proximal, médio e distal do grupo de ratos expostos
3 cronicamente a fumaça do cigarro e suplementos com alimentos funcionais (grupo ProS, PreS e SymS).



5
6 **Figura 4.** Espessura da diáfise dos fêmures, regiões proximal, médio e distal do grupo de ratos expostos
7 cronicamente a fumaça do cigarro (grupo CS).

8
9 **Discussão**

10
11 O desenho experimental deste estudo buscou demonstrar os benefícios ao tecido ósseo do
12 uso de alimentos funcionais (probióticos, prebióticos e simbióticos) em um modelo murino (*Rattus*
13 *norvegicus albinus*) expostos ou não a fumaça do cigarro. Estudos semelhantes utilizando nicotina e
14 probiótico isoladamente demonstraram a utilidade e segurança deste modelo experimental para avaliar
15 parâmetros de composição, organização tecidual e resistência óssea (CAHILL et al., 2012; FORD et al.,
16 2014; ŚWIATKIEWICZ et al., 2010).

17 A exposição crônica passiva dos ratos à fumaça do cigarro, 189 dias, acarretou diminuição
18 dos parâmetros DMO e CMO, o que em humanos é indicativa da predisposição a osteoporose, bem como o
19 aumento do risco de fraturas (ELSHAWARBI et al., 2014; HERMIZI et al., 2009), reforçando os já
20 conhecidos efeitos deletérios do tabagismo. Em humanos e animais, esses efeitos deletérios foram
21 relacionados à capacidade da fumaça do cigarro de modificar a composição da microbiota intestinal,
22 induzindo em quatro semanas, em ratos, uma diminuição da população de Bifidobactérias no cécum. Em
23 camundongos, observaram o aumento de *Clostridium* spp., diminuição do filo *Firmicutes* e bactérias
24 filamentosas segmentadas no cécum, elevando o risco de aparecimento de varias doenças, incluindo
25 inflamatórias (BIEDERMANN et al., 2013; TOMODA et al., 2011; WANG et al., 2012).

1 Os bons resultados, DMO e CMO, observados com a suplementação na dieta do prebiótico,
2 mananoligossacarídeo, podem ser resultante da sua contribuição em manter os patógenos afastados, pois esse
3 suplemento alimentar contém resíduos de manose e que são conhecidos por inibir a adesão de muitos agentes
4 patogênicos entéricos, incluindo *Salmonella* e *E. coli* (GANNER; SCHATZMAYR, 2012), o que possibilita
5 a colonização de bactérias lácticas benéficas, principalmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (GIBSON;
6 ROBERFROID, 1995) e, conseqüentemente, levar a redução do pH do bolo intestinal (FERKET, 2002),
7 como resultado da produção estimulada de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta, principalmente
8 propionato e acetato, e em um nível mais baixo, mas a uma taxa maior, do butirato (LEVRAT et al.; 1991),
9 acarretando o aumento da solubilidade dos minerais, melhora da integridade da mucosa intestinal, aumento
10 da profundidade de cripta do cólon distal (WEAVER et al., 2011), bem como, do aumento da expressão de
11 proteínas de ligação ao Ca^{2+} (SCHOLZ-AHRENS et al., 2007). Além disso, esse alimento funcional pode
12 promover a liberação de fatores moduladores ósseos, aumentando a degradação de fitatos por enzimas
13 bacterianas probióticas, resultando na melhora da saúde do intestino e a maximização da absorção dos
14 nutrientes, assim como melhorando a saúde do hospedeiro de uma maneira geral (SCHOLZ-AHRENS et al.,
15 2007).

16 Dentre os compostos da fumaça do cigarro, estudos observaram que a nicotina pode causar
17 efeitos deletérios à composição química e organização da microarquitetura óssea (ELSHAWARBI et al.,
18 2014; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; GARCÍA-COHEN, 2002), pois tem efeito vasoconstritor e acarreta a
19 diminuição da oferta de nutrientes. Além disso, causa também o aumento dos níveis de IL-1 e do fator de
20 necrose tumoral (TNF), que exercem efeitos indiretos em relação aos osteoblastos e osteoclastos
21 (NORAZLINA et al., 2007). A estimulação da formação de osteoclastos, através da proliferação de seus
22 precursores na medula óssea e ativação da atividade pró-osteoclastogênica nas células do estroma,
23 interrompem o equilíbrio normal da formação, acarretando o aumento da reabsorção óssea (ELSHAWARBI
24 et al., 2014) e a inibição da osteogênese (FUNG et al., 1999). Além disso, os efeitos celulares diretos do
25 tabagismo no osso incluem alterações no metabolismo do hormônio calcitropic (KRALL; DAWSON-
26 HUGHES, 1999) e pode diminuir a atividade dos osteoblastos (RAPURI et al., 2000). FUNG et al., 1999)
27 observaram que a nicotina (ingrediente ativo de cigarros) reduziu o armazenamento de vitamina D e a
28 atividade dos osteoblastos em seres humanos.

29 A diminuição significativa da área da diáfise e dos parâmetros que quantificam a resistência
30 óssea (força máxima), resiliência (energia) e concentração dos minerais, fósforo, cálcio e magnésio, também
31 foram relatadas em ratos expostos a fumaça do cigarro (ELSHAWARBI et al., 2014) e provavelmente sejam
32 decorrentes do efeito da nicotina na expressão do gene da sialoproteína, proteína expressa por osteoblastos e
33 que tem funções na mineralização osteogênica (NASH; PERSAUD, 1989).

34 A suplementação com alimentos funcionais (probióticos, prebióticos e simbióticos) na dieta
35 resultou no aumento significativo da área da diáfise, rigidez, resistência óssea e concentração do mineral
36 fósforo, cálcio e magnésio dos fêmures de ratos tanto dos grupos expostos ou não à fumaça de cigarro.

1 Outros estudos relatam que alguns alimentos funcionais atuaram benéficamente em fumantes e não
 2 fumantes, através da modulação do intestino, diminuição das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α
 3 (DADDAOUA et al., 2007) e a composição e atividade do microbioma (zebra fish, roedores e frango) e em
 4 humanos (DAI et al., 2015; DEMIGNÉ et al., 2008; GIBSON et al., 2017; MCCABE et al., 2015;
 5 PARVANEH et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012; STRÁNSKÝ; RYŠAVÁ, 2009; ŚWIATKIEWICZ et
 6 al., 2010), porém utilizando outros prebióticos e probióticos. Além disso, os alimentos funcionais podem
 7 atuar em várias respostas locais e sistêmicas: redução da resposta inflamatória no intestino, sangue e osso;
 8 aumento dos níveis de metabolitos ácido graxo de cadeia curta (AGCC), que por sua vez aumentam a
 9 absorção de cálcio e a sinalização local no intestino e no osso; aumento da secreção de fatores bacterianos e
 10 hormônios intestinais como incretins e serotonina que são conhecidos como reguladores da densidade óssea,
 11 acarretando a diminuição da atividade dos osteoclastos e/ou aumento da atividade dos osteoblastos, levando
 12 a modulação estrutural, maior densidade e força óssea (MCCABE et al., 2015).

13

14 **Conclusão**

15

16 Os resultados permitem concluir que a suplementação de alimentos funcionais, probiótico
 17 (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium*
 18 *longum*), prebiótico (mananoligossacarídeo) e simbiótico (associação de probiótico e prebiótico)
 19 minimizaram os efeitos tóxicos deletérios da exposição crônica ao tabagismo passivo em relação à
 20 composição mineral, parâmetros histomorfométricos e propriedades biomecânicas do fêmur de ratos em fase
 21 de crescimento, como modelo experimental. Nos grupos não expostos a fumaça de cigarro, os fêmures dos
 22 ratos melhoraram na composição mineral óssea, na força máxima, na resiliência e no aumento das áreas das
 23 diáfises.

24

25 **Referências**

26

27 ABBOTT, A. The Renaissance rat. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 464–466, 1 abr. 2004.

28

29 AMUGONGO, S. K.; YAO, W.; JIA, J.; LAY, Y. A.; DAI, W.; JIANG, L.; WALSH, D.; LI, C. S.; DAVE,
 30 N. K.; OLIVERA, D.; PANGANIBAN, B.; RITCHIE, R. O.; LANE, N. E. Effects of sequential osteoporosis
 31 treatments on trabecular bone in adult rats with low bone mass. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 6, p.
 32 1735–1750, 11 jun. 2014.

33

34 BARBOSA, A. A. A.; DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, S. R.; VILELA, M. J.; LOUZADA, M. J. Q.;
 35 BRITO, A. F. S.; NATALI, A. J. Bone mineral density of rat femurs after hindlimb unloading and different
 36 physical rehabilitation programs. **Revista Ceres**, v. 58, n. 4, p. 407–412, ago. 2011.

37

38 BARBOSA, A. A. A. Densidade mineral óssea e propriedades mecânicas de fêmur de ratos submetidos a
 39 hipocinesia dos membros pélvicos e a diferentes programas de reabilitação. 2009. 44 f. Dissertação
 40 (Mestrado em Biologia Animal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal
 41 de Viçosa, 2009.

- 1
2 BERGMANN DE CARVALHO, A. C.; HENRIQUES, H. N.; PANTALEÃO, J. A. S.; POLLASTRI, C. E.;
3 FERNANDES, G. V. O.; GRANJEIRO, J. M.; GRANJEIRO, M. A. Bone tissue histomorphometry in
4 castrated rats treated with tibolone. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p.
5 235–243, 2010.
6
7 BIEDERMANN, L.; ZEITZ, J.; MWINYI, J.; SUTTER-MINDER, E.; REHMAN, A.; OTT, S. J.;
8 STEURER-STAY, C.; FREI, A.; FREI, P.; SCHARL, M.; LOESSNER, M. J.; VAVRICKA, S. R.; FRIED,
9 M.; SCHREIBER, S.; SCHUPPLER, M.; ROGLER, G. Smoking cessation induces profound changes in the
10 composition of the intestinal microbiota in humans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59260, 14 mar. 2013.
11
12 CAHILL, K.; STEAD, L. F.; LANCASTER, T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. **São**
13 **Paulo Medical Journal**, v. 130, n. 5, p. 346–347, 2012.
14
15 CHANG, G.; BOONE, S.; MARTEL, D.; RAJAPAKSE, C. S.; HALLYBURTON R. S.; VALKO, M.;
16 HONIG, S.; REGATTE, R. R. MRI assessment of bone structure and microarchitecture. **Journal of**
17 **Magnetic Resonance Imaging**, v. 46, n. 2, p. 323–337, ago. 2017.
18
19 CORRIE, M.; CASTILLO, L. F. Prebiotics, bone and mineral metabolism. **Calcified Tissue International**,
20 out. 2017.
21
22 COSMAN, F.; DE BEUR, S. J.; LEBOFF, M. S.; LEWIECKI, E. M.; TANNER, B.; RANDALL, S.;
23 LINDSAY, R. Guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10,
24 p. 2359–2381, 15 out. 2014.
25
26 DADDAOUA, A.; MARTÍNEZ-PLATA, E.; LÓPEZ-POSADAS, R.; VIEITES, J. M.; GONZÁLEZ, M.;
27 REQUENA, P.; ZARZUELO, A.; SUÁREZ, M. D.; DE MEDINA, F. S.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.
28 Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced
29 colitis. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 5, p. 1222–1228, 1 maio 2007.
30
31 DAI, L.; WU, H.; YU, S.; ZHAO, H.; XUE, L.; XU, M.; SHEN, Z.; HU, M. Effects of OsteoKing on
32 osteoporotic rabbits. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 1066–1074, 2015.
33
34 DEMIGNÉ, C.; JACOBS, H.; MOUNDRAS, C.; DAVICCO, M. J.; HORCAJADA, M. N.; BERNALIER,
35 A.; COXAM, V. Comparison of native or reformulated chicory fructans, or non-purified chicory, on rat cecal
36 fermentation and mineral metabolism. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 366–374, out. 2008.
37
38 ELKOMY, M. M.; ELSAID, F. G. Anti-osteoporotic effect of medical herbs and calcium supplementation
39 on ovariectomized rats. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 72, p. 81–88, 1 out. 2015.
40
41 ELSHAWARBI, A. M. H.; MOHAMED, M. S.; MOSTAFA, H. K. K.; MAGDI, M. M. Histological study
42 on the effect of nicotine administration on the bone of adult male albino rat and the possible protective role
43 of vitamin E. **The Egyptian Journal of Histology**, v. 37, n. 3, p. 526–536, 2014.
44
45 FERKET, P. R. **Use of oligosaccharides and gut modifiers as replacements for dietary antibiotics.**
46 MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE. **Anais...**Indianapolis: UIL, 2002. Disponível em:
47 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000088&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000088&pid=S1516-3598200600080002300008&lng=pt)
48 [3598200600080002300008&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000088&pid=S1516-3598200600080002300008&lng=pt)>. Acesso em: 24 jan. 2018.
49
50 FORD, A. C.; QUIGLEY, E. M.; LACY, B. E.; LEMBO, A. J.; SAITO, Y. A.; SCHILLER, L. R.; SOFFER,
51 E. E.; SPIEGEL, B. M.; MOAYYEDI, P. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel
52 syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. **The American Journal**
53 **of Gastroenterology**, v. 109, n. 10, p. 1547–1561, out. 2014.
54

- 1 FUNG, Y. K.; IWANIEC, U.; CULLEN, D. M.; AKHTER, M. P.; HAVEN, M. C.; TIMMINS, P. Long-
2 term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. **Pharmacology &**
3 **Toxicology**, v. 85, n. 4, p. 181–187, out. 1999.
4
5
6 GANNER, A.; SCHATZMAYR, G. Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and
7 to modulate cells of the innate immune system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 2, p.
8 289–297, 22 jul. 2012.
9
10 GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S.
11 J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert
12 consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)
13 consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and**
14 **Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.
15
16 GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing
17 the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.
18 HAN, M.; SONG, P.; HUANG, C.; REZAEI, A.; FARRAR, S.; BROWN, M. A.; MA, X. Dietary grape seed
19 proanthocyanidins (GSPs) improve weaned intestinal microbiota and mucosal barrier using a piglet model.
20 **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80313–80326, 6 dez. 2016.
21
22 HERMIZI, H.; FAIZAH, O.; IMA-NIRWANA, S.; AHMAD NAZRUN, S.; NORAZLINA, M. Beneficial
23 effects of tocotrienol and tocopherol on bone histomorphometric parameters in sprague–dawley male
24 rats after nicotine cessation. **Calcified Tissue International**, v. 84, n. 1, p. 65–74, jan. 2009.
25
26 HERNÁNDEZ-BECERRA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; DEL REAL, A.; ROJAS-MOLINA, A.;
27 RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.; RUBIO, E.; QUINTERO-GARCÍA, M.; ROJAS-MOLINA, I. Bone mineral
28 density, mechanical, microstructural properties and mineral content of the femur in growing rats fed with
29 cactus opuntia ficus indica (l.) mill. (cactaceae) cladodes as calcium source in diet. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p.
30 108, 4 fev. 2017.
31
32 KOZMA RDE, L.; ALVES, E. M.; BA. RBOSA-DE-OLIVEIRA, V. A.; LOPES, F. D.; GUARDIA, R. C.;
33 BUZO, H. V.; FARIA, C. A.; YAMASHITA, C.; CAVAZZANA JÚNIOR, M.; FREI, F.; RIBEIRO-PAES,
34 M. J.; RIBEIRO-PAES, J. T. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar
35 rats. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 1, p. 46–54, jan. 2014.
36
37 KRALL, E. A.; DAWSON-HUGHES, B. Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium
38 absorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 215–220, 1 fev. 1999.
39
40 LEVRAT, M. A.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. High propionic acid fermentations and mineral
41 accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. **The Journal of Nutrition**, v. 121, n.
42 11, p. 1730–1737, 1 nov. 1991.
43
44 MCCABE, L.; BRITTON, R. A.; PARAMESWARAN, N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health:
45 role of the intestine and its microbiome. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 6, p. 363–371, 2015.
46
47 NAGAIE, M.; NISHIURA, A.; HONDA, Y.; FUJIWARA, S. I.; MATSUMOTO, N. A comprehensive
48 mixture of tobacco smoke components retards orthodontic tooth movement via the inhibition of
49 osteoclastogenesis in a rat model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18610–
50 18622, 15 out. 2014.
51
52 NASH, J. E.; PERSAUD, T. V. Influence of nicotine and caffeine on skeletal development in the rat.
53 **Anatomischer Anzeiger**, v. 168, n. 2, p. 109–126, 1989.
54

- 1 NORAZLINA, M.; LEE, P. L.; LUKMAN, H. I.; NAZRUN, A. S.; IMA-NIRWANA, S. Effects of vitamin
2 E supplementation on bone metabolism in nicotine-treated rats. **Singapore medical journal**, v. 48, n. 3, p.
3 195–9, mar. 2007.
4
- 5 OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (OMA). **Official methods of analysis of AOAC International**. 20.
6 ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2016.
7
8
- 9 PAJAMÄKI, I.; Sievänen, H.; Kannus, P.; Jokihäärä, J.; Vuohelainen, T.; Järvinen, T. L. Skeletal effects of
10 estrogen and mechanical loading are structurally distinct. **Bone**, v. 43, n. 4, p. 748–757, out. 2008.
11
- 12 PARVANEH, K.; EBRAHIMI, M.; SABRAN, M. R.; KARIMI, G.; HWEI, A. N. M.; ABDUL-MAJEED,
13 S.; AHMAD, Z.; IBRAHIM, Z.; JAMALUDDIN, R. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) increase bone
14 mass density and upregulate *Sparc* and *Bmp-2* Genes in rats with bone loss resulting from ovariectomy.
15 **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
16
- 17 R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R SoftwareR**: a language and environment for statistical computing,
18 2016.
19
- 20 RAPURI, P. B.; GALLAGHER, J. C.; BALHORN, K. E.; RYSCHON, K. L. Smoking and bone metabolism
21 in elderly women. **Bone**, v. 27, n. 3, p. 429–436, 1 set. 2000.
22
- 23 RODRIGUES, F. C.; CASTRO, A. S.; RODRIGUES, V. C.; FERNANDES, S. A.; FONTES, E. A.;
24 OLIVEIRA, T. T.; MARTINO, H. S.; DE LUCES FORTES FERREIRA, C. L. Yacon Flour and
25 *Bifidobacterium longum* Modulate Bone Health in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 7, p. 664–
26 670, jul. 2012.
27
- 28 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A.; GARCÍA-COHEN, E. C. Role of Ca(2+) and vitamin D in the
29 prevention and treatment of osteoporosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 1, p. 37–49, jan. 2002.
30
- 31 SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ADE, P.; MARTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; AÇIL, Y.; GLÜER, C. C.;
32 SCHREZENMEIR, J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content,
33 and bone structure. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 838S–846S, mar. 2007.
34
- 35 SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ADOLPHIA, B.; ROCHAT, F.; BARCLAY, D. V.; VRESE, M.; AÇIL, Y.;
36 SCHREZENMEIRA, J. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in
37 ovariectomized rats: impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over.
38 **NFS Journal**, v. 3, p. 41–50, 2016.
39
- 40 STRÁNSKÝ, M.; RYŠAVÁ, L. Nutrition as prevention and treatment of osteoporosis. **Physiological**
41 **Research**, v. 58, p. 7–11, 2009.
42
- 43 ŚWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J.; ARCZEWSKA, A. Effect of organic acids and prebiotics on bone
44 quality in laying hens fed diets with two levels of calcium and phosphorus. **Acta Veterinaria Brno**, v. 79, n.
45 2, p. 185–193, 2010.
46
- 47 TOMODA, K.; KUBO, K.; ASAHARA, T.; ANDOH, A.; NOMOTO, K.; NISHII, Y.; YAMAMOTO,
48 Y.; YOSHIKAWA, M.; KIMURA, H. Cigarette smoke decreases organic acids levels and population of
49 *bifidobacterium* in the caecum of rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 261–266, jun.
50 2011.
51
- 52 UMBRELLO, G.; ESPOSITO, S. Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics.
53 **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 298, 19 dez. 2016.
54

1 WANG, H.; ZHAO, J. X.; HU, N.; REN, J.; DU, M.; ZHU, M. J. Side-stream smoking reduces intestinal
2 inflammation and increases expression of tight junction proteins. **World Journal of Gastroenterology**, v.
3 18, n. 18, p. 2180–2187, 14 maio 2012.

4
5 WEAVER, C. M. ; MARTIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; ARMSTRONG, A. P.; CLAVIJO, A.; MCCABE,
6 L. D.; MCCABE, G. P.; DUIGNAN, S.; SCHOTERMAN, M. H.; VAN DEN HEUVEL, E. G.
7 Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut
8 fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6501–6510, 22 jun. 2011.

9

1 **ARTIGO CIENTÍFICO B**

2

3 **Alimentos funcionais atenuam o efeito deletério da exposição crônica da fumaça de cigarro em ratos**
4 **na fase de crescimento e quantificado através da dimensão fractal: estudo pré-clínico randomizado**

5

6 **Functional foods attenuate the deleterious effect of chronic exposure of cigarette smoke to rats in the**
7 **growth phase and quantified through fractal dimension: randomized preclinical study**

8

9 Marcelo Fernandes Tribst⁵; Laryssa Mayara Polastri⁶; Heliard Rodrigues dos Santos Caetano¹; Weber
10 Gutemberg Alves de Oliveira¹; Marcos Natal Rufino¹; Osimar Sanches⁷; Hermann Bremer-Neto¹

11

12

RESUMO13 Estudos demonstraram clinicamente e experimentalmente que o tabagismo passivo pode alterar a qualidade
14 óssea, principalmente crianças na fase de crescimento. Alimentos funcionais têm demonstrado efeitos
15 benéficos na saúde de ossos em humanos e animais, assim como atividade anti-inflamatória e antioxidante.
16 Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a qualidade óssea do colágeno através da
17 suplementação de alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico na diáfise do fêmur, de ratos em
18 crescimento expostos cronicamente à fumaça do cigarro, através do método quantitativo dimensão fractal
19 (DF). Sessenta e quatro ratos machos jovens foram randomicamente distribuídos em oito grupos (n=8):
20 controle (C) [dieta basal (DB)]; probiótico (Pro) [DB + probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus*
21 *faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada)]; prebiótico (Pre)
22 [DB + prebiótico (mananoligossacarídeo)]; simbiótico (Sym) (DB + probiótico + prebiótico); controle
23 fumante (CT) [(DB + protocolo de exposição ao tabagismo passivo (PT)]; probiótico fumante (ProT) (DB +
24 probiótico + PT); prebiótico fumante (PreT) (DB + prebiótico + PT); e simbiótico fumante (SymT) (DB +
25 prebiótico + probiótico + PT). Os animais foram mortos após 189 dias de período experimental e os
26 resultados revelaram que a suplementação com probióticos, prebióticos e simbióticos melhoraram
27 significativamente (P<0,05) o parâmetro dimensão fractal da diáfise do fêmur dos ratos expostos
28 cronicamente ou não à fumaça do cigarro. A dimensão fractal determinou um aumento da desorganização do
29 tecido ósseo exposto cronicamente a fumaça do cigarro e nos grupos suplementados com os alimentos
30 funcionais, expostos ou não à fumaça do cigarro, reduzindo benéficamente a desorganização do colágeno
31 ósseo.32 **Palavras Chaves:** Alimentos Funcionais, Fêmur, Massa Óssea, Nutrição, Fumaça do cigarro.

33

34

ABSTRACT35 Studies have demonstrated clinically and experimentally that passive smoking may alter bone quality,
36 especially in growing children. Functional foods have shown beneficial effects on bone health in humans and
37 animals, as well as anti-inflammatory and antioxidant activity. Therefore, the present study aims to evaluate
38 Bone quality of collagen influence through supplementation of functional, probiotic, prebiotic and symbiotic
39 foods in the femoral diaphysis of growing rats chronically exposed to cigarette smoke through quantitative
40 methodthe fractal dimension. Sixty-four young male rats were randomly assigned to eight groups (n = 8):
41 control (C) [basal diet (DB)]; probiotic (Pro) [DB + probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus*⁵ Departamento de Ciências Funcionais, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente - SP, Brasil.⁶ Estudante de Medicina, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente - SP, Brasil.⁷ Departamento de Patologia, Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo – SP, Brasil.

1 faecium, Bifidobacterium thermophilum and Bifidobacterium longum (2-5 10^9 CFU each)], prebiotic (Pre)
2 [DB + prebiotic (mannan oligosaccharide)], symbiotic probiotic + probiotic + PT), prebiotic smoker (PreT)
3 (DB + prebiotic + PT), smoker control (PT + The animals were killed after 189 days of experimental period
4 and the results showed that probiotic, prebiotic and symbiotic supplementation improved significantly (P
5 <0.05), and the symbiosis was smoker (SymT) (DB + prebiotic + probiotic + PT). The fractal dimension
6 (DF) of the femoral diaphysis of chronically or non-chronically exposed animals. DF determined an
7 increased disorganization of bone tissue chronically exposed to cigarette smoke and in groups supplemented
8 with functional foods exposed to cigarette smoke reducing beneficial the disorganization of bone collagen.

9 **Key Words:** Functional Foods, Femur, Bone Mass, Nutrition, Cigarette Smoke.

12 **Introdução**

14 A fumaça do tabaco (T) é uma mistura complexa, dinâmica e reativa contendo cerca de 5.000
15 produtos químicos (NAGAIE et al., 2014) e quando inalada por muito tempo está associada a uma
16 diminuição da massa óssea, sendo, portanto, considerada um fator de risco para o desenvolvimento da
17 osteoporose em seres humanos (HERMIZI et al., 2009). Esse efeito deletério no esqueleto é reconhecido no
18 meio científico (SAHNI; KIEL, 2015).

19 Quando a exposição à fumaça do cigarro é por muito tempo, segue-se um processo inflamatório
20 crônico e que tem o potencial de promover colonização e infecção microbianas aumentadas, persistência de
21 material apoptótico e processamento anormal de restos celulares, indução de autoimunidade ao autoantígeno
22 e remodelação da arquitetura (LEE et al., 2012).

23 Alguns alimentos funcionais têm apresentado resultados benéficos em relação à composição
24 mineral e organização tecidual, melhorando a saúde óssea (COSMAN et al., 2014). Dentre os alimentos
25 funcionais, estudos recentes com murinos descrevem que a suplementação probiótica (microrganismos
26 vivos), pode aumentar a densidade óssea em indivíduos saudáveis e proteger contra a deficiência primária
27 (deficiência de estrogênio), bem como a osteoporose secundária (COLLINS et al., 2017; GAGGIÀ et al.,
28 2010). Os prebióticos, compostos de carboidratos não digeríveis, tem demonstrado melhorar condições
29 inflamatórias crônicas. Também, existem evidências crescentes de efeitos benéficos destes compostos sobre
30 o metabolismo do cálcio, com conseqüente reflexo na saúde dos ossos. Estas novas fibras dietéticas
31 demonstraram aumentar a absorção de cálcio no intestino delgado de modelos pré-clínicos e humanos.
32 Modelos de roedores também têm sido imperativos para a compreensão dos efeitos prebióticos na densidade
33 mineral óssea e nas medidas de força esquelética (WHISNER; CASTILLO, 2018). A associação de
34 probióticos e prebióticos, o simbiótico, tem demonstrado capacidade de modificar beneficemente a
35 composição da microbiota intestinal e o metabolismo mineral, assim, colaborando para um melhor
36 aproveitamento dos nutrientes da dieta e proporcionando um tecido ósseo com maior conteúdo mineral
37 (SCHOLZ-AHRENS et al., 2016).

38 Achados histológicos têm sido utilizados como indicadores de alterações na fisiologia óssea
39 (RISTANOVIĆ et al., 2014) e a dimensão fractal (DF) tem sido uma ferramenta útil para avaliação

1 quantitativa e classificação de imagens, com base na análise de dados experimentais, como imagens
2 microscópicas (KLONOWSKI et al., 2010), o que permite caracterizar estruturas irregulares em lâminas
3 histológicas e ou imagens radiográficas e quantificar as alterações existentes (CROSS, 1997; PACAGNELLI
4 et al., 2016). Nas ciências médicas, a geometria fractal tem sido aplicada como base de ferramentas de estudo
5 que visam objetivos tão distintos como a caracterização da taxa de proliferação celular em tumores malignos
6 (BOSE et al., 2015), caracterização de estruturas irregulares em lâminas histológicas, quantificação de
7 mudanças (CROSS, 1997; HUYNH et al., 2015) e avaliação da mineralização óssea para o diagnóstico de
8 osteoporose (KOH et al., 2012; YAŞAR; AKGÜNLÜ, 2006). Contudo; apesar de ser uma técnica com boa
9 aplicabilidade para análise histológica, não foram encontrados relatos de pesquisa na literatura científica
10 avaliando osso compacto, como o fêmur, de ratos expostos cronicamente à fumaça de cigarro e
11 suplementados com alimentos funcionais, usando dimensão fractal. O uso dessa técnica poderia abrir
12 caminho para uma medida padronizada dos achados histológicos, permitindo uma análise mais precisa dos
13 resultados, e possibilitando a comparação direta dos resultados entre os estudos, pois é uma técnica na qual
14 os resultados são independentes do avaliador.

15 O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito benéfico dos alimentos funcionais, probiótico,
16 prebiótico e simbiótico na qualidade do terço médio do fêmur, osso compacto, de ratos em fase de
17 crescimento expostos cronicamente à fumaça do cigarro, através do método quantitativo dimensão fractal,
18 visando verificar a desorganização do colágeno.

19
20

21 **Materiais e Métodos**

22

23 *Cigarro e geração da fumaça*

24 No período de adaptação e experimental foram utilizados cigarros de marca comercial
25 (Tabacalera del Este S.A., Hernandarias, Paraguai) e apresentou valores de alcatrão, nicotina e CO de 10
26 mg/cigarro, 0,8 mg/cigarro de nicotina e 10 mg/cigarro de monóxido de carbono, respectivamente, segundo
27 ISO (International Organization for Standardization) 3402. Os cigarros foram fumados em conformidade
28 com a norma ISO 4387. Os métodos de condicionamento a exposição e geração de fumaça foram realizados
29 conforme descritos por Tsuji et al. (2013).

30

31 *Caracterização da atmosfera de exposição à fumaça*

32

33 As concentrações de material particulado total úmido (WTPM) e monóxido de carbono (CO)
34 foram monitoradas via monitor de aerossol em tempo real (RAM; Microdust, Pro; Casella, Amherst, NH,
35 EUA) e monitor de CO (TxiPro® - BioSystems Diagnostics Pvt. Ltd., EUA), respectivamente. O coeficiente
36 de variação (% CV) da concentração de exposição (WTPM) estava dentro de $\pm 10\%$ por análise gravimétrica

1 usando filtro de fibra de vidro Cambridge 47 mm (Performance Systematix Inc., Grand Rapids, MI, EUA).
2 As concentrações reais médias de exposição foram calculadas a partir da massa coletada nos filtros e o
3 volume total de ar extraído pelos filtros (TSUJI et al., 2013).

4 A temperatura e a umidade da atmosfera de exposição foram medidas diariamente a partir de
5 uma porta de exposição animal representativa para cada grupo de exposição (Vaisala Inc., Woburn, MA,
6 EUA).

7

8 *Animais e cuidados com os animais*

9

10 Todos os ratos utilizados neste estudo foram provenientes do Biotério Central da
11 Universidade do Oeste Paulista (Presidente Prudente, São Paulo, Brasil). A dieta basal foi formulada para
12 atender às necessidades nutricionais dos ratos de acordo com os padrões NRC (Tabela 1) (HAN et al., 2016)
13 e água potável da torneira (Cidade de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil), a vontade, exceto durante os
14 períodos de exposição.

15 Sessenta e quatro ratos Wistar machos em fase de crescimento (*Rattus norvegicus albinus*),
16 com massa corpórea inicial média de $46,3 \pm 2,6$ g, 21 dias de idade, foram alojados em gaiolas coletivas com
17 quatro animais cada, durante o período experimental de 189 dias. Os animais foram alojados em caixas de
18 animais com ciclos de 12 h de luz / 12 h escuro a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $55 \pm 10\%$ e média de trocas de ar de 15
19 trocas/hora.

20 Ocultação da alocação, estratégia de manejo e tratamentos dos animais foi realizada para
21 reduzir viés no estudo (MA et al., 2017). O experimento durou 189 dias, sendo 5 dias de adaptação e 184
22 dias experimental à estratégia de manejo e a exposição a fumaça do cigarro e alimentação com dietas basal e
23 ou experimentais (Tabela 1 e Figura 1).

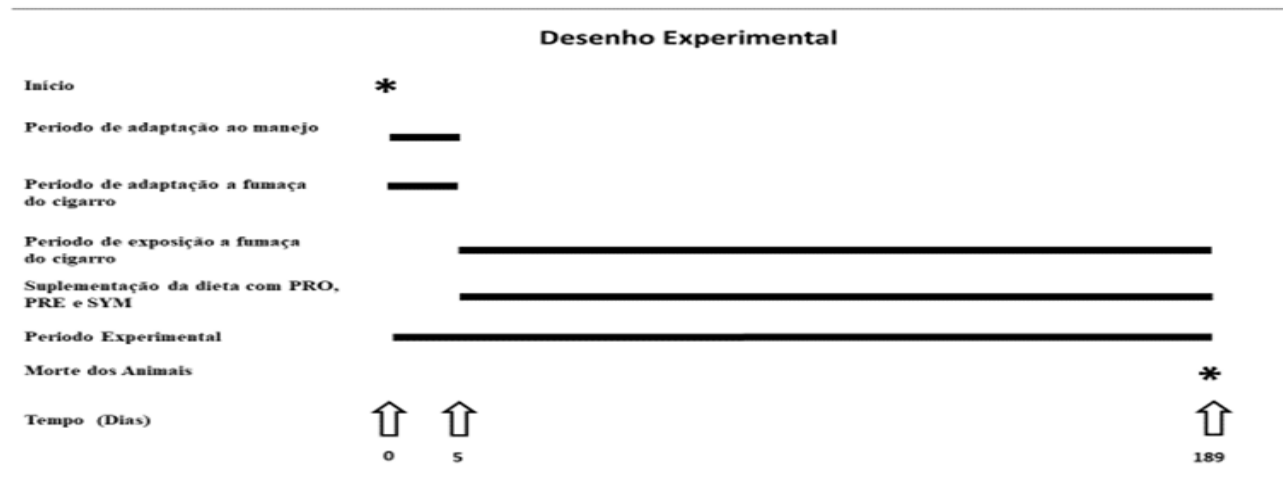
24 O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos da Declaração Universal
25 dos Direitos Animais da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO).
26 O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos em Animais da instalação de teste
27 antes do início do experimento, sob o protocolo nº 2686, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE),
28 Presidente Prudente, Brasil.

29

30

31

32



1
2 **Figura 1:** Representação gráfica da linha do tempo: Grupos: A= Grupos não expostos a fumaça do cigarro;
3 B = Grupos expostos a fumaça do cigarro. Tratamentos/Grupos: C: dieta basal; Pro: dieta basal suplementada
4 com 2 g de probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e
5 *Bifidobacterium longum* ($2-5 \cdot 10^9$ UFC cada)]; Pre: dieta basal suplementada com 1g de
6 mananoligossacarídeo (fração activa, α -1,3 e α -1,6 derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30%
7 de α -mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym: dieta basal suplementada
8 com 2 g Probióticos e 1 g Prebiótico; CS: dieta basal + protocolo tabagismo passivo (PT); ProS: dieta basal
9 suplementada com 2 g probiótico + PT; PreS: dieta basal suplementada com 1g prebiótico + PT; e SymS:
10 dieta basal suplementada com 2 g probiótico + 1 g prebiótico + PT.

11

12

13 *Desenho do estudo*

14

15 Os animais foram aleatoriamente agrupados por meio de uma tabela de sequências geradas
16 pelo programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016) e distribuídos em oito grupos experimentais
17 ($n=8$), os quais foram alimentados com: Controle (C), dieta basal; Probiótico (Pro), dieta basal suplementada
18 com 20 g Kg^{-1} de uma associação de microrganismos probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus*
19 *faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum* ($2-5 \cdot 10^9$ UFC cada) (Brazilian Enterprise
20 to Increase Livestock Productivity – Embraupac, Paranavaí – PR, Brasil)]; Prebiótico (Pre), dieta basal
21 suplementada com 10 g Kg^{-1} de prebiótico [mananoligossacarídeo (MOS), composto da fração activa α -1,3 e
22 α -1,6, apresentando 30% de α -mananos e derivado de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*];
23 Simbiótico (Sym), dieta basal suplementada com 20 g Kg^{-1} de uma associação de microrganismos
24 probióticos e 10 g Kg^{-1} de prebiótico; Controle Tabagista (CS), dieta basal e submetidos ao protocolo de
25 exposição à fumaça de cigarro; Probiótico Tabagista (ProS), dieta basal suplementada com 20 g Kg^{-1} de uma
26 associação de microrganismos probióticos e submetidos ao protocolo de exposição a fumaça do cigarro;
27 Prebiótico Tabagista (PreS), dieta suplementada com 10 g Kg^{-1} de prebiótico e submetidos ao protocolo de

1 exposição a fumaça do cigarro; e Simbiótico (SymS), dieta basal suplementada com 20 g Kg⁻¹ de uma
 2 associação de microrganismos probióticos e 10 g Kg⁻¹ de prebiótico e submetidos ao protocolo de exposição
 3 a fumaça do cigarro.

4

5

6 **Tabela 1.** Composição dos ingredientes e nutrientes das dietas basal e experimentais.

Ingredientes (g)	Dieta basal e experimentais			
	Basal	Prob	Pre	Sym
Farelo de milho	82.95	80.95	81.95	79.95
Óleo de Soja	7.00	7.00	7.00	7.00
L-Cisteína	0.30	0.30	0.30	0.30
Celulose	5.00	5.00	5.00	5.00
Cloreto de Sódio	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamina mix*	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix**	3.50	3.50	3.50	3.50
Probiótico***	0.00	2.00	0.00	2.00
Prebiótico****	0.00	0.000	1.00	1.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

7 * Vitamina mix/Kg: Ácido nicotínico, 30 mg; Pantotenato, 15 mg; Piridoxina, 6 mg; Tiamina, 5 mg; Riboflavina, 6 mg;
 8 Ácido fólico, 2 mg; Biotina, 0,2 mg; Vitamina B12, 25 mg; Vitamina E, 75UI; Vitamina A, 4000 UI; Vitamina D3,
 9 1000 UI; Vitamina K, 900 mg; Colina, 1000 mg. ** Mineral mix mg/Kg: Cálcio, 5000; Fósforo, 1,561; Potássio, 3600;
 10 Enxofre, 300; Sódio, 1019; Cloro, 1,574; Magnésio, 507; Ferro, 35; Zinco, 30; Manganês, 10; Cobre, 6; Iodo, 0,2;
 11 Molibdênio, 0,15; Selênio, 0,15. *** *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum*
 12 e *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada). **** Mananoligossacarídeo (MOS), composto da fração activa α -1,3 e
 13 α -1,6, apresentando 30% de α -mananos e derivado de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

14

15

16 *Protocolo e período de exposição ao tabagismo passivo*

17

18 Durante cinco dias, período de adaptação, os animais dos grupos CS, ProS, PreS e SymS
 19 foram expostos diariamente à fumaça do cigarro numa câmara, com temperatura controlada de 22°C, por um
 20 período de 10 minutos e os grupos C, Pro, Pre e Sym foram expostos ao ar filtrado pelo mesmo período.
 21 Após esse período, iniciou o período experimental de 184 dias, no qual os grupos CS, ProS, PreS e SymS
 22 foram expostos à fumaça de cigarro por 60 minutos diários, 30 minutos no período da manhã (7:00 h) e 30
 23 minutos no período da tarde (19:00 h), cinco dias por semana e os grupos C, Pro, Pre e Sym foram expostos
 24 ao ar filtrado pelo mesmo período de tempo, horário e número de dias semanal. A concentração média da
 25 fumaça do cigarro foi ajustada diariamente para conter 350 partes por milhão (ppm) de monóxido de carbono

1 (CO) durante o período de exposição (TxiPro® - BioSystems Diagnostics Pvt. Ltda, EUA) (KOZMA et al.,
2 2014).

3

4 *Sacrifício e Análise Histológica*

5

6 Aos 210 dias de idade, todos os ratos foram anestesiados (Thiopentax, Cristália - Produtos
7 Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil), mortos por exsanguinação e os fêmures direito e
8 esquerdo de todos os animais foram desarticulados do quadril e removidos os tecidos moles circundantes. Os
9 fêmures direitos foram dissecados, limpos e submetidos à descalcificação em solução Anna Morse
10 (FERNANDES et al., 2007) e posteriormente fixados em parafina. As lâminas para análises histológicas
11 foram confeccionadas a partir de cortes de cinco μm dos blocos de parafina da porção do terço médio do
12 osso compacto, utilizando micrótomo modelo RM2235 (Leica Microsystems, São Paulo, SP, Brazil). Os
13 cortes foram então corados com Tricômio de Masson (TM).

14

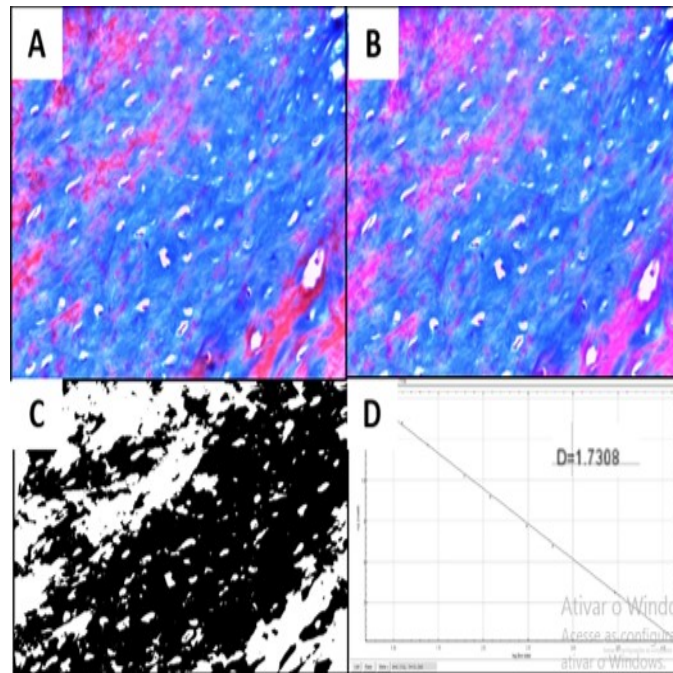
15 *Análise da Dimensão Fractal (DF)*

16

17 Para análise da DF, as lâminas do terço médio do osso compacto coradas por TM foram
18 fotografadas e analisadas. As imagens obtidas foram binarizadas e as regiões de colágeno (inicialmente
19 coradas em azul) adquiriram a coloração preta, as demais regiões tornaram-se brancas. A DF foi estimada
20 pelo método *box-counting*, por meio do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos –
21 NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

22

23 O *software* considera o *box-counting* em duas dimensões, permitindo a quantificação da
24 distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. Como consequência,
25 duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a
26 mesma dimensão fractal. Dessa forma, na análise das lâminas histológicas, o fractal baseia-se na relação
27 entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado pode ser quantitativamente expresso como a dimensão
28 fractal do objeto que é $DF = (\text{Log } N_r / \log r - 1)$, sendo N_r a quantidade de elementos iguais necessários para
29 preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal calculada com o
30 *software* Image J ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes. Os tamanhos das caixas
31 usadas nas análises foram dos tamanhos padrões do software (2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 32 e 64) (Figura 2).



1 Figura 2: A - Corte histológico do fêmur direito corados em tricromero de masson (TM), aumento 40x. B -
 2 Processo de binarização. C - Imagem de TM após o processo de binarização. Observam-se o colágeno em
 3 preto e todo o restante (citoplasma, membrana plasmática e outros elementos), em branco. D - Regressão
 4 linear pela sobreposição de quadrados (N) de lados (r) progressivamente menores, sendo N_r a quantidade de
 5 quadrados de lado r necessários para cobrir a imagem, a cada tamanho escolhido. A dimensão fractal é a
 6 inclinação da linha de regressão dos valores dos dois log.

7

8

9 *Análise estatística*

10

11

12

13

14

15

16

17

17 **Resultados**

18

19

20

21

22

23

Durante o período experimental não observamos sinais clínicos de intoxicação ou sofrimento dos animais, também não ocorreram morte de animais durante os 189 dias do período experimental (PE). Após o PE, as análises dos cortes histológicos do tecido ósseo do terço médio dos fêmures dos ratos, revelaram que a média dos resultados da DF dos grupos não expostos cronicamente a fumaça do cigarro foram significativamente ($P < 0,05$) menores do que os expostos.

1 Observamos que a média dos resultados da DF do grupo C foi significativamente ($P < 0,05$)
 2 maior que a DF média dos grupos Pro, Pre e Sym. A média da DF do grupo C foi menor do que dos grupos
 3 CT, PreT e SimT e diferiram significativamente ($P < 0,05$), porém não diferiu do grupo ProT ($P > 0,05$)
 4 (Tabela 2 e Figura 2).

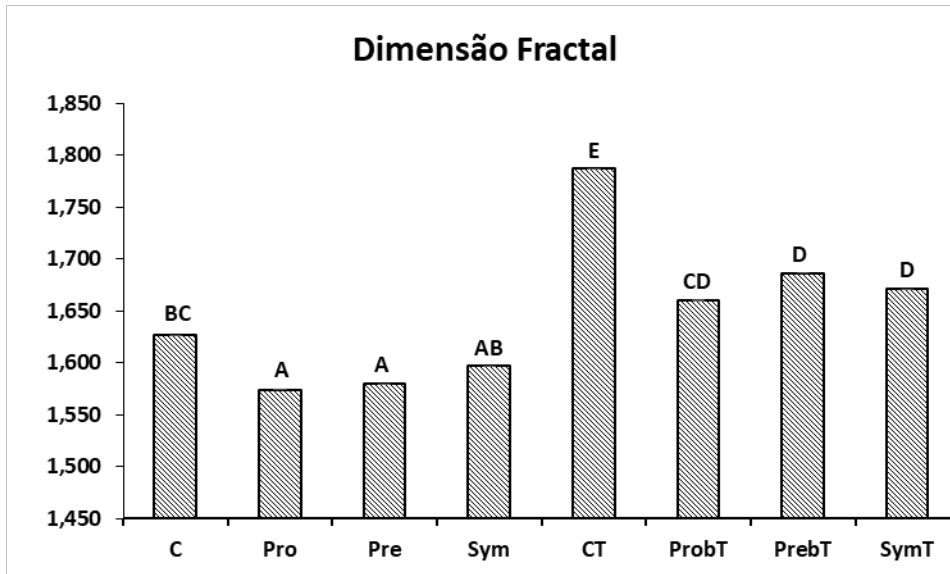
7 **Tabela 2.** Análise do colágeno através da Dimensão Fractal (DF) do terço médio do fêmur de ratos Wistar.

Resultados	Tratamentos							
	C	Prob	Pre	Sym	CT	ProbT	PrebT	SymT
DF	1,626 ^{BC}	1,574 ^A	1,579 ^A	1,597 ^{AB}	1,787 ^E	1,660 ^{CD}	1,686 ^D	1,671 ^D
SD	0,077	0,042	0,045	0,058	0,051	0,057	0,042	0,058
DE	0,013	0,007	0,008	0,010	0,008	0,009	0,007	0,010

8 Os valores correspondem à média \pm SD. SD: desvio padrão da média. DE: Erro padrão da média. Médias seguidas de
 9 mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). C: dieta basal; Pro: dieta basal suplementada
 10 com 2g de probióticos [*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e
 11 *Bifidobacterium longum* (2–5 10⁹ UFC cada)]; Pre: dieta basal suplementada com 1g de mananoligossacarídeo (fração
 12 activa, α -1,3 e α -1,6 derivada de um mananoligossacárideo, apresentando 30% de α -mananos, derivados de cepa de
 13 levedura *Saccharomyces cerevisiae*); Sym: dieta basal suplementada com 2 g Probióticos e 1 g Prebiótico; CT: dieta
 14 basal + protocolo tabagismo passivo; ProS: dieta basal suplementada com 2 g probiótico + PT; PreT: dieta basal
 15 suplementada com 1g prebiótico + PT; e SymT: dieta basal suplementada com 2 g probiótico e 1 g prebiótico + PT.

16
 17
 18 As análises demonstraram que a DF média do grupo CT foi significativamente maior em
 19 comparação com os grupos C, Pro, Pre, Sym, ProT, PreT e SymT ($P < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 2).

20



1

2 **Figura 3:** Gráfico com as médias da DF dos grupos analisados. Médias seguidas de mesma letra na coluna
 3 não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

4

5

6 **Discussão**

7

8 Os resultados revelaram aumento da média da DF na cortical da diáfise do fêmur do grupo
 9 de ratos expostos cronicamente à fumaça do cigarro, quando comparado com o grupo controle não fumante.
 10 Agentes tóxicos da fumaça do cigarro alteram as características elásticas da microestrutura do tecido ósseo
 11 relacionados à síntese de colágeno, comprometendo a sua organização e desencadeando uma desestruturação
 12 óssea.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

O desarranjo estrutural das fibras de colágeno pode ser mensurado pelo método de análise fractal que nos últimos anos tem ganhado espaço no meio científico como uma boa ferramenta para medir essas variações complexas de desorganização (KNUUTINEN et al., 2002), pois quantifica alterações morfofuncionais, tanto no envelhecimento quanto nas patologias (ZAIA, 2015). O aumento da DF observado nesse estudo deve ser decorrente a diminuição da atividade pró-osteoclastica, aumento da atividade osteoblastica, modificação devido a fatores exógenos, melhora da absorção intestinal pela diminuição do pH e liberação de fatores endógenos, bloqueadores inflamatórios, inter leucina 1 (IL-1) e interleucina 7 (IL-7) terem sido caracterizados por uma dimensão fractal aumentada (CROSS, 1997).

A suplementação na dieta dos ratos com alimentos funcionais, probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum*), prebiótico (mananoligossacarídeo – MOS) e ou simbiótico (associação dos microrganismos probióticos e prebiótico) acarretou uma diminuição da DF nos grupos de animais expostos ou não à fumaça do cigarro. Na literatura não se observou estudos em relação a quantificação por DF do efeito da suplementação de alimentos

1 funcionais no tecido ósseo, fêmur, submetidos ao efeito crônico deletério da fumaça do cigarro no tecido
2 ósseo de ratos, como modelo experimental.

3 Porém, estudos relatam que os alimentos funcionais adicionados na dieta, através do trato
4 intestinal, podem influenciar benéficamente a saúde do osso. Isso ocorre através da regulação da absorção de
5 minerais, que é necessária para ossos saudáveis, principalmente cálcio, fósforo e magnésio. Além disso,
6 fatores endócrinos que influenciam a absorção desses minerais, bem como fatores derivados do intestino,
7 como incretinas e serotonina, também podem influenciar a renovação óssea (BAGGIO; DRUCKER, 2007;
8 COLLINS et al., 2017; YADAV et al., 2008). Em camundongos isentos de germes (germ-free), a
9 suplementação de probióticos na dieta demonstrou a influência benéfica desses microrganismos no
10 microbioma intestinal e modulação da fisiologia óssea (LI et al., 2016; SJÖGREN et al., 2012).

11 Muitos gêneros de bactérias como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium*
12 têm sido usados por seus efeitos benéficos como probióticos e esses microrganismos ou seus fatores
13 secretados interagem com a barreira epitelial intestinal e as células da lâmina própria. Dentro da lâmina
14 própria as bactérias probióticas/fatores secretados interagem com células apresentadoras de antígenos, como
15 as células dendríticas, modulando sua resposta imune. Isso resulta em uma redução das citocinas
16 inflamatórias, levando a um melhora da absorção de minerais do lúmen intestinal. Os fatores secretados por
17 bactérias butirato, propionato e acetado, passam então para a corrente sanguínea e são transportados para o
18 osso, melhorando a atividade osteoclásticas e bloqueando a atividade osteoblásticas, bem como células do
19 sistema imunológico, podendo reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e pró-osteoclastogênicas.
20 Além disso, atuam reduzindo o efeito do estresse oxidativo, ao mesmo tempo em que aumentam a aposição
21 mineral e a melhora genética óssea através da expressão de Wnt10b. Esta modulação resulta na redução da
22 formação de osteoclastos, levando subsequentemente a formação do tecido ósseo, evitando a osteoporose.
23 (ARUNACHALAM, 1999; CAMPBELL et al., 1997; COLLINS et al., 2017; CRITTENDEN et al., 2003;
24 KRUGER et al., 2009).

25 A geração de produtos metabólicos por ação bacteriana depende da disponibilidade do
26 substrato. Esses substratos são em parte fornecidos por prebióticos e, portanto, os prebióticos são
27 componentes críticos que podem ser usados para modificar o tipo de metabólitos produzidos pela microbiota
28 intestinal (MCCABE et al., 2015). Quanto aos efeitos dos prebióticos no turnover ósseo, vários estudos
29 indicam que os prebióticos podem afetar a atividade de osteoblastos e/ou osteoclastos, com a resposta
30 provavelmente dependente da condição e do prebiótico usado. Poucos estudos utilizando o prebiótico,
31 mananoligossacarídeo, suplementado na dieta de animais como modelo experimental ou em humanos foram
32 observados na literatura. Porém, devido os nossos bons resultados observados nesse estudo, encorajamos
33 novos experimentos com esse prebiótico, proveniente da parede celular da levedura *Saccharomyces*
34 *cerevisiae*, associados ou não a microrganismos probióticos.

35

36

1 Conclusão

2

3 Nossos resultados sugerem que a exposição crônica de ratos em fase de crescimento ao
 4 tabagismo passivo aumenta a desorganização óssea dos fêmures. A suplementação de alimentos funcionais,
 5 probiótico (associação de *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e
 6 *Bifidobacterium longum*), prebiótico (mananoligossacarídeo) e simbiótico (associação de probiótico e
 7 prebiótico), reduziram beneficemente a desorganização da estrutura óssea causada pelos efeitos deletérios da
 8 exposição crônica à fumaça de cigarro, melhorando a qualidade óssea nos fêmures dos ratos em crescimento.

9

10

11 Referências

12

13 ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition**
 14 **Research**, v. 19, n. 10, p. 1559–1597, 1 out. 1999.

15

16 BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p.
 17 2131–2157, maio 2007.

18

19 BOSE, P.; BROCKTON, N. T.; GUGGISBERG, K.; NAKONESHNY, S. C.; KORNAGA, E.;
 20 KLIMOWICZ, A. C.; TAMBASCO, M.; DORT, J. C. Fractal analysis of nuclear histology integrates tumor
 21 and stromal features into a single prognostic factor of the oral cancer microenvironment. **BMC Cancer**, v.
 22 15, n. 1, p. 409, 15 dez. 2015.

23

24 CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel
 25 mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n.
 26 1, p. 130–136, 1 jan. 1997.

27

28 COLLINS, F. L.; RIOS-ARCE, N. D.; SCHEPPER, J. D.; PARAMESWARAN, N.; MCCABE, L. R. The
 29 potential of probiotics as a therapy for osteoporosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, aug 2017.

30

31 COSMAN, F.; DE BEUR, S. J.; LEBOFF, M. S.; LEWIECKI, E. M.; TANNER, B.; RANDALL, S.;
 32 LINDSAY, R. Guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10,
 33 p. 2359–2381, 15 out. 2014.

34

35 CRITTENDEN, R. G.; MARTINEZ, N. R.; PLAYNE, M. J. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt
 36 starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 217–
 37 222, 15 fev. 2003.

38

39 CROSS, S. S. Fractals in pathology. **The Journal of Pathology**, v. 182, n. 1, p. 1–8, maio 1997.

40

41 FERNANDES, M. I.; GAIO, E. J.; ROSING, C. K.; OPPERMAN, R. V.; RADO, P. V. Microscopic
 42 qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. **Brazilian**
 43 **Oral Research**, v. 21, n. 2, p. 134–139, jun. 2007.

44

45 GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food
 46 production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S15–S28, 31 jul. 2010.

47

48 HAN, M.; SONG, P.; HUANG, C.; REZAEI, A.; FARRAR, S.; BROWN, M. A.; MA, X. Dietary grape seed

- 1 proanthocyanidins (GSPs) improve weaned intestinal microbiota and mucosal barrier using a piglet model.
2 **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80313–80326, 6 dez. 2016.
- 3
- 4 HERMIZI, H.; FAIZAH, O.; IMA-NIRWANA, S.; AHMAD NAZRUN, S.; NORAZLINA, M. Beneficial
5 effects of tocotrienol and tocopherol on. con bone histomorphometric parameters in sprague–dawley male
6 rats after nicotine cessation. **Calcified Tissue International**, v. 84, n. 1, p. 65–74, jan. 2009.
- 7
- 8 HUYNH, H. N.; PRADANA, A.; CHEW, L. Y. The Complexity of Sequences Generated by the Arc-Fractal
9 System. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0117365, fev. 2015.
- 10
- 11 KLONOWSKI, W.; STEPIEN, R.; STEPIEN, P. Simple fractal method of assessment of histological images
12 for application in medical diagnostics. **Nonlinear Biomedical Physics**, v. 4, n. 1, p. 7, 2010.
- 13
- 14 KNUUTINEN, A.; KOKKONEN, N.; RISTELI, J.; VÄHÄKANGAS, K.; KALLIOINEN, M.; SALO, T.;
15 SORSA, T.; OIKARINEN, A. Smoking affects collag.ix turnover in human skin. **British Journal of**
16 **Dermatology**, v. 146, n. 4, p. 588–594, abr. 2002.
- 17
- 18 KOH, K.-J.; PARK, H.-N.; KIM, K.-A. Prediction of age-related osteoporosis using fractal analysis on
19 panoramic radiographs. **Imaging Science in Dentistry**, v. 42, n. 4, p. 231, dez. 2012.
- 20
- 21 KOZMA RDE, L.; ALVES, E. M.; BA. RBOSA-DE-OLIVEIRA, V. A.; LOPES, F. D.; GUARDIA, R. C.;
22 BUZO, H. V.; FARIA, C. A.; YAMASHITA, C.; CAVAZZANA JÚNIOR, M.; FREI, F.; RIBEIRO-PAES,
23 M. J.; RIBEIRO-PAES, J. T. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar
24 rats. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 1, p. 46–54, jan. 2014.
- 25
- 26 KRUGER, M. C.; FEAR, A.; WEI-HANG, C.; PLIMMER, G. G.; SCHOLLUM, L. M. The effect of
27 *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on mineral absorption and bone health in growing male and ovariectomised
28 female rats. **Dairy Science and Technology**, v. 89, n. 3–4, p. 219–231, 7 maio 2009.
- 29
- 30 LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. Cigarette smoking and inflammation. **Journal of Dental Research**,
31 v. 91, n. 2, p. 142–149, 29 fev. 2012.
- 32
- 33 LI, J.Y.; CHASSAING, B.; TYAGI, A. M.; VACCARO, C.; LUO, T.; ADAMS, J.; DARBY, T. M.;
34 WEITZMANN, M. N.; MULLE, J. G.; GEWIRTZ, A. T.; JONES, R. M.; PACIFICI, R. Sex steroid
35 deficiency–associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. **Journal of Clinical**
36 **Investigation**, v. 126, n. 6, p. 2049–2063, 25 abr. 2016.
- 37
- 38 MCCABE, L.; BRITTON, R. A.; PARAMESWARAN, N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health:
39 role of the intestine and its microbiome. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 6, p. 363–371, 2015.
- 40
- 41 NAGAIE, M.; NISHIURA, A.; HONDA, Y.; FUJIWARA, S. I.; MATSUMOTO, N. A comprehensive
42 mixture of tobacco smoke components retards orthodontic tooth movement via the inhibition of
43 osteoclastogenesis in a rat model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18610–
44 18622, 15 out. 2014.
- 45
- 46 PACAGNELLI, F. L.; SABELA, A. K.; MARIANO, T. B.; OZAKI, G. A.; CASTOLDI, R. C.; CARMO, E.
47 M.; CARVALHO, R. F.; TOMASI, L. C.; OKOSHI, K.; VANDERLEI, L. C. Fractal Dimension in
48 Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. **Arquivos**
49 **Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 1, p. 33–39, 2016.
- 50
- 51 R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R SoftwareR: A Language and Environment for Statistical**
52 **Computing**, 2016.
- 53
- 54 RISTANOVIĆ, D.; STEFANOVIĆ, B. D.; PUŠKAŠ, N. Fractal analysis of dendrite morphology using

- 1 modified box-counting method. **Neuroscience Research**, v. 84, p. 64–67, 2014.
- 2 SAHNI, S.; KIEL, D. P. Smoking, alcohol, and bone health. In: **Nutrition and bone health**. New York, NY:
3 Springer New York, 2015. p. 489–504.
- 4
- 5 SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ADOLPHIA, B.; ROCHAT, F.; BARCLAY, D. V.; VRESE, M.; AÇIL, Y.;
6 SCHREZENMEIRA, J. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in
7 ovariectomized rats: impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over.
8 **NFS Journal**, v. 3, p. 41–50, 2016.
- 9
- 10 SJÖGREN, K.; ENGDAHL, C.; HENNING, P.; LERNER, U. H.; TREMAROLI, V.; LAGERQUIST, M.
11 K.; BÄCKHED, F.; OHLSSON, C. The gut microbiota regulates bone mass in mice. **Journal of Bone and**
12 **Mineral Research**, v. 27, n. 6, p. 1357–1367, jun. 2012.
- 13
- 14 WHISNER, C. M.; CASTILLO, L. F. Prebiotics, bone and mineral metabolism. **Calcified Tissue**
15 **International**, v. 102, n. 4, p. 443–479, 27 abr. 2018.
- 16
- 17 YADAV, V. K.; RYU, J. H.; SUDA, N.; TANAKA, K. F.; GINGRICH, J. A.; SCHÜTZ, G.; GLORIEUX,
18 F. H.; CHIANG, C. Y.; ZAJAC, J. D.; INSOGNA, K. L.; MANN, J. J.; HEN, R.; DUCY, P.; KARSENTY,
19 G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. **Cell**, v. 135, n. 5, p.
20 825–837, 28 nov. 2008.
- 21
- 22 YAŞAR, F.; AKGÜNLÜ, F. The differences in panoramic mandibular indices and fractal dimension
23 between patients with and without spinal osteoporosis. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 35, n. 1, p. 1–9,
24 jan. 2006.
- 25
- 26 ZAIA, A. Fractal lacunarity of trabecular bone and magnetic resonance imaging: New perspectives for
27 osteoporotic fracture risk assessment. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 2, p. 221, 18 mar. 2015.

ANEXO 1

Certificado

<http://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=5fd5dac199a202f77cdb1de27b6abbe0>**UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

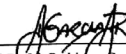
PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica**Certificado**

Certificamos que **MARCELO FERNANDES TRIBST (discente)**, **HELIARD RODRIGUES DOS SANTOS CAETANO (discente)**, **GABRIEL JOSE DOS SANTOS MORALES (discente)**, **RAFAEL DE OLIVEIRA PENA NETO (discente)**, **HERMANN BREMER NETO (orientador responsável)** desenvolveu(ram) o projeto de pesquisa de pós-graduação e de iniciação científica "A INFLUENCIA DE PREBIOTICO, PROBIOTICO E SIMBIOTICOS SOBRE DMO DO FEMUR DE RATOS EXPOSTOS PASSIVAMENTE DA FUMAÇA DO CIGARRO" cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 2686, durante o período de Julho/2015 a Junho/2017.

- Presidente Prudente, 9 de Fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Adilson Eduardo Guelfi
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação



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

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 5fd5dac199a202f77cdb1de27b6abbe0

ANEXO 2

NORMAS DE PUBLICAÇÃO



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivo e política editorial](#)
- [Preparação de originais](#)

ISSN 1678-4596 *versão
online*

Objetivo e política editorial

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

Preparação de originais

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

Empresas credenciadas:

- American Journal Experts (<http://www.journalexerts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)

- Paulo Boschcov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

O trabalho após tradução e o respectivo certificado devem ser enviados para: rudiweiblen@gmail.com

As despesas de tradução serão por conta dos autores. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem. Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuírem páginas além do estipulado terão um custo adicional para a publicação ([vide taxa](#)).

3. O artigo científico (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) deverá conter os seguintes

tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. A revisão bibliográfica (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) deverá conter os seguintes

tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) deverá conter os seguintes tópicos:

Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais**

obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

11.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

11.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

11.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

11.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo: MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em

Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online.

Available from:

<<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>.

Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000.

Especiais. Online. Available from:

<<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

12. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.
15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).
16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decurso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.
20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

Critérios de avaliação

Todos os trabalhos submetidos são inicialmente examinados pela equipe CR, comitê editorial e de área e então enviados a dois avaliadores ad hoc no mínimo. As revisões são submetidas normalmente para três consultores ad hoc.