

EFEITO NEFROPROTETOR DA AÇÃO DE PROBIÓTICOS EM RATOS INTOXICADOS
POR DICROMATO DE POTÁSSIO

MATHEUS CAMPOS GARCIA PARRA

**EFEITO NEFROPROTETOR DA AÇÃO DE PROBIÓTICOS EM RATOS INTOXICADOS
POR DICROMATO DE POTÁSSIO**

MATHEUS CAMPOS GARCIA PARRA

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis

636.089 Parra, Matheus
P258e Efeito nefroprotetor da ação de probióticos em ratos intoxicados por dicromato de potássio. / Matheus Campos Garcia Parra. - Presidente Prudente, 2015.
38 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis.

1. Probiótico. 2. Dicromato de Potássio. 3. Filtração glomerular. 4. Aspectos histopatológicos dos rins. 5. Intoxicação. I. Título.

MATHEUS CAMPOS GARCIA PARRA

**EFEITO NEFROPROTETOR DA AÇÃO DE PROBIÓTICOS EM RATOS INTOXICADOS
POR DICROMATO DE POTÁSSIO**

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

Presidente Prudente, 11 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

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

Banca: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Faculdade de Ciências e Letras de Assis - SP

DEDICATÓRIAS

Aos

Meus pais; Adenir Garcia Parra e Terezinha Campos Garcia Parra, que me deram a vida e todas as oportunidades de crescer como ser humano e profissional.

À

Minha esposa; Priscila Aparecida Blasioli Pereira e ao meu filho guerreiro; Kauã Blasioli Parra que sempre estiveram ao meu lado, não deixando com que eu desistisse dos meus sonhos.

Aos

Meus irmãos; Tiago Campos Garcia Parra e Karina Campos Garcia Parra, que sempre estiveram ao meu lado, me motivando e apoiando sempre que possível.

Ao

Meu amigo e irmão Reinaldo Camacho Bezerra, companheiro de trabalho e grande incentivador, que fez todo o possível para que mais essa qualificação fosse concluída.

Aos

Meus amigos e professores Dr. Paulo Eduardo Pardo; Dra. Gisele Alborghetti Nai e Dr. Hermann Bremer Neto que demonstraram um carinho enorme em ajudar durante a pesquisa, com seus conhecimentos infinitos e palavras de incentivo.

Ao

Meu orientador professor doutor Luis Souza Lima de Souza Reis, amigo de todos os momentos, por confiar na pesquisa e orientar de forma eximia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Souza Lima de Souza Reis, que esteve ao meu lado em todos os momentos, não medindo esforços para que eu pudesse concluir a pesquisa.

Ao Professor Dr. Paulo Eduardo Pardo, que nunca mediu esforços para orientar e aconselhar durante a pesquisa.

A Professora Dra. Gisele Alborghetti Nai, por contribuir com sua experiência e inteligência durante o processo de qualificação.

Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida, pelas orientações e contribuições frente às análises estatísticas.

Aos funcionários do Laboratório e Biotério em especial Willian, Graziela e Lucas que acompanharam todo o processo experimental.

Aos alunos de graduação da Medicina Marcelo Wainer Motta Abdelnour e Karen Cristine da Silva, pela colaboração durante o experimento.

A Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE e a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pelos anos fecundos.

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto por sua participação na banca de qualificação e defesa.

A todos, meu obrigado eterno.

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem, de repente, aprende.”

João Guimarães Rosa

RESUMO

EFEITO NEFROPROTETOR DA AÇÃO DE PROBIÓTICOS EM RATOS INTOXICADOS POR DICROMATO DE POTÁSSIO

Objetivou-se avaliar o efeito de probiótico na função renal de ratos Wistar intoxicados por dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Utilizou-se 80 ratos Wistar, machos com 21 a 25 dias, divididos aleatoriamente em dois tratamentos (n=40 ratos/tratamento). No tratamento DK os animais consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de $K_2Cr_2O_7$ adicionado na dieta e o tratamento DK+P os ratos consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de $K_2Cr_2O_7$ na dieta com 0,2% de probiótico. Esses animais consumiram suas respectivas dietas durante 90 dias, foram eutanasiados por exsanguinação e colhidas amostras de sangue para realização de dosagem sérica de creatinina e uréia e realizou-se nos rins análise histopatológico. A creatinina sérica do tratamento DK+P foi significativamente ($p<0,05$) menor em relação ao tratamento DK em todas as doses de dicromato estudadas. A uréia sérica não diferiu significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos DK e DK+P. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na concentração sérica de creatinina e uréia dos ratos que consumiram 0 e 12 mg de dicromato e probiótico, mas dos demais animais a creatinina e uréia sérica aumentou significativamente ($p<0,05$) juntamente com as doses crescentes de dicromato estudadas em ambos os tratamentos experimentais. Os ratos dos tratamentos DK e DK+P apresentaram degeneração hidrópica nos túbulos renais em todas as doses estudadas de $K_2Cr_2O_7$. Os ratos do tratamento DK apresentaram nefrite intersticial. Conclui-se que a suplementação com probiótico foi benéfica para a filtração glomerular nos ratos intoxicados com baixa dose de dicromato de potássio, mas não evitou a degeneração hidrópica tubular nos ratos Wistar intoxicados pelo dicromato de potássio.

Palavras-chave: Degeneração Hidrópica. Exposição Subcrônica. Bactérias Lácteas. Insuficiência Renal. Nefrite Intersticial.

ABSTRACT

NEFROPROTECT EFFECT FROM PROBIOTIC ACTION ON INTOXICATED RATS BY POTASSIUM DICHROMATE

The objective was to evaluate the effect of probiotic on renal function in intoxicated Wistar rats by potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$). We used 80 male Wistar rats, that were 21 to 25 days old, randomly divided into two treatments ($n = 40$ rats/treatment). In the DK treatment the animals consumed 0, 12, 24 and 36 mg of $K_2Cr_2O_7$ added to the diet and in the DK+P treatment the rats consumed 0, 12, 24 and 36 mg of $K_2Cr_2O_7$ in the diet with 0.2% probiotic. Those animals consumed their respective diets for 90 days, then, they were euthanized by exsanguination and blood samples were taken to evaluate serum creatinine and urea levels and histopathological analysis of the kidneys were realized. Serum creatinine levels in the DK+P treatment was significantly ($p < 0.05$) lower in relation to the DK treatment in all dichromate doses analyzed. Serum urea levels did not differ significantly ($p > 0.05$) between the DK and DK+P treatments. There was no significant difference ($p > 0.05$) in serum creatinine and urea concentrations in the rats that consumed 0 and 12 mg of dichromate and probiotic, but in the other animals serum creatinine and urea increased significantly ($p < 0.05$) along with increasing doses of the dichromate in both experimental treatments. The rats in DK and DK+P treatments showed hydropic degeneration in renal tubules at all doses of $K_2Cr_2O_7$. The DK treatment rats showed interstitial nephritis. It was concluded that supplementation with the probiotic was beneficial for glomerular filtration in rats intoxicated with low doses of potassium dichromate, but did not prevent the tubular hydropic degeneration in Wistar rats intoxicated by potassium dichromate.

Key-words: Hydropic Degeneration. Subchronic Exposure. Lactea Bacteria. Renal Failure. Interstitial Nephritis.

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO:.....	10
ANEXOS.....	29
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	30
ANEXO B - INSTRUÇÕES AOS AUTORES DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.....	32

1 ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

EFEITO NEFROPROTETOR DA AÇÃO DE PROBIÓTICOS EM RATOS INTOXICADOS POR DICROMATO DE POTÁSSIO¹

Matheus C.G. Parra^{2*}, Paulo E. Pardo², Hermann Bremer-Neto², Gisele A. Nai², Rogério Giuffrida², Luis S.L.S. Reis²

ABSTRACT - Matheus C.G. Parra, Paulo E. Pardo, Hermann Bremer-Neto, Gisele A. Nai, Rogério Giuffrida, Luis S.L.S. Reis. [**Nefroprotect effect from probiotic action on intoxicated rats by potassium dichromate.**]. Efeito da associação de microrganismos probióticos na função renal de ratos Wistar intoxicados por dicromato de potássio. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Campus II. Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro CEP 19067-175 - Presidente Prudente - SP. * Autor para correspondência: mateus_parra@hotmail.com

The objective was to evaluate the effect of probiotic on renal function in intoxicated Wistar rats by potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$). We used 80 male Wistar rats, that were 21 to 25 days old, randomly divided into two treatments (n = 40 rats/treatment). In the DK treatment the animals consumed 0, 12, 24 and 36 mg of $K_2Cr_2O_7$ added to the diet and in the DK+P treatment the rats consumed 0, 12, 24 and 36 mg of $K_2Cr_2O_7$ in the diet with 0.2% probiotic. Those animals consumed their respective diets for 90 days, then, they were euthanized by exsanguination and blood samples were taken to evaluate serum creatinine and urea levels and histopathological analysis of the kidneys were realized. Serum creatinine levels in the DK+P treatment was significantly ($p<0.05$) lower

¹ Recebido em

Aceito em

² Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Campus II. Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro CEP 19067-175 - Presidente Prudente - SP. * Autor para correspondência: mateus_parra@hotmail.com

in relation to the DK treatment in all dichromate doses analyzed. Serum urea levels did not differ significantly ($p>0.05$) between the DK and DK+P treatments. There was no significant difference ($p>0.05$) in serum creatinine and urea concentrations in the rats that consumed 0 and 12 mg of dichromate and probiotic, but in the other animals serum creatinine and urea increased significantly ($p<0.05$) along with increasing doses of the dichromate in both experimental treatments. The rats in DK and DK+P treatments showed hydropic degeneration in renal tubules at all doses of $K_2Cr_2O_7$. The DK treatment rats showed interstitial nephritis. It was concluded that supplementation with the probiotic was beneficial for glomerular filtration in rats intoxicated with low doses of potassium dichromate, but did not prevent the tubular hydropic degeneration in Wistar rats intoxicated by potassium dichromate.

INDEX TERMS: hydropic degeneration, subchronic exposure, lactea bacteria, renal failure, interstitial nephritis.

RESUMO - Objetivou-se avaliar o efeito de probiótico na função renal de ratos Wistar intoxicados por dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Utilizou-se 80 ratos Wistar, machos com 21 a 25 dias, divididos aleatoriamente em dois tratamentos ($n=40$ ratos/tratamento). No tratamento DK os animais consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de $K_2Cr_2O_7$ adicionado na dieta e o tratamento DK+P os ratos consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de $K_2Cr_2O_7$ na dieta com 0,2% de probiótico. Esses animais consumiram suas respectivas dietas durante 90 dias, foram eutanasiados por exsanguinação e colhidas amostras de sangue para realização de dosagem sérica de creatinina e uréia e realizou-se nos rins análise histopatológico. A creatinina sérica do tratamento DK+P foi significativamente ($p<0,05$) menor em relação ao tratamento DK em todas as doses de dicromato estudadas. A uréia sérica não diferiu significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos DK e DK+P. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na concentração sérica de creatinina e uréia dos ratos que consumiram 0 e 12 mg de dicromato e probiótico, mas dos demais animais a creatinina e uréia sérica aumentou significativamente ($p<0,05$) juntamente com as doses crescentes de dicromato estudadas em ambos os tratamentos experimentais. Os ratos dos tratamentos DK e DK+P apresentaram degeneração

hidrópica nos túbulos renais em todas as doses estudadas de $K_2Cr_2O_7$. Os ratos do tratamento DK apresentaram nefrite intersticial. Conclui-se que a suplementação com probiótico foi benéfica para a filtração glomerular nos ratos intoxicados com baixa dose de dicromato de potássio, mas não evitou a degeneração hidrópica tubular nos ratos Wistar intoxicados pelo dicromato de potássio.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: degeneração hidrópica, exposição subcrônica, bactérias lácteas, insuficiência renal, nefrite intersticial.

INTRODUÇÃO

O crômio (Cr) é um elemento mineral encontrado abundantemente na natureza na forma trivalente [Cr(III)]. Nesta forma, é considerado um dos elementos essenciais para os animais e seres humanos estando envolvido no metabolismo de glicose e lipídeos (Underwood & Suttle 2004, Aslam et al. 2013) e também tem sido utilizado na suplementação alimentar (Garcia-Nino et al. 2013). Entretanto, quando o crômio está na forma hexavalente [Cr(VI)] é considerado um dos maiores poluentes do meio ambiente (Barcelux 1999, Wu et al. 2012), principalmente nas formas de cromato (CrO_4) ou dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) (Barcelux 1999), sendo tóxico para os seres humanos e animais (Wu et al. 2012).

O rim é um órgão alvo do dicromato de potássio que leva a quadros de nefrotoxicidade (Soudani et al. 2011), principalmente nas células dos túbulos proximais (Evan & Dali 1974, Barrera et al. 2003) induzindo apoptose e morte das células renais (Fatima & Mahmood 2007), necrose dos túbulos renais (Barrera et al. 2003) e nefrite (Sellamuthu et al. 2011).

Mesmo sabendo-se da toxicidade do Cr(VI), este elemento mineral tem sido amplamente utilizado em processos de fabricação industrial: processos de galvanização, curtimento de couro, agente anti-corrosivo (Bartyzel & Cukrowska, 2011, Witt et al. 2013), tratamento de madeiras, produção de aço e placas, produção de pigmentos (Blade et al. 2007, Bartyzel & Cukrowska 2011) e na indústria têxtil (Witt et al. 2013).

Frequentemente manipulado pelos trabalhadores dessas fábricas na forma tóxica de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), quando em excesso, expõe esses trabalhadores ao risco de intoxicação química (Bremer Neto et al. 2005, Muniz & Oliveira Filho 2006).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* sp; *Bifidobacterium* sp e a levedura *Saccharomyces* sp tem sido frequentemente utilizada na alimentação dos seres humanos e dos animais (Willians 2010, Szajewska 2014) podendo serem classificados como probióticos o Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e a World Health Organization (2001) definiram os probióticos como sendo "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro" para o trato geniturinário (Grin et al. 2013), nos transtornos gastrointestinais (AlFaleh & Anabrees 2014) na prevenção de alguns transtornos alérgicos (Enomoto et al. 2014), propriedades anti-carcinogênicas (Saarela et al. 2000) e nos animais tem sido utilizado como promotor do ganho de peso (Penha et al. 2011), estimulando a resposta imune humoral (Arenas et al. 2009) e redutor do estresse (Penha et al. 2011).

Vitetta et al. (2013) e Alatraste et al. (2014) relataram que os pacientes com insuficiência renal crônica e que consumiram probiótico *bifidobacterium thermophilum* e *lactobacilus acidophilus* apresentaram diminuição na concentração de uréia na corrente circulatória, que contribuiu para a promoção da saúde por ter contribuído no controle da toxicidade urêmica.

Por meio dos vários efeitos benéficos que os probióticos promoveram na saúde dos pacientes com insuficiência renal crônica, os probióticos também podem atuar como nefroprotetores beneficiando a saúde dos pacientes com nefrotoxicidade causada pela intoxicação por dicromato de potássio. No entanto, ainda são escassos os trabalhos que avaliaram estes efeitos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do probiótico na função renal de ratos Wistar após o consumo de diferentes doses do dicromato de potássio.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, Brasil, conforme o protocolo de aprovação nº 784.

O período experimental foi de 97 dias, sendo que os 7 primeiros dias foi para adaptação dos animais à nova dieta e ao manejo, seguido de 90 dias de tratamento com exposição subcrônica ao dicromato de potássio associado ou não ao probiótico.

No experimento foram utilizados 80 ratos albinos da linhagem Wistar, machos jovens, com 21 a 25 dias pesando entre 30 a 45 gramas. Esses animais foram divididos aleatoriamente em dois tratamentos distintos, sendo que em cada grupo tinha quatro tratamentos a seguir: no tratamento DK os animais receberam dieta basal associado com quatro tratamentos (10 animais/tratamento) contendo 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio (Aldrich Chemical Company Inc.; Milwaukee, Wisconsin – USA) com níveis do $K_2Cr_2O_7$ com 99,9% de pureza/Kg de ração e no tratamento DK+P que os ratos receberam dieta basal, com 0,2% de probiótico associado com quatro tratamentos (10 animais/tratamento) contendo 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$ com 99,9% de pureza)/Kg de ração.

As dietas e água foram oferecidas *ad libitum* para os animais em gaiolas individuais, sob as mesmas condições de padrão de iluminação (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e com temperatura em torno de 23 °C conforme a recomendação de Merusse & Lapichik (1996).

A dieta utilizada era composta por (níveis de garantia/Kg de ração): 22,0% de proteína bruta; 2,5% de extrato etéreo; 6,0% de matéria fibrosa; 10% de matéria mineral; 1,2% de cálcio; 0,7% de fósforo; 3.000 mg de metionina; 7.000 UI de vitamina A; 50 mg de vitamina C; 2.000 UI de vitamina D₃; 15 UI de vitamina E; 1,0 mg de vitamina K₃; 2,0 mg de vitamina B₁; 6,0 mg de vitamina B₂; 3,0 mg de vitamina B₆; 9,0 mg de vitamina B₁₂; 1,0 mg de ácido fólico; 12,0 mg de ácido pantotênico; 0,5 mg de biotina; 500,0 mg de colina; 20,0 mg de niacina; 9,0 mg de cobre; 40,0 mg de ferro; 0,7 mg de iodo; 90,0 mg de manganês; 0,4 mg de selênio; 50,0 mg de zinco.

O probiótico utilizado era composto por (cada quilograma) 2.220.000.000 de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Lactobacillus acidophilus*, 2.220.000.000 UFC de *Streptococcus faecium*, 2.220.000.000 UFC *Bifidobacterium thermophilum* e 2.220.000.000 UFC *Bifidobacterium longum*.

As amostras de sangue dos ratos Wistar foram colhidas no final do período experimental. Neste dia os ratos foram anestesiados com tiopental na dose de 30 mg/Kg de peso vivo, por via intraperitoneal, e logo após as amostras de sangue de todos os ratos foram colhidas por punção intracardíaca (Paiva et al. 2005) em tubos à vácuo sem anticoagulante e centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos. Então se obteve as amostras de soro que foram armazenadas em freezer a -20 °C para posterior determinação das concentrações séricas de creatinina e uréia.

As concentrações séricas de creatinina dos ratos Wistar foram determinadas pelo método cinético sem desproteinização, utilizando-se de kits comerciais prontos para uso e as leituras foram realizadas no analisador Bioplus, modelo Bio 200F.

As concentrações séricas de uréia dos ratos Wistar foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico utilizando de kits comerciais prontos para uso e as leituras foram realizadas no analisador Bioplus, modelo Bio 200F.

Os rins (direito e esquerdo) foram colhidos após os ratos Wistar terem sido eutanasiados por exsanguinação conforme preconizado por Paiva et al. (2005). Após a eutanásia, realizou-se uma incisão na parede abdominal e colheu-se os rins dos ratos para análise histopatológica.

Logo após a colheita, os rins foram fixados em solução de formol a 10% durante 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, desidratação e diafanização as peças foram incluídas em parafina e seccionadas com espessura de 5 µm. Estas peças foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). A leitura das lâminas foi realizada por um avaliador (GAN) utilizando-se microscópio óptico (NIKON Labophot, Japão).

Os parâmetros avaliados nos rins foram: congestão (ausente, leve, moderada e intensa), intensidade do infiltrado inflamatório (ausente, leve, moderada e intensa), túbulos renais (sem lesão, degeneração hidrópica, espessamento de membrana e necrose tubular), glomérulo (sem lesão, esclerose), vasos (sem lesão, espessamento de

membrana e necrose), cilindros (ausente e presente) e neoplasia (ausente, benigna e maligna).

Para a comparação dos resultados das análises histopatológicas dos rins entre os grupos experimentais aplicou-se os testes não paramétrico Kruskal-Wallis seguido dos contrastes de Dunn adotando significância de 5%.

Para a comparação dos resultados das concentrações séricas de creatinina e uréia entre os grupos experimentais aplicaram-se os testes não paramétrico de Levene seguido de ANOVA com contrastes de Tukey ou Games-Howell adotando significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rato tem sido utilizado como modelo experimental para avaliação dos efeitos da nutrição na função renal (Giacomelli & Natalli 1999) e as dosagens séricas de ureia e creatinina foram utilizada em outros experimentos para avaliar a função renal em ratos (Sahu et al. 2014) e também em seres humanos (Alatriste et al. 2014). Sendo que a concentração elevada de creatinina e ureia na corrente circulatória são indicativas da existência da insuficiência renal em que a filtração glomerular está comprometida (Silveira 1988, Thrall et al. 2007).

O Quadro 1 e a Figura 1 mostra que nos rins dos animais do grupo controle dos ratos dos tratamentos DK e tratamento DK+P não apresentaram alterações histopatológicas ao longo do período experimental. Assim, as alterações e suas intensidades encontradas nos rins dos animais que consumiram dicromato de potássio associado ou não ao probiótico foram causadas pelas diferentes doses de dicromato de potássio ingeridas pelos ratos Wistar.

Durante o período experimental não houve nenhum caso de morte entre os ratos Wistar por intoxicação pelas diferentes doses de suplementações com o dicromato de potássio. Estes resultados corroboram com os apresentados pela *National Toxicology Program* (2007).

Os ratos tratados com o dicromato de potássio apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) no consumo de água e no peso corporal no final do período experimental e aumento significativo na concentração sérica de creatinina. Fato que é indicativo que as doses utilizadas de dicromato de potássio foram eficientes para causar a nefrotoxicidade devido a intoxicação pelo dicromato de potássio. Semelhantemente, Khan et al. (2010) também relataram que os ratos que foram tratados com 15 mg dicromato de potássio/Kg de peso corporal apresentaram insuficiência renal 48 horas após a ingestão.

A Figura 1 mostra que a concentração sérica de creatinina dos animais do tratamento DK+P é significativamente menor ($p < 0,05$) do que a dos animais do tratamento DK, na ordem de 25,4%; 32,9% e 32,4%, respectivamente para os tratamentos 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg. Esta redução na concentração sérica de creatinina que ocorreu nos animais que consumiram probiótico associado ao dicromato de potássio (tratamento DK+P), indica que a filtração glomerular desses animais teve maior eficiência para eliminar a creatinina do organismo em relação a filtração glomerular dos animais do tratamento DK por ter ocorrido comprometimento no glomérulo renal. Estes resultados apontam que a suplementação com probiótico foi benéfica para a filtração glomerular, provavelmente, por ter atuado como agente protetor ou então ter minimizado os efeitos nefrotóxicos do dicromato de potássio que ocorreram nos ratos do tratamento DK.

A concentração sérica de uréia e creatinina dos animais do grupo DK+P que consumiram 12 mg de dicromato de potássio não diferiu significativamente ($p > 0,05$) dos animais que consumiram somente o probiótico. Entretanto as concentrações sérica de uréia e creatinina dos ratos que consumiram as doses 24 e 36 mg de dicromato de potássio apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos animais que consumiram somente probiótico. Portanto o probiótico foi benéfico para a filtração glomerular somente nos animais que apresentaram uma leve intoxicação pelo dicromato de potássio.

Apesar do mecanismo de ação dos probióticos sobre a filtração glomerular ainda não estar totalmente esclarecido (Buret et al. 1999), o restabelecimento da filtração glomerular dos ratos que consumiram 12 mg de dicromato de potássio associado ao probiótico ser semelhante aos animais do grupo controle (Figura 2), foi provavelmente pela atuação dos microrganismos probióticos sobre o epitélio intestinal, na produção de

mucos e outros componentes do lúmen intestinal, formando uma barreira sobre a mucosa intestinal que regulou ou se opôs a permeação e/ou a absorção (Buret et al. 1999, Resta-Lenert & Barrett 2013) do dicromato de potássio e, assim, resultou na absorção de baixa concentração de dicromato de potássio que conseqüentemente gerou pequena nefrotoxicidade nesses animais. Entretanto, há necessidade de realizar novos experimentos para se comprovar os mecanismos de ação dos probióticos que estão envolvidos na proteção da nefrotoxicidade.

Segundo Silveira (1988) a uremia renal está associada às patologias intrínsecas dos rins, dentre elas, nos processos degenerativos. Assim, as diferenças, porém não significativas ($p > 0,05$) que ocorreu na concentração sérica de uréia dos ratos dos tratamentos DK e DK+P (Figura 2) foi devido a ocorrência da degeneração hidrópica nos túbulos renais que ocorreram nestes animais (Quadro 1).

As concentrações séricas de uréia dos ratos dos tratamentos DK+P foram 7,34%; 7,82% e 6,62% menores do que as concentrações séricas de uréia dos animais dos tratamentos DK, respectivamente. Mesmo assim, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nessas concentrações séricas de uréia entre os tratamentos DK e DK+P (Figura 2). Corroborando com esses resultados, Alatríste et al. (2014) relataram que também observaram redução de 10% na concentração sérica de uréia em seres humanos com insuficiência renal crônica que foram suplementados com probiótico (*Lactobacillus casei* Shirota).

No Quadro 1 observa-se que houve redução significativa ($p < 0,05$) na degeneração hidrópica nos túbulos renais dos ratos que consumiram o 12 mg de dicromato de potássio associado ao probiótico (tratamento DK+P). Enquanto que nos demais tratamentos DK+P e DK, 100% dos ratos apresentaram degeneração hidrópica nos túbulos renais. Este fato mostra que o probiótico também não foi capaz de atenuar os efeitos deletérios do dicromato de potássio no tecido renal quando ingerido em doses elevadas.

A degeneração ocorreu provavelmente, devido aos *reactive oxygen species* (ROS) que são produzidos no interior das células durante o metabolismo da transformação de Cr(VI) para Cr(III) nas vias de reações Fenton ou Haber-Weiss (Liu & Shi 2001).

Os ROS que causam danos oxidativos e peroxidação dos lipídeos nas células e no DNA provocando danos graves ao organismo (Huang et al. 1999), nos rins pode provocar degeneração hidrópica dos túbulos renais (Aragno et al. 2003).

Os ROS que são formados durante a transformação de Cr(VI) para Cr(III) (Liu e Shi, 2001) associado a congestão renal que leva a estase de sangue com baixa concentração de oxigênio e hipoxia nas células podem justificar as alterações histopatológicas que estão ilustradas na Figura 3B. De acordo com essa figura podem ser observadas as células aumentadas de volume, núcleo deslocado para a periferia devido ao acúmulo de água no interior das células, presença de grânulos eosinofílicos, aumento do volume celular, com alteração da proporção citoplasma/núcleo e vacuolização citoplasmática com aumento de volume, frequência e intensidade de acordo com o estágio da lesão indicando que houve degeneração hidrópica nos túbulos renais. Estes fatos segundo Soudani et al. (2011) confirmam a nefrotoxicidade do dicromato de potássio.

Os cilindros hialinos que foram observados nos rins dos ratos dos tratamentos DK e DK+P (Quadro 1) devem ser resultantes do extravasamento das proteína das células degeneradas dos túbulos renais que, segundo Thrall et al. (2007) os cilindros hialinos são característicos de lesão glomerular, nos processos degenerativos ou necróticos.

A necrose dos túbulos renais que foram observados por Barrera et al. (2003) pelo $K_2Cr_2O_7$, não foi observado neste experimento (Quadro 1), provavelmente devido ao tempo experimental ter sido insuficiente para o dicromato de potássio causar intoxicação grave e necrose tubular nos ratos.

No corte histopatológico do rato do tratamento DK notou-se que houve leve infiltrado inflamatório intersticial no parênquima renal (Figura 3C e D) dos ratos do tratamento DK (Quadro 1) indicando que o dicromato de potássio causou nefrite, fato que corrobora o trabalho de Sellamuthu et al. (2011).

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitiram concluir que a suplementação com os probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium*

thermophilum e *Bifidobacterium longum* foi benéfico para a filtração glomerular nos ratos intoxicados com baixa dose de dicromato de potássio, mas não evitou a degeneração hidrópica tubular nos ratos Wistar intoxicados pelo dicromato de potássio.

REFERÊNCIAS

- Alatraste P.V.M., Arronte R.U., Espinosa C.O.G. & Cuevas M.Á.E. 2014. Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure. *Nutr. Hosp.* 29:582-590.
- Alfaleh K. & Anabrees J. 2014. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evid. Based Child. Health* 9:584-671.
- Aslam M., Dayal R., Javed K., Parray S.A., Jetley S. & Samim M. 2013. Nephroprotective effects of methanolic extract of *peucedanum grande* against acute renal failure induced by potassium dichromate in rats. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 5:45-49.
- Aragno M, Cutrin J.C., Mastrocola R., Perrelli M.G., Restivo F., Poli G., Danni O. & Boccuzzi G. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/ reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int.* 64:836–843, 2003.
- Arenas S.E., Reis L.S.L.S., Frazatti-Gallina N.M., Fujimura S.H., Bremer-Neto H. & Pardo P.E. 2009. Probiotic increase the antirabies humoral immune response in bovine. *Arch. Zootec.* 224:733-736.
- Barcelux D.G. Chromium. 1999. *Clin. Toxicol.* 37:173-194.
- Barrera D., Maldonado P.D., Medina-Campos O.N., Hernández-Pando R., Ibarra-Rubio M.E. & Pedraza-Chaverri J. 2003. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radic. Biol. Med.* 34:1390-1398.
- Bartyzel A. & Cukrowska W.M. 2011. Solid phase extraction method for the separation and determination of chromium (III) in the presence of chromium (VI) using silica gel modified by N, N'-bis(methylsalicylidene)-2,2-dimethyl-1,3-propanediimine. *Anal. Chim. Acta* 707:204-209.

- Blade L.M., Yencken M.S., Wallace M.E., Catalano J.D., Khan A., Topmiller J.L., Shulman S.A., Martinez A., Crouch K.G. & Bennett J.S. 2007. Hexavalent chromium exposures and exposure-control technologies in American enterprise: results of a NIOSH field research study. *J. Occup. Environ. Hyg.* 4:596-618.
- Bremer Neto H., Graner C.A.F.G., Pezzato L.E. & Padovani C.R. 2005. Determinação de rotina de crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado a 1,5-difenilcarbazida. *Cienc. Rural*, 35:691-697.
- Buret A., Gall D.G., Olson M.E. & Hardin J.A. 1999. The role of the epidermal growth factor receptor in microbial infections of the gastrointestinal tract. *Microbes Infect.* 1:1139-1144.
- Enomoto T., Sowa M., Nishimori K., Shimazu S., Yoshida A., Yamada K., Furukawa F., Nakagawa T., Yanagisawa N., Iwabuchi N., Odamaki T., Abe F., Nakayama J. & Xiao J.Z. 2014. Effects of bifidobacterial supplementation to pregnant women and infants in the prevention of allergy development in infants and on fecal microbiota. *Allergol. Int.* 63:575-85.
- Evan A.P. & Dali W.G. 1974. The effects of sodium chromate on the proximal tubules of the rat kidney. Fine structural damage and lysozymuria. *Lab. Invest* 30:704-715.
- Fatima S. & Mahmood R. 2007. Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin. Chem. Acta* 386:94-99.
- Garcia-Nino W.R., Tapia E., Zazueta C., Zatarain-Barron Z.I., Hernandez-Pando R., Vega-Gracia C.C. & Pedraza-Chaverri J. 2013. Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decrease respiratory complex I activity and membrane permeability transition pore opening. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Volume 2013, Article ID 424692, 19 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/424692>.
- Giacomelli F.R.B. & Natali M.R.M. 1999. A utilização de ratos em modelo experimental de carências nutricionais. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar* 3:239-249.

- Grin P.M., Kowalewska P.M., Alhazzan W. & Fox-Robichaud A.E. 2013. Lactobacillus for preventing recurrent urinary tract infections in women: meta-analysis. *Can. J. Urol.* 20:6607-6614.
- Huang Y., Chen C., Sheu J., Chuang I., Pan J. & Lin T. 1999. Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. *J. Toxicol. Environ. Health A* 56:235-247.
- Khan M.R., Siddiqui S., Parveen K., Javed S., Diwakar S. & Siddiqui W.A. 2010. Nephroprotective action of tocotrienol-rich fraction (TRF) from palm oil against potassium dichromate($K_2Cr_2O_7$)-induced acute renal injury in rats. *Chem. Biol. Interact.* 186:228-238.
- Liu K.L. & Shi X. 2001. In vivo reduction of chromium(VI) and its related free radical generation. *Mol. Cell. Biochem.* 222:41-47.
- Merusse J.L.B. & Lapichick V.B.V. 1996. Instalações e equipamentos, p.15-25. In: Comissão De Ensino Do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Ed). Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. EPM, São Paulo.
- National Toxicology Program technical report on the toxicity studies of sodium dichromate dehydrate (CAS nº 7789-12-0) administered in drinking water to male and female F344/N rats and B6C3F1 mice and male BALB/c and m3-C5BL/6 mice. Washington DC: National Toxicology Program. Report Series Number 72. 2007. Available online at <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST_rpts/TOX72.pdf>. Acesso em: 28 de julho de 2013.
- Muniz D.H.F. & Oliveira-Filho E.C. 2006. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Universitas: Ciência e Saúde.* 4:83-100.
- Paiva F.P., Maffili V.V. & Santos A.C.S. 2005. Curso de manipulação de animais de laboratório. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador – BA. <Disponível em: http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio_apostila.pdf>. Acesso em: 22 Julho de 2013.
- Penha L.A.C., Pardo P.E., Kronka S.N., Reis L.S.L.S., Oba E. & Bremer-Neto H. 2011. Effects of probiotic supplementation on liveweight gain and serum cortisol concentration in cattle. *Vet. Rec.* 168:538.

- Resta-Lenert S. & Barrett K.E. 2013. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52:988-997.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö, J. & Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 28:197-215.
- Sahu B.D., Koneru M., Bijargi S.R., Kota A. & Sistla R. 2014. Chromium-induced nephrotoxicity and ameliorative effect of carvedilol in rats: Involvement of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Chem. Biol. Interact.* 22:69-79.
- Sellamuthu R., Umbright C., Chapman R., Leonard S., Li S., Kashon M. & Joseph P. 2011. Transcriptomics evaluation of hexavalent chromium toxicity in human dermal fibroblasts. *J. Carcinogene Mutagene* 2:116.
- Silveira J.M. Bioquímica clínica, p.86-111. In: Ibid. (Ed.) Patologia clínica veterinária: teoria e interpretação. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.
- Soudani N., Sefi M., Bouaziz H., Chtourou T., Boudawara T. & Zeghal N. 2011. Nephrotoxicity induced by chromium (VI) in adult rats and their progeny. *Hum Exp Toxicol.* 30:1233-1245.
- Szajewska H. 2014. What is new on the term probiotics and the role of probiotics for the management of acute gastroenteritis. *Benef. Microbes.* 22:1-3.
- Thrall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., Nicola D., Fettman M.J., Lassen E.D., Rebar A. & Weiser G. 2007. Avaliação laboratorial da função renal, p.285-310. In: Ibid. (Eds.) Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Editora Roca, São Paulo.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F. 2004. Chromium., p.517-522. In: Ibid. (Eds.) The mineral nutrition of livestock. CABI Publishing, Cambridge.
- Vitetta L., Linnane A.W. & Gobe G.C. 2013. From the gastrointestinal tract (GIT) to the kidneys: live bacterial cultures (probiotics) mediating reductions of uremic toxin levels via free radical signaling. *Toxins* 5:2042-2057.
- Willians N.T. 2010. Probiotics. *Am. J. Health-System Pharm.* 67:449-458.

Witt K.L., Stout M.D., Hebert R.A., Travlos G.S., Kissiing G.E., Collins B.J. & Hooth, M.J. 2013. Mechanistic insights from the NTP studies of chromium. *Toxicol. Pathol.* 41:326-342.

World Health Organization. World Health Organization Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation of Evaluations of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria. Geneva: World Health Organization, 2001.

Wu F., Sun H., Kluz T., Clancy H.A., Kiok K. & Costa M. 2012. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258:166-175.

¹ Tratamento DK representam os grupos de ratos que consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg.

² Tratamento DK+P representam os lotes de ratos que consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg adicionado com 0,2% de probiótico.

CAPÍTULO DE FIGURAS

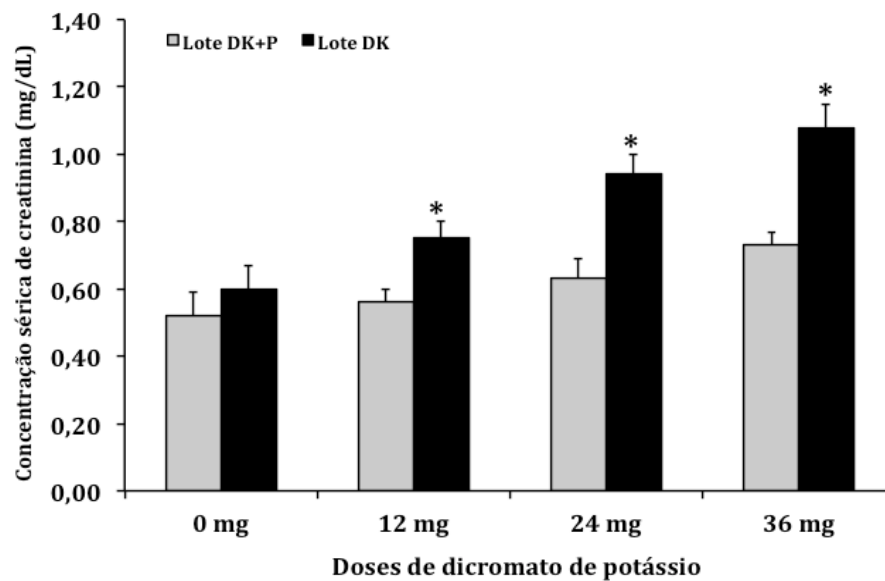


Fig. 1- Efeito do probiótico na concentração sérica de creatinina de ratos Wistar suplementados com dicromato de potássio. Tratamento DK representa o grupo de ratos (N=10) consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg. Tratamento DK+P representa o grupo de ratos (N=10) que consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg de ração com 0,2% de probiótico. * - sobre as barras indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as médias das concentrações séricas de creatinina os tratamentos experimentais DK e DK+P dentro de cada dose de dicromato de potássio.

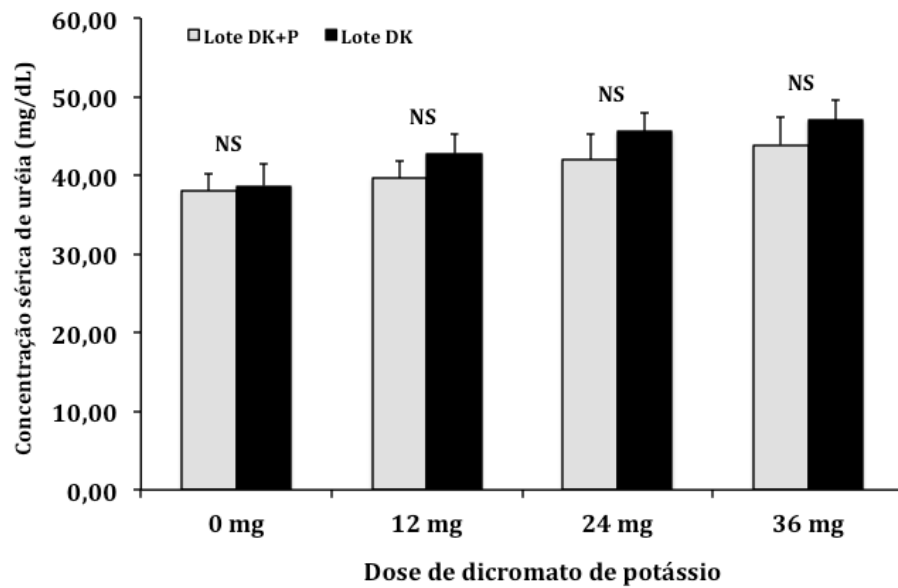


Fig. 2- Efeito do probiótico na concentração sérica de uréia de ratos Wistar suplementados com dicromato de potássio. Tratamento DK representa o grupo de ratos consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg. Tratamento DK+P representa o grupo de ratos que consumiram 0, 12, 24 e 36 mg de dicromato de potássio/Kg de ração com 0,2% de probiótico (Proenzime®). ^{NS} - sobre as barras indica que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as médias das concentrações plasmáticas de uréia dos tratamentos experimentais DK e DK+P dentro de cada dose de dicromato de potássio

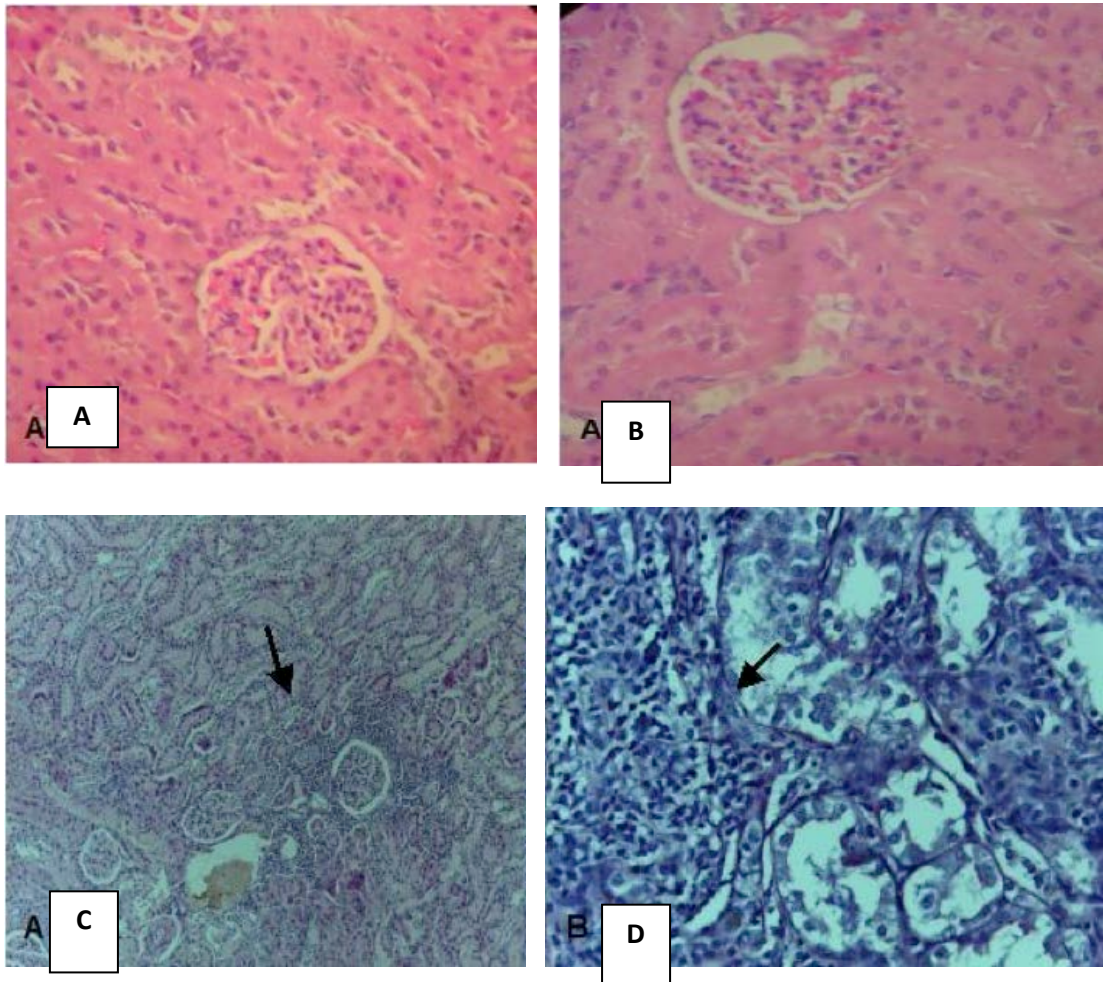


Fig. 3- A) Corte histopatológico de rim normal de rato Wistar do grupo controle (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400x). B) Corte histopatológico de rim de rato Wistar que consumiram dicromato de potássio associado ração com probiótico (tratamento DK+P) mostrando degeneração hidrópica do túbulo renal (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400x). C) Corte histopatológico de rim de rato Wistar que consumiram dicromato de potássio associado ração com 0,2% de probiótico (tratamento DK) mostrando discreta inflamação intersticial (coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400x). D) Corte histopatológico de rim de rato Wistar que consumiram dicromato de potássio associado ração com 0,2% de probiótico (tratamento DK) mostrando discreta inflamação intersticial (coloração de PAS, aumento de 400x).

ANEXOS

ANEXO A

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



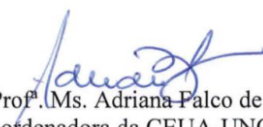
Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado **“TOXICIDADE HEPATICA, RENAL E INTESTINAL DO DICROMATO DE POTÁSSIO EM RATOS ALBINOS DA LINHAGEM WISTAR”**, cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número nº 784 tendo como pesquisador responsável o (a) Prof^o (a) LUÍS SOUZA LIMA DE SOUZA REIS, os docentes participantes ANA CRISTINA MESSAS, GISELE ALBORGHETTI NAI, HERMANN BREMER NETO e os discentes MATHEUS CAMPOS GARCIA PARRA, REINALDO CAMACHO BEZERRA, SORAIA YOUNAN COLUNA, YSLLA FERNANDA FITZ BALO MERIGUETI, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente/SP, 17 de Novembro de 2014.


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


Prof.^a Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA-UNOESTE

ANEXO B

INSTRUÇÕES AOS AUTORES DA

REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas

serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.