

**EFEITO DA AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES DOSES DE PROBIÓTICO NA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM BEZERROS NELORE**

SUELEN NAVAS ÚBIDA

**EFEITO DA AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES DOSES DE PROBIÓTICO NA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM BEZERROS NELORE**

SUELEN NAVAS ÚBIDA

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. Paulo Eduardo Pardo

636.208 51 Úbida, Suelen Navas.

U15e

Efeito da avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com diferentes doses de probiótico na resposta imune humoral em bezerros nelore / Suelen Navas Úbida. – Presidente Prudente, 2014.

27 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Paulo Eduardo Pardo.

1. Raiva. 2. Probiótico. 3. Bovino. 4. Resposta Imune. I. Título.

SUELEN NAVAS ÚBIDA

**EFEITO DA AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES DOSES DE PROBIÓTICO NA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM BEZERROS NELORE**

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, 13 de maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Odnei Francisco Gargantini
Faculdade de Tecnologia CEETPS - FATEC
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Luis Carlos Vianna
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Vera Lúcia Bernardelli Úbida e Antônio Úbida Grossi, por ser minha estrutura, sempre acreditar em mim, incentivando e apoiando de pertinho em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao meu querido e único irmão Anthony Úbida, pelo carinho e positividade que sempre transmitiu.

Aos professores, coordenadores do programa de Pós-graduação que foram essenciais para minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força nas horas que precisei, sabedoria e todas as bênçãos concedidas em minha vida.

Aos meus queridos pais Vera Lúcia Bernardelli Úbida e Antônio Úbida Grossi, que em todos os momentos de realização deste trabalho estiveram presentes, me apoiando em todas as etapas da minha vida, hoje com muita alegria divido essa conquista, amores da minha vida. Ao meu querido irmão Anthony Úbida, pelo apoio, conversas, alegria, opiniões que sempre me ofereceu nos momentos de aflição.

Com muito carinho ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo, pela orientação, paciência, disponibilidade, incentivo, por me guiar em todas as etapas do mestrado, compartilhando seus conhecimentos ao longo desses anos, meu sincero muito obrigado.

As secretárias da Pós-Graduação em Ciência Animal, Joyce Carvalho de Andrade e Keid Kruger, pessoas que com muito carinho me auxiliaram em tudo que precisei.

Aos professores e coordenadores do Mestrado em Ciência Animal, destacando professor Dr. Rogério Giuffrida, por compartilhar seus conhecimentos de estatística, com muita paciência me orientou.

Ao médico veterinário Eduardo Levi Celestino por ceder sua propriedade, seus funcionários, sempre cooperando com muito carinho e paciência pela execução da parte prática do estudo realizado.

A todas as pessoas que conheci ao longo do mestrado, direta ou indiretamente influenciaram na execução desse trabalho, amigos, professores, veterinários.

A todos o meu muito obrigado...

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”. (Albert Einstein)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	11
ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXO	23

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**

2 **Efeito da avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com diferentes doses**
3 **do probiótico na resposta imune humoral em bezerros nelore.**

4 Effect evaluation of antirrabies vaccination and supplementation with different doses of
5 probiotic in the humoral immune response in nelore calves.

6 **Suelen Navas Ubida^I; Neuza Maria Frazatti Gallina^{II}; Rogério Giuffrida^{III}; Paulo**
7 **Eduardo Pardo^{III}.**

8 **RESUMO**

9 Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com diferentes doses do probiótico sobre a
10 resposta imune humoral em bovinos. Quarenta e dois bovinos machos, Puro de Origem (P.O)
11 da raça Nelore, com idade de 12 meses, todos vacinados com dose única de vacina
12 antirrábica, divididos aleatoriamente em 3 grupos (14 bovinos/grupo): O grupo controle
13 (GC), recebeu 70 gramas de suplemento mineral/animal por 60 dias; o grupo GP3 recebeu 3
14 gramas de probiótico adicionados em 70 gramas de suplemento mineral/animal por 60 dias e
15 o grupo GP8 recebeu 8 gramas de probiótico adicionado em 70 gramas de suplemento
16 mineral/animal por 60 dias. Análises estatísticas foram comparadas entre os Grupos controle,
17 3 e 8 gramas. As amostras de sangue dos bovinos foram colhidas nos dias 0,30 e 60. Os
18 resultados demonstraram diferenças estatísticas significativas entre as médias de
19 concentrações séricas entre os grupos. Conclui-se que a administração de probiótico
20 aumentou a resposta imune em bovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica.

21 **Palavras Chaves:** Raiva. Probiótico. Bovino. Resposta Imune.

22 **ABSTRACT**

^I Mestre em Ciência Animal pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Rodovia Raposo Tavares, km 572. Bairro Limoeiro. CEP 19067-175. Presidente Prudente – SP. E-mail: suelen_ubida@hotmail.com.br.

^{II} Doutora em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP), SP, Brasil.

^{III} Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), SP, Brasil.

1 Aimed to evaluate the effects of supplementation of probiotics on the humoral immune
2 response in cattle. Forty-two male animals, whole, Pure Origin (PO) Nellore, aged 12
3 months, all vaccinated with a single dose of rabies vaccines were randomly divided into 3
4 groups (14 bovine animals/group): Control group (GC) received 70 grams of mineral/animal
5 during 60 days supplement; the probiotic group GP3 received 3 grams of probiotic added 70
6 grams of mineral/animal during 60 days supplement; the probiotic group GP8 received 8
7 grams of probiotic added 70 grams of mineral/animal during 60 days supplement. Statistical
8 analyzes were compared between groups control, 3, and 8 grams. Blood samples of animals
9 were collected days 0, 30 and 60 days. Individual neutralizing antibody titers were
10 determined by a neutralization technique based on the Rapid Fluorescent Focus Inhibition
11 Test (RFFIT) and Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). There were statistically significant
12 differences between the mean serum concentrations between groups control, GP3 and GP8.
13 Concluding that the administration of probiotics interfered in the humoral immune response.
14 **Keyword:** Rabies, Probiotic, Cattle, Immune Response.

15 INTRODUÇÃO

16 A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos,
17 causada por um vírus neurotrópico, RNA, de ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*
18 e do gênero *Lyssavirus* (REIS et al., 2013), onde no Brasil, o principal agente transmissor do
19 vírus rábico é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (ALBAS et al., 2006; SCHEFFER
20 et al., 2007).

21 Na América Latina, esta enfermidade vem causando prejuízo da ordem de 30 milhões de
22 dólares/ano e no Brasil, os prejuízos indiretos estão calculados em 22,5 milhões de
23 dólares/ano (INSTITUTO PASTEUR, 2012).

24 A vacinação de bovinos contínua e periódica é a melhor forma de proteger e controlar a
25 doença, porque a vacinação é de baixo custo eficaz e reduz perdas econômicas (REIS et al.,

1 2013).

2 Para que haja um estado imunitário suficiente para proteger indivíduos expostos ao risco de
3 infecção, a Organização Mundial de Saúde recomenda como parâmetro de imunidade
4 antirrábica títulos protetores de anticorpos iguais ou maiores que 0,5 UI/ml (Unidade
5 Internacional UI/ml (CHABEL et al., 2009; OMS, 2011).

6 No Brasil, ocorre a ineficiência da imunidade na primovacinação de algumas vacinas,
7 liberadas e comercializadas, mesmo com seus valores antigênicos dentro dos parâmetros de
8 normalidade segundo seus fabricantes (MARIA et al., 2009). Sendo assim, é necessário
9 buscar alternativas para aumentar a eficácia da vacinação contra o vírus da raiva (FERREIRA
10 et al., 2009).

11 Na Europa e Ásia, antibióticos e quimioterápicos usados como promotores de crescimento
12 deixaram de ser utilizados na produção de bovinos e corte e leite, em virtude da possibilidade
13 de acúmulo de resíduos nos produtos de origem animal (carne, leite e derivados), bem como
14 no meio ambiente (PARDO & REIS, 2008).

15 Uma das estratégias para aumentar a resposta imunológica dos animais à imunidade induzida
16 ou às infecções provocadas por vírus ou bactérias é o acréscimo de probióticos ao suplemento
17 mineral utilizado (ARENAS et al., 2009; FERREIRA et al., 2009, PENHA et al., 2011).

18 Os probióticos são definidos como adjuntos dietéticos microbianos que afetam benéficamente
19 a fisiologia do hospedeiro pela regulação da imunidade local e sistêmica e pela melhora do
20 balanço nutricional e microbiano no trato intestinal (COOK et al., 2012).

21 Para os animais de produção, os probióticos não causam efeitos tóxicos e não permanecem
22 como resíduo nos subprodutos destinados ao consumo humano, em quantidades significativas
23 (PARDO & REIS, 2008).

24 Dentre os efeitos benéficos dos probióticos, estão sua utilização como promotores de
25 crescimento aumentando o ganho de peso, a redução do pH intraluminal do tubo digestivo,

1 minimizando o estresse, impedindo a colonização da mucosa intestinal por bactérias
2 patogênicas e aumentando a resposta imune humoral (PENHA et al., 2011; ALMEIDA et al.,
3 2013). Observou-se também um aumento significativo nos títulos de anticorpos antirrábico
4 em bovinos primovacinados contra raiva (ARENAS et al., 2009; FERREIRA et al., 2009).
5 Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação do probiótico em diferentes doses, sobre a
6 resposta imune humoral em bovinos vacinados com uma única dose da vacina antirrábica.

7 **MATERIAL E MÉTODOS**

8 O experimento foi desenvolvido nos meses de setembro a novembro de 2013, no município
9 de Pirapozinho, localizado a oeste o Estado de São Paulo, Brasil, cuja latitude 22°16'31" sul e
10 longitude 51°30'00" oeste, estando a uma altitude de 487 metros, com precipitação anual
11 média de aproximadamente de 1.300 mm, umidade relativa do ar de aproximadamente 65,5%
12 (chuvas em todas as estações do ano), temperatura média de 23,5°C. Utilizaram-se 42
13 bovinos, machos inteiros, Puro de Origem (P.O), da raça Nelore, com 12 meses de idade,
14 todos vacinados com dose única de vacina antirrábica, divididos aleatoriamente em 3 grupos
15 (14 bovinos/grupo), onde o grupo controle (GC) recebeu 70 gramas de suplemento
16 mineral/animal por 60 dias. O grupo GP3, recebeu 3 gramas de probiótico adicionado em 70
17 gramas de suplemento mineral/animal por 60 dias e o grupo GP8, recebeu 8 gramas de
18 probiótico adicionado em 70 gramas de suplemento mineral/animal por 60 dias.

19 As amostras de sangue dos bovinos foram colhidas nos dias 0, 30 e 60. Os bovinos foram
20 levados no período da manhã para o curral, contidos em tronco de contenção tipo Brete e 10
21 ml de sangue de cada animal foi colhido por meio da punção da veia jugular em tubos à
22 vácuo sem anticoagulante. Os tubos foram transportados em caixa térmica com gelo e após
23 cerca de 2 horas foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos. As amostras de soro foram
24 acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20 °C para
25 posterior determinação do título de anticorpos neutralizantes antirrábicos.

1 Os títulos de anticorpos neutralizantes antirrábicos foram determinados no Laboratório de
2 Raiva do Instituto Butantã – São Paulo, por meio da técnica de soroneutralização em células
3 BHK21, teste esse, baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test – RFFIT (SMITH et
4 al., 1998) e no Fluorescent Inhibition Microtest – FIMT (ZALAN et al., 1979).

5 Nos primeiros 30 dias, os animais foram mantidos para adaptação à pastagens, ajustes e
6 estabelecimento do consumo do probiótico adicionado ao sal mineral. A quantidade do
7 probiótico a ser adicionado no sal mineral foi calculada de maneira que cada animal do grupo
8 GP3 ingerisse cerca de 3 gramas de probiótico animal/dia e cada animal do grupo GP8
9 ingerisse cerca de 8 gramas de probiótico animal/dia. A determinação do consumo do
10 probiótico feita no primeiro mês do experimento foi da seguinte maneira: o sal mineral
11 suplementado com o probiótico foi pesado e colocado no cocho e após 24 horas, retirado e
12 pesado novamente. A diferença entre a primeira pesagem e a segunda, dividida pelo número
13 de animais que utilizaram o cocho foi considerada como consumo médio de sal/bovino
14 durante 24 horas.

15 Os bovinos foram alimentados com capim Tanzânia em sistema de pastejo extensivo e os
16 piquetes utilizados pelos grupos de animais serão semelhantes na topografia e composição
17 botânica, sendo formados por Podzolizados de Lins - variedade Marília (arenoso) menor
18 áreas, Latossol Vermelho Escuro fase arenosa (maior área), Campos e Cerrados e Latossol
19 Roxo - terra roxa (pequena área), margeando o Rio Paranapanema. Todos os piquetes
20 possuíam pasto abundante e sombra. O sistema de pastejo adotado foi o extensivo.

21 O probiótico comercial utilizado foi Proenzime® - produzido por Empresa Brasileira de
22 Aumento de Produtividade Pecuária - EMBRAUPEC, Paranavaí - PR, Brasil, devidamente
23 registrado e aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA),
24 composto por: amilase, celulase, protease, lipase, pectinase, *Lactobacillus acidophilus*,
25 *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium longum* e zinco.

1 Utilizou-se o suplemento mineral Fosbovi Seca® da linha bovinos, produzida por Tortuga
2 Companhia Zootécnica Agrária, São Paulo, SP.

3 Utilizou-se a vacina antirrábica (Vencofarma) contendo vírus fixo Pasteur inativado,
4 adsorvido em gel de hidróxido de alumínio produzido em cultivo celular. Esta vacina é
5 desenvolvida no Laboratório Vencofarma do Brasil Ltda. A aplicação foi feita no dia zero do
6 experimento em todos os bovinos numa dose de 2 mL de vacina por via subcutânea.

7 **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

8 Previamente às comparações estatísticas, o pressuposto de normalidade dos dados foi
9 avaliado individualmente para cada grupo de variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk para
10 verificar se os dados observados apresentaram distribuição gaussiana, pelo qual constatou-se
11 que as variáveis estudadas apresentaram distribuição não paramétricas ($P \leq 0,05$). A
12 comparação dos títulos sorológicos entre os grupos controle e tratado, aos 30 e aos 60 dias,
13 foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, com contrastes pelo método de Dunn. Os títulos
14 sorológicos dentro de cada grupo, aos 30 e aos 60 dias pós-vacinação, foram comparados
15 pelo teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (PAGANO & GAUVREAU, 2004).

16 Foram considerados títulos protetores contra raiva, animais que apresentaram $\geq 0,5$ unidade
17 soroneutralizante. Desta forma, os percentuais de animais protegidos contra raiva, dentro de
18 cada momento, foram comparados pelo teste de qui-quadrado com contrastes pelo método de
19 partição. Para determinar se o percentual de animais protegidos diferiu entre momentos
20 dentro de cada grupo recorreu-se ao teste exato de Fisher. Todas as análises foram realizadas
21 com auxílio do pacote computacional Bioestat v.1.0 (AYRES et al., 2007) adotando-se como
22 nível de significância o valor de 5%.

23 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

24 No dia zero, os soros dos animais não apresentaram anticorpos neutralizantes para a raiva,
25 demonstrando que os bovinos não tiveram contato com o vírus rábico selvagem ou vacinal.

1 Assim, as variações encontradas nos títulos de anticorpos antirrábicos nos soros desses
2 animais durante o experimento foram induzidas pela administração da vacina e do probiótico.
3 Na Tabela 1 encontram-se os valores correspondentes as médias aritméticas, mediana e
4 intervalo interquartil (IQ) de títulos sorológicos em unidades soroneutralizantes. Foram
5 observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos avaliados 30 e 60 dias pós-
6 vacinação. Os resultados estão sumarizados na Tabela 1, demonstrando que o GC não estava
7 protegido durante todo o experimento, pois não apresentaram títulos considerados protetores
8 ($P \geq 0,50$ UI/mL).

9 Os grupos GP3 e GP8, respectivamente 30 e 60 dias após a imunização antirrábica dos
10 bovinos, apresentaram médias de títulos de anticorpos antirrábicos significativamente
11 maiores que o grupo GC e essas médias estavam acima do título considerado protetor
12 ($P \geq 0,50$ UI/mL).

13 O grupo GP3 aos 30 dias apresentou títulos de anticorpos protetores mínimos ($P \geq 0,50$
14 UI/mL) e aos 60 dias o grupo GP3 não apresentou títulos de anticorpos protetores. O GP8 aos
15 30 e 60 dias, apresentou uma maior concentração de títulos de anticorpos comparados ao GC
16 e GP3 demonstrando ser mais eficiente comparado ao GC e GP3.

17 Os resultados obtidos concordam o trabalho de Arenas et al. (2009), que observaram aumento
18 significativo ($P \leq 0,05$ UI/ml) nos títulos de anticorpos antirrábicos nos bovinos
19 suplementados com 0,2,3,4 e 8 gramas do probiótico Proenzime® para bovinos
20 primovacinação contra a raiva.

21 Essa elevação dos títulos de anticorpos pelo grupo GP8 deve-se ao efeito do estímulo ao
22 sistema imunológico (REYES & RODRIGUES, 2010; NOGUEIRA & GONÇALVES, 2011).

23 A ação imunoestimulante dos probióticos é atribuída às bactérias ácido lácticas, dentre as quais
24 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* (ALMEIDA et
25 al, 2012).

1 Nogueira e Gonçalves (2011) mostraram que os probióticos estimulam a atividade fagocítica
2 dos leucócitos, aumentam a proliferação de linfócitos T e a atividade dos macrófagos, elevam
3 a atividade das células Natural Killer (NK); ativam as células T Helper CD4+ subpopulação
4 Th1. Com o uso de probióticos bactérias da microflora intestinal e células Th3, atuam no
5 balanço Th1/Th2, promovendo o controle de processos infecciosos e imunológicos (COSTA
6 & VARAVALLO, 2011).

7 Os probióticos aumentam a produção de anticorpos e a secreção de mediadores químicos
8 como, citocinas, interferon gama ($IFN-\gamma$), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)
9 1 e 2, que estimulam o sistema imunológico (PARDO & REIS, 2008).

10 A utilização de probióticos melhoram metabolismo de carboidratos, síntese de vitaminas,
11 produção de enzimas microbianas para compensar atividades deficientes de enzimas do
12 hospedeiro, eliminação ou controle de microrganismos patogênicos causadores de doenças
13 subclínicas ou clínicas e estímulo da imunidade específica ou não específica no intestino
14 (MATOS, 2008; PENHA et al., 2011).

15 A figura 1 compara os títulos soroneutralizantes mensurados aos 30 e 60 dias pós- vacinação,
16 direcionados contra o vírus rábico vacinal cepa vírus Pasteur para bovinos do grupo GC, GP3
17 e GP8.

18 Na Tabela 2 não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os títulos
19 sorológicos nos três grupos experimentais aos 30 e 60 dias pós-vacinação antirrábica, dentro
20 de cada grupo, quando avaliados pelo teste exato de Fisher ($P \geq 0,50$ UI/mL).

21 No grupo GC, os animais do grupo em estudo não obtiveram proteção contra raiva (100%)
22 aos 30 e 60 dias do experimento, possivelmente porque o GC não possuía nenhum
23 suplemento nutricional ligado ao estímulo do sistema imunológico e os bovinos não
24 receberam aplicação da dose de reforço após 30 dias, concordando com estudos realizados por

1 Rosa et al. (2013), que avaliaram a resposta imune humoral em bovinos vacinados com a
2 antirrábica e suplementados com probiótico.

3 No grupo GP3 aos 30 dias, 50% dos animais encontram-se protegidos contra o vírus rábico e
4 aos 60 dias 57,2% dos animais não estavam protegidos contra o vírus rábico. O grupo GP8
5 (30 e 60 dias), mostrou-se mais eficiente, apresentando 100% dos animais protegidos. Houve
6 diferenças significativas na influência no uso de 8 gramas de probiótico para o aumento na
7 resposta imune humoral dos bovinos primovacinaados.

8 Entretanto, os resultados obtidos não concordam com Ferreira et al. (2009), Almeida et al.
9 (2012) e de Rosa et al. (2013) onde avaliaram a resposta imune humoral utilizando vacina
10 antirrábica e suplementação com probiótico, concluindo em seus experimentos que vacina
11 antirrábica teve eficiência em produzir e manter soroconversão nos bovinos e a administração
12 do probiótico não interferiu na resposta imune humoral.

13 **CONCLUSÃO**

14 De acordo com os resultados obtidos, conclui-se, que a suplementação com 8 gramas de
15 probiótico adicionado ao suplemento mineral aumentou a resposta imune humoral em
16 bovinos vacinados com uma dose de vacina antirrábica.

17 **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
18 (CEUA) – aprovado em 04/09/2013 – protocolo 1623.

19 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

20 ALBAS, A. et al. Interval between first dose and booster affected antibody production in
21 cattle vaccinated against rabies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including**
22 **Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 476-486, 2006. Acessado em 15 nov. 2013.

23 Online. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v12n3/31234.pdf>

24 ALMEIDA, L. E. et al. Efeito do probiótico na resposta imune humoral em bovinos.

25 **Colloquium Agrarie**, v.8, n.1, p.26-35, jan-jun, 2012. Disponível em:

1 <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/536/696>>. Acesso em:
2 20 out. 2013. doi: 10.5747/ca2012. v.08.n1.a076.

3 ALMEIDA, L. E. et al. Utilização de probióticos sobre o ganho de peso em bovinos da raça
4 nelore. **Colloquium Agrarie**, v.9, n.1, p.25-30, jan-iun, 2013. Disponível em:<[http://](http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/537/981)
5 revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/537/981>. Acesso em: 02 nov.
6 2013. doi: 10.5747/ca2013. v.09.n1.a086.

7 ARENAS, S.E. et al. Probiotic increase the antirabies humoral immune Response in bovine.
8 **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p.733-736, 2009. Acessado em 12 out. 2013. Online.
9 Disponível em:[http:// http://sciELO.org/scielodata/azoo/v58n224/art11.pdf](http://sciELO.org/scielodata/azoo/v58n224/art11.pdf)

10 AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e**
11 **médicas**. Belém do Pará Sociedade Civil Mamirauá, CNPq , 2007. 364p.

12 CHABEL, J.C. et al. Efeito de um complexo homeopático "Homeostase Convert H" em
13 ovinos sob condições de restrição alimentar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and**
14 **Animal Science**. São Paulo, v.46, n.5, p.412-423, 2009. Acessado em 10 out. 2013. Online
15 Disponível em:
16 <http://www.revistausp.sibi.usp.br/scielo.php?pid=S141395962009000500010script=sciarttext>

17 COOK, M.T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of**
18 **Controlled Release**, v.162, p.56-67, 2012. Disponível em:<[http://www.sciencedirect.com/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912004968)
19 [science/article/pii/S0168365912004968](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912004968)>. Acessado em 02 out. 2013.
20 doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003.

21 COSTA, E.S.; VARAVALLO, M.A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e
22 promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**, v.4, n.2, abr, 2011. Acessado em: 25 fev.
23 2014. Online. Disponível em: <http://www.itpac.br/Revista/42/6.pdf>

24 FERREIRA, L.A. et al. Avaliação da vacinação anti-rábica e da suplementação com
25 probiótico na resposta imune humoral em bovinos. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.

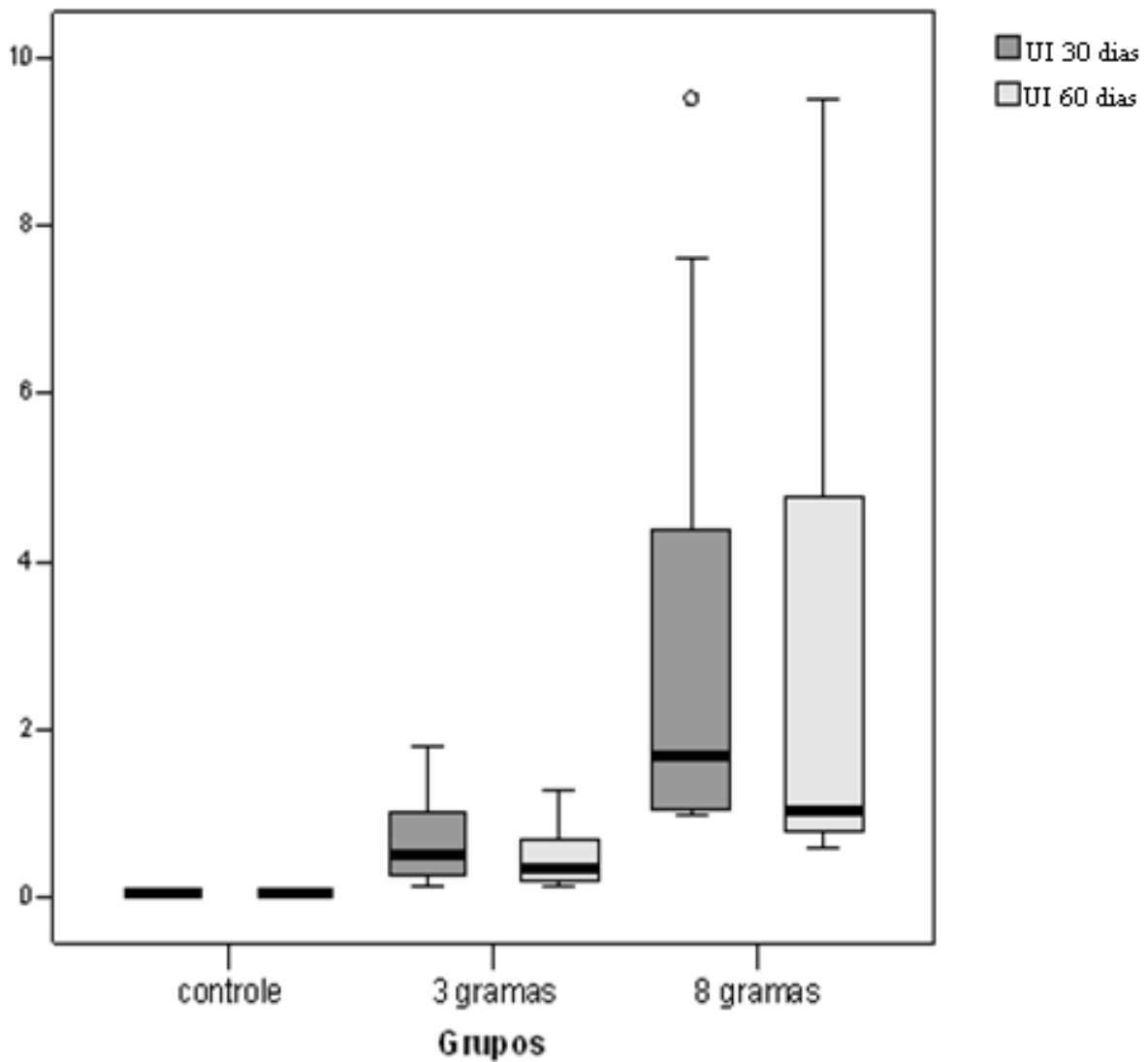
1 30, n. 3, p. 655-660, jul-set, 2009. Acessado em: 01 set.2013. Online. Disponível em:
2 <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/download/3574/2885>
3 INSTITUTO PASTEUR. **Raiva dos Herbívoros**. Acessado em 01 de nov. 2012. Online.
4 Disponível em: http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_03.htm
5 MARIA, E.K. et al. **Efeito com a suplementação com zinco na resposta immune humoral**
6 **anti-rábica em bovinos**. 2009. 27f. Dissertação (Mestrado Ciência Animal) – Curso e Pós-
7 graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente.
8 MATOS, B.C. Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão. **PUBVET**, Londrina, v.2, n.9,
9 ed.20, art.320, mar. 2008. Disponível em:
10 http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=320. Acesso em: 03/01/2014.
11 NOGUEIRA, J.C.R.; GONÇALVES, M.C.R. Probiotics in allergic rhinitis. 2011. **Revista**
12 **Brasileira de Ciências da Saúde**. v.15,n.4, p.487-792, 2011. Disponível em:
13 <http://www.biblionline.ufpb.br/ojs/index.php/rbcs/article/view/8201/6858>. Acesso em 5 set.
14 2013. doi 10.4034/RBCS.2011.15.04.16
15 OMS. **Rabies**. World Health Organization, set. 2011. Acessado em 15 dez. 2013. Disponível
16 em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>
17 PAGANO, M., GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. 2 ed. São Paulo: Pioneira
18 Thomson Learning, 2004. 506p.
19 PARDO, P.E.; REIS, L.S.L.S. Nutrientes e nutracêuticos em grandes animais. In:
20 ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Rocha Ltda., 2008.
21 Cap. 29, p.808-814.
22 PENHA, L. A. C., et al. Effects of probiotic supplementation on liveweight gain and serum
23 cortisol concentration in cattle. **Veterinary Record**, v.168, p.538, 2011. Acesso em 19 ago.
24 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.d589>
25 REIS, L.S.L.S., et al. Effects of primovaccination and booster vaccination on serum cortisol

1 and humoral immune response in cattle. **Advances in Bioscience and Biotechnology** v.4,
2 p.607-611, 2013. Disponível em:
3 http://file.script.org/HI/1-7300550_31904.htm. doi:10.4236/abb.2013.45079
4 REYES; E.J.A; RODRIGUES;F.L. ?Qué sabe Ud. acerca de... los probióticos?. **Revista**
5 **Mexicana de Ciencias Farmacêuticas**, México, v.41, n.1, p.60-3, 2010. Acessado em: 26
6 set.2013. Online. Disponível em:<http://www.redalyc.org>
7 ROSA, E.R., et al. Avaliação da resposta imune humoral em bovinos vacinados com a
8 antirrábica e suplementados com probiótico. **Revista Científica Eletrônica de Medicina**
9 **Veterinária**, n.20, 2013. Acessado em 17 ago. 2013. Online. Disponível em:
10 <http://www.revista.inf.br>
11 SHEFFER, K. C. et al. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de
12 São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n.3, p. 389-395, 2007. Acessado em 26
13 set. 2013. Online. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v41n3/5872.pdf>
14 SMITH, J,S. et al. A rapid luorescent focus inhibition test (RFFIT) for determing rabies
15 virus-neutralizing antibody. In: MESTIN, F.X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed).
16 **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1998. p. 181-192.
17 ZALAN, E. et al. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies.
18 **Journal of Biological Standardization, Saskatchewan**, v.7, n.3,p.213-220,1979. Acessado
19 em 25 set. 2013. Online. Disponível em:
20 <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00921157/>

1 **Tabela 1** – Média aritmética, Mediana e intervalo interquartil (IQ) de títulos sorológicos em
 2 unidades soroneutralizantes mensurados pela técnica de RIFF em três grupos experimentais
 3 vacinados contra raiva com vírus rábico vacinal cepa vírus Pasteur, Presidente Prudente,
 4 2014.

Grupo	30 dias			60 dias		
	Média ± d.p.	Mediana	IQ	Média ± d.p.	Mediana	IQ
Controle	0,052 ± 0,006 (Aa)	0,050	0,000	0,050 ± 0,000 (Aa)	0,050	0,000
3 Gramas	0,685 ± 0,502 (Ba)	0,495	0,715	0,451 ± 0,325 (Ba)	0,330	0,468
8 Gramas	3,061 ± 2,977 (Ba)	1,670	2,805	2,744 ± 2,960 (Ca)	1,020	3,600

5 d.p. – Desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ou letras minúsculas diferentes na
 6 mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas



1 **Figura 1** - Títulos soroneutralizantes mensurados aos 30 e 60 dias pós-vacinação com vírus
 2 rábico vacinal cepa vírus Pasteur para bovinos do grupo controle, grupo suplementado com 3
 3 gramas de probiótico e grupo suplementado com 8 gramas de probiótico. As linhas no interior
 4 dos boxes denotam o segundo quartil (50% dos dados - mediana), as linhas superiores, o
 5 terceiro quartil (75% dos dados) e as inferiores o primeiro quartil (25% dos dados). As linhas
 6 aplicadas indicam os limites dos valores extremos.

- 1 **Tabela 2** – Percentual de animais protegidos contra raiva mensurados aos 30 e 60 dias pós
- 2 vacinação em três grupos submetidos a diferentes tratamentos, Presidente Prudente, 2014.

Grupo	30 dias			60 dias		
	Protegidos	Não protegidos	Total	Protegidos	Não protegidos	Total
Controle	0 (0%)	14 (100%)	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	14 (100%)
3 gramas	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	6 (42,8%)	8 (57,2%)	14 (100%)
8 gramas	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)

ANEXO



Normas para publicação

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.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. 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.**

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

7. 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.

8. 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).

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

9.1. 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.

9.2. 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.

9.3. 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.

9.4. 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.; ULRICHS, 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. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. 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.

9.6. 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.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. 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.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afeções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

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. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

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.

10. 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.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

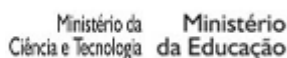
12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.



Ciência Rural
Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais
Prédio 42, Sala 3104 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil
E-mail: cienciarural@mail.ufsm.br
Fone/Fax: (55) 32208698
Fax: (55) 32208695