

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE RATOS *WISTAR* :
SINCRONIZAÇÃO, RESTRIÇÃO ALIMENTAR E SISTEMAS DE
PRODUÇÃO.**

VÂNIA GOMES DE MOURA MATTARAIA

Trabalho apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor.

BOTUCATU - SP
Julho – 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE RATOS *WISTAR* :
SINCRONIZAÇÃO, RESTRIÇÃO ALIMENTAR E SISTEMAS DE
PRODUÇÃO.**

VÂNIA GOMES DE MOURA MATTARAIA
Zootecnista

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura

Trabalho apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor.

BOTUCATU - SP
Julho - 2007

U50-504736

WIA-69285

T

M435e

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M435e Mattaraia, Vânia Gomes de Moura, 1958-
Eficiência reprodutiva de ratos wistar : sincronização
restrição alimentar e sistemas de produção / Vânia Gomes
de Moura Mattaraia. - Botucatu : [s.n.], 2007.
iv, 83 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007
Orientador: Ana Sílvia Alves Meira Tavares Moura
Inclui bibliografia.

1. Rato. 2. Reprodução animal. 3. Acasalamento de animais. 4. Restrição alimentar. I. Moura, Ana Sílvia Alves Meira Tavares. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

A meus pais, por guiarem meus primeiros passos, por confiarem em meus sonhos e acreditarem que eu pudesse realizá-los.

Ao Luis, por estar sempre ao meu lado, e fazer crescer, a minha capacidade de realizar.

À Maria e Pedro, meus filhos, amigos e companheiros.

A todos vocês, por tornarem minha vida mais feliz.

*Com vocês ao meu lado,
não sou apenas uma mulher feliz,
sou alguém capaz de amar a vida,
de reconciliar-me com as coisas,
alguém capaz de existir,
de se sentir alguém...*

(Adaptação do Poema *Alguém* de Araújo Jorge)

Agradecimentos

A Profª. Drª. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura, pela orientação, por confiar no meu trabalho e por sua admirável competência.

A Profª. Drª. Denise Rangel da Silva Sartori, pelo carinho, disposição e colaboração na realização das mensurações dos corpos lúteos.

Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos, pelas valiosas colaborações ao longo deste trabalho.

Prof. Dr. Francisco Stefano Wechsler, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Profª. Drª. Clélia Akiko Hiruma Lima, pela gentileza de ceder os equipamentos necessários à contagem dos corpos lúteos.

A equipe técnica do Biotério Central do Instituto Butantan, pelo incentivo, compreensão e constante colaboração.

A Drª. Simone Fernandes, por toda sua colaboração e amizade.

A Seila, Carmen, Danilo, Solange e Barbosa, pela atenção, alegria e boa vontade em todos os momentos.

Que a estrada se abra à sua frente. Que o vento sopra levemente às suas costas. Que o sol brilhe morno e suave em sua face. Que a chuva caia de mansinho em seus campos. E até que nos encontremos de novo que Deus lhe guarde na palma de suas mãos.

Oração Irlandesa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Considerações iniciais.....	1
Histórico	2
Bibliografia.....	14
CAPÍTULO 2: Restrição alimentar quantitativa em ratas <i>Wistar</i>	20
Resumo.....	21
Abstract.....	23
Introdução.....	25
Material e métodos	26
Resultados	31
Discussão	33
Conclusões	36
Bibliografia.....	37
Tabelas	40
Figuras	45
CAPÍTULO 3: Técnicas de sincronização do estro de ratas <i>Wistar</i>	53
Resumo.....	54
Abstract.....	55
Introdução	56
Material e métodos	57
Resultados e discussão.....	60

Conclusão.....	61
Bibliografia	62
Tabela.....	63
Figuras.....	64
CAPÍTULO 4: Produtividade de ratos <i>Wistar</i> em diferentes sistemas de produção.....	67
Resumo.....	68
Abstract.....	69
Introdução	70
Material e métodos	72
Resultados	74
Discussão.....	75
Conclusão.....	78
Referências bibliográficas	79
Tabelas	80
CAPÍTULO 5: Implicações.....	82
Implicações.....	83

CAPÍTULO I

Considerações iniciais

Eu não tenho filosofia; tenho sentidos... Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é, mas porque a amo, e amo-a por isso. Porque quem ama nunca sabe o que ama nem sabe por que ama, nem o que é amar...

Alberto Caeiro, em "O Guardador de Rebanhos"

Histórico

Pinturas de agrupamentos neolíticos, assim como pequenas esculturas encontradas na Ásia e na Europa, e até mesmo restos de ossos em ruínas incas, revelam deformidades que permitem fazer certos diagnósticos e mostram intervenções cirúrgicas terapêuticas. A observação de fenômenos biológicos e as tentativas de cura provavelmente devem ter ocorrido desde os agrupamentos homínídeos primitivos. Entretanto, só a invenção da escrita possibilitou um maior conhecimento sobre as descobertas dos povos antigos em relação aos fenômenos do organismo saudável ou enfermo. As primeiras menções escritas feitas a doenças e seus tratamentos encontram-se nos famosos papiros de Ebers e de Smith. O primeiro descreve numerosas medidas terapêuticas, o segundo, contém a primeira citação ao sistema nervoso.

Aristóteles, no século 2 a.C., estudou a anatomia de diversos animais, Herófilo durante o período alexandrino, dissecava rotineiramente animais, chegando à errônea conclusão de que as artérias só continham ar, pelo fato de realizar seus estudos em animais mortos. Galeno, no século 2 d.C., dissecou centenas de animais de várias espécies e extrapolou suas descobertas para o homem, sem aparentemente jamais ter dissecado cadáveres humanos (TIMO-IARIA, 1992). Durante os séculos dezoito e dezenove a experimentação animal progrediu lentamente de uma prática relativamente incomum, até alcançar um enfoque científico. À medida que os conhecimentos científicos avançaram, as metodologias também se modificaram, adaptando-se aos novos desafios para desvendar a intimidade dos fenômenos. É, pois, absolutamente lícito, do ponto de vista de metodologia científica, fazer uso de determinadas espécies para o estudo de fenômenos biológicos e transferir os resultados obtidos para outras espécies, inclusive para espécie humana (ANDERSEN, M.L, *et al.*, 2004).

J. BERKENHOUT, em seu tratado *Esboço da Historia Natural da Grã-Bretanha*, de 1769, afirmou (erroneamente) que o rato era originário da Noruega e usou *R. norvegicus* na primeira descrição linear formal da espécie. O *R. norvegicus* provavelmente se originou na parte norte da China e migrou para a Europa ao redor do século dezoito. Eles podem ter entrado na Europa após um terremoto em 1727, atravessando o rio Volga. A primeira colônia de criação de ratos foi estabelecida em 1856 (BARNETT, S. A., 2002). A publicação em 1915 da primeira edição do livro *The Rat* foi fundamental para a caracterização da linhagem *Wistar* e sua difusão nas

pesquisas biomédicas. Os ratos utilizados em pesquisas pertencem à espécie *Rattus norvegicus*, sendo a *Wistar* uma linhagem não-endogâmica (*outbred*) (ANDERSEN, M.L., *et al.*, 2004).

Biologia e usos do rato em pesquisas

No último século, o papel do rato se transformou de carregador de doenças infecciosas em ferramenta indispensável na medicina experimental e desenvolvimento de drogas. Exemplos atuais do uso do rato na pesquisa médica humana incluem: cirurgia, transplante, diabetes, distúrbios psiquiátricos incluindo intervenção comportamental e vício, regeneração neural, cura de ferimentos e de ossos, enjôo espacial, e doenças cardiovasculares. No desenvolvimento de drogas o rato é usado normalmente tanto para demonstrar eficácia terapêutica como para descobrir a toxicidade de compostos terapêuticos antes dos testes clínicos em humanos. Diversas características tornaram o rato um modelo atraente para pesquisa, entre elas seu pequeno porte, ciclo biológico curto, baixo custo de manutenção e atualmente a descoberta da similaridade genética entre este roedor e os seres humanos: aproximadamente 80% do DNA dos ratos é idêntico ao do homem. (RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, 2004).

O rato é um mamífero roedor da família *muridae*, nasce sem pêlos, de olhos fechados, com o conduto auditivo fechado, sem dentes, pesando em média cinco gramas, corpo fusiforme, cauda longa, ausência de glândulas sudoríparas, receptores táteis bem desenvolvidos (cabeça, vibrissas, patas e cauda) e cinco dedos em cada pata. Apresenta longas vibrissas, aproximadamente quinze de cada lado, implantadas em profundidade e solidárias, com receptores mecânicos, constituindo um dos principais sentidos do rato. São animais de hábito noturno. Durante as duas primeiras semanas de vida do filhote, o sistema nervoso está em processo de maturação e o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal está hiporresponsivo ao estresse (LEVINE, 2001). Este roedor não apresenta vesícula biliar.

A ontogenia do rato *Wistar* ocorre aproximadamente da seguinte forma:

- ✓ Abertura do pavilhão auditivo de 2 a 4 dias de vida
- ✓ A penugem aparece por volta de 5 a 6 dias e têm o corpo coberto de pêlos aproximadamente aos 9 dias de vida.

- ✓ Erupção dos incisivos superiores de 6 a 12 dias de vida
- ✓ Abertura do conduto auditivo e dos olhos de 10 a 14 dias de vida
- ✓ Ingestão de alimentos sólidos de 11 a 13 dias de vida
- ✓ A puberdade ocorre por volta de 45 a 55 dias de vida
- ✓ A expectativa de vida em biotério é de 24 a 36 meses.

Características das Fêmeas

Como em quase todas as espécies, a rata apresenta peso menor que o do macho desde o nascimento e essa diferença perdura até a idade adulta constituindo-se na característica mais evidente de dimorfismo sexual da espécie. Em torno dos 60 dias de idade, atinge a maturidade sexual. Porém, a idade mais usual para o acasalamento (em biotérios) é de 90 dias, quando a fêmea pesa em torno de 250 g. A rata é poliéstrica, apresenta ovulação espontânea; isto significa que um padrão secretor de estrogênio associado com o desenvolvimento de folículo(s) dominante(s), que são aquele(s) com capacidade ovulatória, é quase sempre capaz de iniciar a liberação de uma onda de LH que resulta na ovulação (DUKES, 1996). O útero é formado por dois cornos uterinos e a glândula mamária possui seis pares de tetas que são visíveis a partir da segunda semana de vida. A abertura da vagina ocorre por volta de 30 a 45 dias de idade e o ciclo estral regular tem início aproximadamente uma semana após a abertura da vagina. O ciclo estral dura de quatro a cinco dias e possui quatro fases (diestro, pro-estro, estro e metaestro), as quais podem ser observadas através da análise citológica da secreção vaginal (MARCONDES et al., 2002). O estro dura de 12 a 14 horas. A duração da gestação da rata é em média de 21 dias e nascem cerca de 6 a 12 filhotes. A gestação pode ser dividida em três períodos: o primeiro, conhecido como pré-implantação, abrange do 1º ao 5º dia, o segundo, o organogênico, do 6º ao 15º dia e o terceiro, o fetal. (WOLFENSONH, S. & LLOYD, M., 1998). As ratas apresentam cio pós-parto, o qual ocorre dentro de 48 horas, geralmente fértil, quase sempre acontece de gerar uma ninhada enquanto aleita outra. As fêmeas apresentam o tampão (*plug*) copulatório da vagina que se forma 3 a 8 horas após a cópula e permanece no local por aproximadamente 24 horas. Este tampão é formado a partir da secreção das glândulas vesiculares do macho e encontra-se no trato reprodutivo da fêmea, da vulva até a cérvix. A ativação do corpo lúteo não é espontânea e depende de um estímulo neural originário da estimulação mecânica da cérvix uterina próximo ao momento da ovulação. Tal estimulação é normalmente associada ao coito.

Características dos Machos

A puberdade nos machos ocorre por volta dos 50 dias de idade, quando aparecem as espermatídes maduras nos testículos e são observados os primeiros espermatozóides na cauda do epidídimo. Porém, a descida dos testículos da cavidade abdominal para a bolsa escrotal ocorre antes da puberdade, normalmente por volta de 29 a 30 dias de idade. Os machos também (em biotérios) devem ser acasalados por volta dos 90 dias de idade, quando estão pesando aproximadamente 300 g

O rato apresenta comportamento territorial acentuado e defende rapidamente seu ninho e sua área circunvizinha. Na natureza vivem em colônias que consistem em diversas famílias compostas de um macho e de um harém de fêmeas. O macho dominante em uma colônia é estabelecido pelo tamanho e pela luta; os indivíduos derrotados freqüentemente são expulsos da colônia.

Sincronização do estro

As novas técnicas de produção de animais através de criopreservação e transferência de embriões, como também as usadas para promover o melhoramento do padrão sanitário das colônias de roedores, necessitam de uma fêmea doadora e de uma receptora. Um artifício indispensável para se atingir o sucesso desejado nestas técnicas, é a sincronização de estros entre doadoras e receptoras. As fêmeas dos mamíferos, especialmente dos que vivem em grandes grupos, estão envoltas em um ambiente social muito rico e complexo, repleto de estímulos sensitivos provenientes dos demais componentes do grupo (MARTIN, 2002). Em camundongas, a presença de fêmeas adultas atrasa a puberdade das fêmeas jovens. Em alcatéias, embora as fêmeas subordinadas apresentem cio e até cortejem os machos, elas não copulam, a menos que a fêmea dominante seja removida do grupo (ALCOCK, 1993).

Na maioria das espécies, mudanças externas para a idade adulta incluem mudanças graduais no comportamento e na aparência corpórea. Essas mudanças refletem uma cadeia de eventos que se originam no cérebro: aumento da produção de esteróides sexuais pelas gônadas, em resposta a aumento na secreção de gonadotrofinas da glândula pituitária anterior, que, por sua vez, está sendo guiada pelo aumento da secreção de GnRH pelo hipotálamo. Esses sinais têm origem interna e estão relacionados ao crescimento, enquanto outros têm origem externa e fornecem informações sobre o ambiente em que o animal vive (FOSTER & NAGATANI, 1999).

O termo feromônio foi proposto por Karlson & Luscher (1959) para descrever substâncias que, secretadas por um organismo para o meio ambiente, são percebidas por um indivíduo da mesma espécie, desencadeando respostas comportamentais e endócrinas. Segundo o guia de criação para camundongos geneticamente modificados (Guidelines for Breeding Genetically Engineered Mice), os feromônios podem influenciar o desempenho reprodutivo também nos ratos e podem ser usados como ferramenta para ajudar o investigador na sincronização do estro das fêmeas doadoras e receptoras.

A sincronização do ciclo estral e a programação do parto são desejáveis em animais experimentais, pois nos biotérios são muitas as solicitações de animais com a mesma data de nascimento, como também, precisão do estágio gestacional. A sincronização pode ser realizada por diversos métodos: efeito *Whitten*; sincronização hormonal pela administração de (PMSG) ou usando o (LHRH); e pela presença de machos vasectomizados. Dentre as técnicas acima citadas, a comumente usada em biotérios é o Efeito *Whitten*, pelo seu baixo custo e pela elevada quantidade de animais a serem produzidos. *Whitten* observou que fêmeas de camundongo, quando alojadas em grupos na mesma gaiola, tendem a apresentaraios erráticos ou anestro. Quando um macho ou o odor de sua urina é introduzido no grupo, ocorre a liberação de gonadotrofina e é ativado o ciclo ovariano de forma sincronizada (WHITTEN, 1956). Os estudos de *Whitten* foram realizados em camundongos e esta técnica foi extrapolada para o uso em ratos, porém grande divergência dos autores, quanto a eficiência do efeito *Whitten* em ratos, RICHARD & KRISTIN, 2006; SHARP, P.E. & La REGINA, M.C.,1998; LABERL-LAIRD et al., 1996.

O uso de machos vasectomizados é uma prática que exige um profissional qualificado para executar a cirurgia e, como toda intervenção cirúrgica, requer que cuidados especiais sejam dispensados aos animais no período pós-cirúrgico, dificultando assim seu uso. Em alguns países existem laboratórios que fornecem os machos vasectomizados. A sincronização pela administração de hormônios, atualmente é pouco utilizada em biotérios, devido ao elevado custo dos hormônios e à grande quantidade de animais.

A caracterização de cada fase do ciclo estral em ratas é baseada na proporção entre três tipos de células observadas na secreção vaginal: as células epiteliais, as células corneificadas e os leucócitos. A ovulação ocorre 9 a 10 horas após o início do

estro (YOUNG et al., 1941; SCHWARTZ, 1964, HAFEZ, 1970). Do início da maturidade sexual até a idade de 12 meses, o comprimento médio do ciclo estral na rata está por volta de 4 dias (LONG & EVANS, 1922; FREEMAN, 1988; MANDL, 1951). Isto faz do rato um animal ideal para investigação das mudanças que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (SPORNITZ et al., 1999; MARCONDES et al., 2001). A citologia vaginal é estudada através da colpocitologia também conhecida como citologia esfoliativa, que compreende o estudo das células naturalmente descamadas ou retiradas artificialmente da superfície dos tecidos. O estudo da citologia esfoliativa, introduzido por PAPANICOLAOU (1942), possibilitou avaliações citológicas, uma vez que o epitélio vaginal sofre modificações em função de variações hormonais cíclicas (SCHUTTE, 1967b) durante o ciclo estral, como também é utilizado no intuito de diagnosticar, precocemente, patologias do trato genital feminino. (RAPOSO & SILVA, 1999). A utilização do método direto a fresco é universalmente aceita como sendo o melhor na prática ambulatorial, agilizando o diagnóstico e tratamento do corrimento vaginal, maior queixa ginecoblástica. (SILVA FILHO, 2004).

Analisar um esfregaço vaginal é um exercício de se classificar as células epiteliais dentro de um dos três tipos fundamentais: células parabasais, intermediárias ou superficiais, tendo em mente, no entanto, que as células epiteliais refletem um desenvolvimento contínuo, havendo células que não se ajustam perfeitamente dentro dessas categorias rigidamente definidas. O diestro é caracterizado pela predominância de muitos leucócitos e poucas células epiteliais nucleadas. No pró-estro encontra-se células epiteliais muito pequenas, arredondadas, nucleadas, sozinhas ou achatadas e poucos leucócitos. O estro apresenta células grandes corneificadas, com núcleos degenerados. Ao fim do estro, o esfregaço torna-se “caseoso” – massas de células corneificadas aderentes. Tem-se no metaestro muitos leucócitos e poucas células corneificadas. As fases intermediárias requerem mais prática para sua identificação.

Efeito da restrição alimentar quantitativa sobre a reprodução

Dentre os principais fatores que influenciam o desempenho reprodutivo está a nutrição (SHORT et al., 1994). Portanto, avaliar o estado nutricional das fêmeas é fundamental para se atingir melhor taxa de prenhez. A nutrição é essencial para o sucesso em qualquer programa reprodutivo, entretanto, a máxima de “quanto mais, melhor” nem sempre é verdadeira. Necessita-se, portanto, encontrar quais são os níveis

adequados de nutrição para a máxima eficiência reprodutiva, já que esses níveis ainda são pouco conhecidos. Em estudos com ratos, observou-se que a manipulação da quantidade de alimento disponível para os filhotes durante o período de aleitamento altera de forma consistente o comportamento alimentar na vida adulta. Assim, quando há grande quantidade disponível de leite, ocorre persistência de hiperfagia acompanhada por sobrepeso (SOUZA, S.L et al., 2003).

BERNARDO A. HOUSSAY, em 1947, foi o pioneiro nos estudos de *Meal-feeding scheme* (MFS), que consiste na oferta de uma única refeição diária de 2 horas, sem restringir a disponibilidade de ração durante esse período. Em 2000, BAZOTTE et al, publicaram uma síntese de vinte anos de pesquisa no Brasil sobre MFS. Neste estudo, os autores relatam que a limitação do alimento causa mudanças metabólicas importantes, interferindo na sobrevivência animal. LEE, et al. (1999), demonstraram que a maioria das alterações causadas pelo envelhecimento é inibida completa ou parcialmente pela limitação calórica, a única intervenção conhecida para atrasar o envelhecimento nos mamíferos, até aquele momento. Estas descobertas aliadas à grande preocupação mundial com a questão da obesidade humana, que emergiu como uma epidemia em países desenvolvidos durante as últimas décadas do século XX, atualmente atinge todos os níveis socioeconômicos e vem aumentando sua incidência, também, nos países em desenvolvimento, impulsionaram os estudos da restrição alimentar (BERNARDI, 2005).

Alguns pesquisadores afirmam que roedores de laboratório comem demais se comparados aos roedores selvagens e a esta hipótese chamam de “hipótese do gluttonismo de laboratório”. Sendo assim, estes pesquisadores discutem se o efeito do atraso na senescência pela restrição calórica em roedores de laboratório não seria um artefato de super alimentação sob condições de cativeiro (CHERKIN, 1979; HAYFLICK, 1994). Por exemplo, Cutler (1982) declarou que a restrição calórica leva “o animal de volta à taxa de envelhecimento que ele normalmente teria em um nicho ecológico natural” e não prolonga o prazo de vida além do “potencial genético normal do animal”. Mais geralmente, esse argumento postula que os camundongos selvagens são crônica e caloricamente restritos devido à dificuldade de encontrar alimento na natureza. Experimentos demonstraram que várias espécies são saudáveis e vivem mais tempo se não se lhes permite tornarem-se obesas (ATOR, 1991; KEMNITZ, *et al.*, 1989, 1993; LANE *et al.*, 1992, 1997; TURTURRO, *et al.*, 1999). Por exemplo, ratos

tendo restrição na dieta suficiente para causar redução de 25% no peso corporal, comparados àqueles controles alimentados *ad libitum*, vivem mais tempo sem prejuízo de crescimento ou de índices da rotina clínica de saúde (HUBERT *et al.*, 2000). A restrição de peso é melhor se iniciada antes de o animal alcançar a maturidade.

O conhecimento das exigências de nutrientes, assim como os padrões de alimentação e crescimento das diferentes espécies, é importante para determinar os regimes de controle racional de peso (NATIONAL INSTITUTE of MENTAL HEALTH, 2002). O DR (*Dietary Caloric Restriction*) foi explorado extensivamente por mais de setenta anos, por causa da sua capacidade de prolongar a longevidade, reduzir a morbidade relacionada com a idade e atrasar ou impedir a maioria das disfunções fisiológicas associadas à idade (KRISTAL & YU 1994, WEINDRUCH & WALFORD 1988). A restrição calórica altera também muitos processos fisiológicos básicos, incluindo o metabolismo e o balanço hormonal (YU 1996). Foi descoberto um novo produto secretado pelos adipócitos, denominado de leptina, uma proteína de peso molecular de 16 kDa, composta por 167 aminoácidos, codificada pelo gene *ob*. A etimologia da palavra "leptina" deriva da palavra grega "leptos", que significa magro. A sua função primária é agir no SNC, participando da regulação do peso por meio do controle do apetite e do consumo de energia. Já o gene *db* responde pela conformação dos receptores (ZHANG, 1994). Vem sendo estudado também o papel da leptina na oscilação de ingestão, pois ela regula o apetite e suas concentrações séricas oscilam de acordo com as concentrações de LH, ocorrendo uma elevação de leptina na fase lútea (CELLA *et al.*, 2000).

A restrição calórica pode ser implantada de várias maneiras, variando desde métodos grosseiros, tais como os protocolos originais de McCAY, onde os animais foram alimentados somente o necessário para permitir um crescimento gradual, à alimentação dia sim dia não, aos paradigmas que controlam a ingestão de alimento de um mínimo de 20% até 55% ou mais (McCAY 1935, TANNENBAUM 1945, CARLSON & HOELZEL 1946, ROSS & BRAS 1970, NOLEN 1972, CHENEY *et al.* 1980, MAEDA *et al.*, 1985, GOODRICK *et al.* 1990 WEINDRUCH & WALFORD 2000. A restrição calórica total é mais importante do que a redução de ingestão de constituintes/nutrientes (por exemplo, gordura, proteínas, vitaminas e minerais específicos, etc.) (IWASAKI *et al.* 1988a, IWASAKI *et al.*, 1988b). A restrição calórica estende a longevidade essencialmente em todos os animais em que foi testada, incluindo

as espécies mamíferas múltiparas (rato, camundongo, cobaia) (McCAY 1935, TANNENBAUM 1945, CARLSON & HOELZEL 1946, ROSS & BRAS 1970, NOLEN 1972, STUCKLIKOVA, et al., 1975, CHENEY et al.1980, MAEDA et. al., 1985, GOODRICK et al. 1990, KRISTAL & YU 1994, WEINDRUCH & WALFORD 2000). A inclusão de altos níveis energéticos nas dietas alimentares de marrãs no início da gestação, está relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo hepático, aumentando o metabolismo e provocando também redução da progesterona na circulação (Peltoniemi et al., 2000). Assim, tanto a deficiência quanto o excesso de calorias na ingestão de calorias podem ser prejudiciais nos estágios iniciais da prenhez.

O conhecimento dos efeitos do sistema de alimentação sobre os três períodos da gestação da rata é fundamental para as pesquisas na área de toxicologia da reprodução e da embriofetotoxicologia (ANDERSEN et al., 2004). Estudos mais recentes na área da embriofetotoxicologia, já atentam para a questão da restrição alimentar, como sendo uma interferência nos resultados obtidos com drogas que alteram o apetite dos animais (TERRY et al.,2005).

Muito já se sabe sobre a restrição alimentar no contexto da longevidade, entretanto, não há relatos sobre o efeito da restrição quantitativa na reprodução de ratas de laboratório. A reprodução na fêmea, abrange diversos processos que vão do desenvolvimento folicular, à ovulação, da fertilização à embriogênese, da implantação ao parto e à lactação, que estão sob o controle hormonal (BOITI, 2004).

Ritmo reprodutivo e sistemas de produção

No cenário nacional, os laboratórios que utilizam ratos em seus projetos de pesquisa, preferem trabalhar com machos. Esta predileção é atribuída à necessidade, nem sempre cientificamente respaldada, de eliminar os efeitos de eventuais variações fisiológicas que ocorrem durante o ciclo estral das fêmeas, sobre os resultados da pesquisa. Isto ocasiona um enorme problema de produção animal. No estudo dos animais domésticos utilizados na produção de alimentos, encontramos disponível um grande volume de publicações nacionais e internacionais sobre técnicas de produção, sistemas de acasalamentos intensivos e extensivos, confinados ou não, sistemas permanentes e rotacionais de reprodutores, para todas as espécies e até para raças em particular. No entanto, a produção de animais de laboratório acontece de uma forma um tanto empírica, não havendo amparo técnico entre os sistemas utilizados ou mesmo

trabalhos científicos que justifiquem a escolha dos métodos adotados. Isto ocorre até mesmo nos grandes biotérios de produção de animais de laboratório do país, onde a produção de roedores é sempre muito alta devido à necessidade destes animais para projetos de pesquisa científica, produção de imunobiológicos, controle de qualidade de fármacos e para alimentação de outras espécies. Não se dispõe de justificativas científicas para as técnicas de produção utilizadas.

A falta de informação, a predileção dos pesquisadores por machos e, atualmente, a preocupação internacional com a produção dentro dos critérios de bem-estar animal (BEA), levam os bioteristas a um conflitante dilema. Como atender à crescente demanda de animais solicitada pelos cientistas, sem infringir os conceitos de Boas Práticas de Produção? Recentemente, o Departamento de Assuntos Ambientais, de Alimentos e Rurais (*Department of Environment, Food and Rural Affairs – DEFRA*) do Reino Unido publicou um relatório sobre Bem-Estar Animal, Economia e Regulamentação que constitui um dos artigos mais completos sobre o assunto (McINERNEY, 2004). Percebe-se uma tendência de se organizar formas de exigência de padrões mínimos de BEA a partir de regulamentações governamentais.

RUSSELL e BURCH, publicaram, em 1959, o livro *The principles of humane experimental technique* com suas normas legais e reguladoras. Nesta publicação afirmaram que a boa pesquisa com animais deve respeitar três Rs: *replacement*, *reduction* e *refinement*. A redução sugeria que as pesquisas fossem realizadas com o menor número de animais que permitissem alcançar os objetivos do trabalho. Atualmente, o conceito de redução não apenas abrange a quantidade de animais usados, como principalmente o bem-estar animal. Hoje se entende que reduzir apenas o número pode acarretar no aumento do número de procedimentos em cada animal, causando o efeito indesejável do sofrimento (Nuffield Council on Bioethics, 2005).

A predileção por machos na pesquisa ocasiona um enorme problema nos biotérios, pois torna necessária a sexagem dos recém-nascidos, requerendo mão de obra especializada para a eliminação das fêmeas, numa tentativa de diminuir o seu descarte mais tardio. Para aumentar a produção, os bioteristas acabam compondo ninhadas de sete machos e uma fêmea, resultando em elevada demanda, pois é alta a quantidade de animais eliminados, gerando problemas éticos sérios. Esta composição de ninhadas pode influenciar nos dados de produção

Nos grandes biotérios, onde há elevada demanda, é comum adotar-se a estratificação das colônias de roedores em Colônias de Fundação, Expansão e Produção. Entende-se por Colônia de Fundação a que deu origem ao plantel. A principal função desta colônia é preservar o material genético o mais próximo possível dos primeiros exemplares que a originou. Os acasalamentos devem ser monogâmicos, propiciando controle de pedigree, exatidão dos dados reprodutivos e o cálculo dos índices de produtividade. A colônia de Expansão é aquela estabelecida pelos animais advindos da colônia de Fundação. O manejo na colônia de expansão é de acordo com a demanda de animais; essa colônia quase sempre é poligâmica e sua produção não só atende o usuário como também fornece reprodutores para a colônia de Produção. A colônia de Produção é praticamente um estrato dos grandes biotérios, quando se necessita de um elevado número de animais recém-nascidos, ou em outros casos, para alimentação de outros animais. Existe um fluxo definido entre as colônias, onde a Colônia de Fundação hierarquicamente é superior às demais, ou seja, ela se auto perpetua e envia animais para a colônia de Expansão e essa por sua vez para a colônia de Produção.

Qual tipo de sistema de acasalamento é mais adequado para as colônias de Expansão e Produção? Os acasalamentos devem ser intensivos, aproveitando o cio pós-parto, ou seja, é conveniente que a reprodutora gere uma ninhada enquanto aleita a outra, visto que o período de gestação é igual ao do aleitamento (21 dias)? Ou é melhor proporcionar um descanso à fêmea, não a acasalando durante o período de aleitamento? As informações existentes, apenas esclarecem quanto ao padrão genético das linhagens, à hierarquia das colônias e recomendam o uso do método *Poiley*, como ferramenta para evitar a consangüinidade (De LUCA, et al.,1996; ANDRADE et al., 2002; MEZADRI,et al. 2004). Nas colônias heterogênicas, ou seja, não-endogâmicas, a estabilidade genética pode ser obtida a longo prazo pela manutenção de colônias fechadas mas evitando ao máximo a consangüinidade (FESTING, 1968, 1976). Para ratos, parece haver pouca informação publicada sobre a melhor duração para o período de criação (UFAW, 1987).

A necessidade de maximizar a produção de ratos, dentro dos novos conceitos de ética e nutrição animal, respeitando a biologia da espécie, porém usando técnicas de manejo que possibilitem aumentar a capacidade reprodutiva das fêmeas e um melhor desempenho das ninhadas, levaram a realização deste trabalho, que compreende mais três capítulos.

O capítulo II, denominado RESTRIÇÃO ALIMENTAR QUANTITATIVA EM RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*) NA FASE PRÉ-REPRODUTIVA E NO INÍCIO DA VIDA ÚTIL REPRODUTIVA, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista *Reproduction, Fertility and Development*.

O capítulo III (SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM RATAS WISTAR (*Rattus norvegicus*)) e IV (PRODUTIVIDADE DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*) EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO), se encontram de acordo com as normas de publicação da *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*.

Bibliografia:

ALCOCK, J. *Animal behavior: an evolutionary approach*. 5 ed. Sunderland: Sinouer Associates, 1993. 624p.

ANDERSEN, M.L; D'ALMEIDA; V.;KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES.L.E; TUFIK, S. *Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. 2004. 179p

ANDRADE, A e colaboradores, *Animais de Laboratório criação e experimentação*, Ed. FIOCRUZ, 2002.

ATOR, N. A. (1991). Subjects and instrumentation. In I. H. Iversen & K. A. Lattal (Eds.), *Techniques in the behavioral and neural sciences: Experimental analysis of behavior* (pp. 1–62). Amsterdam: Elsevier.

BARNETT, S. A. *The Story of Rats. Their Impact on Us, and Our Impact on Them* Ch. 2, 17–18 (Allen and Unwin, Crows Nest, Australia, 2002)

BAZOTTE, R.B. ,BATISTA, M.R., CURI, R., Meal-feeding scheme: twenty years of research in Brazil. *Breazillian Journal of Medical and Biological Research* (2000) 33: 985-991.

BERNARDI, F *Rev. Nutr.*, Campinas, 18(1):85-93, jan./fev., 2005

BOITI, C.(2004) Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive axis of rabbit does. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico) Sept.2004*, WRSA ed. , 186-206. <http://www.dcam.upv.es/8wrc/>.

CARLSON, A. J. & HOELTZEL, F. (1946) Apparent prolongation of the life span of rats by intermittent fasting. *J. Nutr.* 31: 363–375.

CELLA, F., GIORDANO, G., CORDERA, R. Serum leptine concentrations during the menstrual cycle in normal-weight women: effects of an oral triphasic estrogen-progestin medication. *European Journal of Endocrinology*, v.142, n.2, p.174-178, 2000

CHENEY, K. E., LIU, R. k., SMITH, G. S., LEUNG, R. E., MICKEY, M. R. & WALFORD R. L. (1980) Survival patterns in C57BL/6J mice subjected to undernutrition. *Exp. Gerontol.* 15: 237–258.

CHERKIN, A (1979) Letter to the editor. *Age* 2, 51.

CUTLER, RG (1982) Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis. In *Testing the Theories of Aging* (Adelman RC, Roth GS, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 25–114.

DUKES, H. *Fisiologia dos Animais Domésticos* 11^a Ed Guanabara Koogan 1996.

Editores Rosalia Regina de Lucca, Sandra Regina Alexandre, Thais Marques, Nívea Lopes de Souza, José Luiz Bernardino Merusse, Silvânia Peris Neves. Manual para Técnicos em Bioterismo. 2^a. Edição. São Paulo, WinnerGraph, 1996. 259 págs.

FOSTER, D.L., NAGATANI, S. Physiological Perspectives on Leptin as a Regulator of Reproduction: Role in timing Puberty. *Biology of Reproduction*. v. 60, p. 205-215, 1999

FREEMAN, M. E., 1988, The ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil & J. Neil (eds.), *Physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., New York, pp. 1893-1928.

GOODRICK, C. L., INGRAM, D. K., REYNOLDS, M. A., FREEMAN, J. R. & CIDER, N. (1990) Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech. Age. Dev.* 55: 69–87.

Guidelines for Breeding Genetically Engineered Mice at Memorial-Sloan Kettering Cancer Center at the Weill Medical College of Cornell University; Weil Liphann D.V.M., December 23, 2003.

Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research 2003. In: *Anesthesia and Analgesia* - Institute for Laboratory Animal Research, The National Academies Press 2003.

HANDBOOK OF RODENT AND RABBIT MEDICINE 1996, 1st edition, Edited by, Kathy Laber-Laird, M. Michael Swindle and Paul Flecknell – PERGAMON. Pág. 5.

HAYFLICK, L (1994) *How and Why We Age*. New York: Ballantine.

HOUSSAY, BA & MARTINEZ, D. (1947). Experimental diabetes and diet. *Science*, 105: 548-549.

HUBERT, M.-F., LAROQUE, P., GILLET, J.-P., and KEENAN, K.P. (2000). The effects of diet, ad libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicological Science*, 58, 195-207.

IWASAKI, K., GLEISTER, C. A., MASORO, E. J., McMAHAN, C. A., SEO, E.-J. & YU, B. P. (1988b) Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer Rats: the fat component and the mineral component. *J. Gerontol.* 43: B13–B21.

IWASAKI, K., GLEISTER, C. A., MASORO, E. J., McMAHAN, C. A & YU, B. P. (1988a) The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fischer rats. *J. Gerontol.* 43: B5–B12

KEMNITZ, J.W., GOY, R.W., FLITSCH, T.J., LOHMILLER, J.J., and ROBINSON, J.A. (1989). Obesity in male and female rhesus monkeys: Fat distribution, glucoregulation, and serum androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 69, 287-293.

KRISTAL, B. S. & YU, B. P. (1994) Aging and its modulation by dietary restriction. In: *Modulation of Aging Processes by Dietary Restriction* (Yu, B. P., ed.), pp. 1–36. CRC Press, Boca Raton, FL.

LANE, M.A., INGRAM, D.K., BALL, S.S., and ROTH, G.S. (1997). Dehydroepiandrosterone sulfate: A biomarker of primate aging slowed by calorie restriction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 2093-2096.

LANE, M.A., INGRAM, D.K., CUTLER, R.G., KNAPKA, J.J., BARNARD, D.E., and ROTH, G.S. (1992). Dietary restriction in non-human primates: Progress report on the NIA study. *Annals of New York Academy of Sciences*, 26, 36-45.

LEE CK, KLOPP, RG, WEINDRUCH, R & PROLLA, TA (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 285: 1390-1393.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* v. 73, p.255-260, 2001.

LONG, J. A. & EVANS, H. M., 1922, The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, 6: 1-148.

MAEDA, H., GLEISTER, C. A., MASORO, E. J., MURATA, I., McMAHAN, C. A. & Yu, B. P. (1985) Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: II pathology. *J. Gerontol.* 40: 671–688.

MANDL, A. M., 1951, The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*, 28: 576-584.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J. and TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, Nov. 2002, vol.62, no.4a, p.609-614. ISSN 1519-6984.

MARCONDES, F. K., MIGUEL, K., MELO, L. L. & SPADARI-BRATFISCH, R. C., 2001, Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, 74(4-5): 435-440.

MARTIN, G.B. Social-sexual signals and reproduction in mammals: an overview in: CURSO INTERNACIONAL SOBRE FEROMONAS Y BIOESTIMULACIÓN SEXUAL, Ciudad de México, 2002 [S.I.:s.n.], 2002. p 11-28.

McCAY, C. M., CROWELL, M. F. & MAYNARD, L. A. (1935) The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 10: 63–79.

McINERNEY, J.P. Animal welfare, economics and policy – report on a study undertaken for the Farm & Animal Health Economics Division of Defra, February 2004. Disponível em: <<http://www.defra.gov.uk/esg/reports/animalwelfare.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2004.

MEZADRI, T.J.; TOMÁZ, V.A.; AMARAL, V.L.L. Animais de Laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis, Editora da UFSC, 2004. 155P.

National Institute of Mental Health (2002). Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals: Report of a National Institutes of Health Workshop. Morrison AR; Evans HL; Ator NA; Nakamura RK (eds). NIH Publication No. 02-5083. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

NOLEN, GA. (1972) Effect of various restricted dietary regimens on the growth, health, and longevity of albino rats. *J. Nutr.* 102: 1477–1494.

PAPANICOLAOU, G. N. 1942. A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, 95:438-439.

PELTONIEMI, O. A. T.; TAST, A.; LOVE, R. J. Factors effecting reproduction in pig: seasonal effects and restricted feeding of the pregnant gilt and sow. *Animal Reproduction Science*. n. 60-61, p. 173-184. 2000.

RAPOSO, R.S. & SILVA, L. D. M. Quantitative comparison of different stains for vaginal smears in Saanen goats, *Ciência Animal* 1999, 9(2):81-85.

Rat Genome Sequencing Project Consortium, Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution , *Nature* 428, 493-521 (1 April 2004) | doi: 10.1038/nature 02426

REPRODUCTION AND BREEDING TECHNIQUES FOR LABORATORY ANIMALS. 1970. Edited by E. S.E. Hafez. Published by Lea & Febiger, Philadelphia.

RICHARD, E.J., KRISTIN, H.L. *Human Reproductive Biology* (2006), In: “The Menstrual Cycle” – Third Edition – ELSEVIER – Chapter Three – pag. 74.

ROSS, M. H. & BRAS, G. (1970) Food preference and length of life. *Science* 190: 165–167.

RUSSELL, W.M.S. and BURCH, R.L. The principles of humane experimental technique. London: Methuen. *Universities Federation for Animal Welfare (UFAW)*, Potters Bar, Herts, UK: England. Special edition, 1992: 238.

SAS INSTITUTE SAS/TAT *User's procedures guide*. Version 6.11, 4 ed. V.2, Cary: SAS Inst. Inc., p. 842, 2001.

SCHUTTE, A. P. 1967b. Canine vaginal cytology II – Cyclic changes. *J. Small Anim. Pract.*, 8:307-311.

SCHWARTZ, N. B., 1964, Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am. J. Physiol.*, 107: 1251-1259.

SESTI, L.A.C.; PASSOS Jr., H. Nutrição e reprodução d fêmea suína moderna. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO DE SUÍNOS, 1994, Expo Center Norte, São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo: CBNA, 1994. p.107-132.

SHORT, R.E.; STAIGMILLER, R.A.; BELLOWS, D.C. et al. Effects of suckling on postpartum reproduction. In.: FIELDS, M.J.; SAND, R.S. (Eds.) *Factores Affecting Calf Crop*. Boca Raton: CRC Press, 1994 p.179 – 187.

SILVA FILHO, A. R., Fresh Wet Mount in Pregnancy: Correlation with Pap Smears, *RBGO - v. 26, n° 7, 509-515, 2004.*

SOUZA, Sandra Lopes de; CASTRO, Raul Manhães de; NOGUEIRA, Maria Inês. Neonatal feeding behavior. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant., Recife, v. 3, n. 3, 2003*

SPORNITZ, U. M., SOCIN, C. D. & DAVID, A. A., 1999, Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anat. Rec., 254: 116-126.*

STUCKLIKOVA, E., JURICOVA-HORAKOVA, E. M. & DEYL, Z. (1975) New aspects of the dietary effect of life prolongation in rodents: what is the role of obesity in aging. *Exp. Gerontol. 10: 141–144.*

TANNENBAUM, A. (1945) The dependence of tumor formation on the composition of the calorie-restricted diet as well as on the degree of restriction. *Cancer Res. 5: 616–625.*

TERRY, K.K.; CHATMAN, LA.; FOLEY, GI.; KADYSZEWSKI, E.; FLEEMAN, TL.; HURTT, ME.; CHAPIN, RE. Effects of Feed Restriction on Fertility in Female Rats. *Birth Defects Research (Part B) 74:431–441 (2005)*

The Laboratory Rat. Edited by Mark A. Suckow, Steven H. Weisbroth and Craig L. Franklin – ELSEVIER – Chapter 6 – Reproduction And Breeding – Pág. 151).

The ethics of research involving animals, Chapter 12 – Reduction and Refinement, ISBN 1 904384 10 2 May 2005 - Published by Nuffield Council on Bioethics 28 Bedford Square London WC1B 3JS

TIMO-IARIA, C. Evolução histórica da experimentação animal em Medicina. Em *Residente de Cirurgia, capítulo 20*, ed. I.N.Novaes, J.B.Mello & P. Nahas, Roca, São Paulo SP 1992, cap.20:64-71.

TURTURRO, A., WITT, W. W., LEWIS, S., HASS, B. S., LIPMAN, R. D. & HART, R. W. (1999) Growth curves and survival characteristics of the animals used in the biomarkers of aging program. *J. Gerontol. 54A: B492–B501.*

ZHANG Y, PROENÇA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32.

WEINDRUCH, R. & WALFORD, R. (1988) The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction. Charles C. Thomas, St. Louis, MO.

WEINDRUCH, R. H. & WALFORD, R. L. (2000) Dietary restriction in mice beginning at one year of age: effects on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215: 1415–1418.

WHITTEN, W.K. 1956. Modification of the estrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *Journal of Endocrinology*, 13: 399-404. RICHARD, E. JONES, KRISTIN H. LOPEZ (Human Reproductive Biology – Third Edition — ELSEVIER – Chapter Three – In – “ In the Menstrual Cycle” pag. 74 .

WOLFENSONH, Sarah & LLOYD, Maggie. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare* 2a Ed. Blackwell Science 1998.

YOUNG, W. C., BOLING, J. L. & BLANDAU, R., 1941, The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec.*, 80: 37-45.

YU, B. P. (1996) Aging, oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 651–668.

CAPÍTULO II

Restrição alimentar quantitativa em ratas Wistar na fase pré-reprodutiva e no primeiro ciclo reprodutivo.

O que o bem-estar animal precisa é de pessoas educadas com cabeças frias e corações quentes preparados para ver o sofrimento dos animais e procurando meios práticos de aliviá-los.

Charles Hume

RESTRIÇÃO ALIMENTAR QUANTITATIVA EM RATAS *WISTAR* (*Rattus norvegicus*) NA FASE PRÉ-REPRODUTIVA E NO PRIMEIRO CICLO REPRODUTIVO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da restrição alimentar quantitativa nas fases pré e pós acasalamento, sobre o desempenho de ratas *Wistar* no primeiro ciclo reprodutivo. Três experimentos foram realizados, envolvendo um total de 220 fêmeas nulíparas. No Experimento 1, 60 fêmeas foram distribuídas em quatro grupos de acordo com a disponibilidade quantitativa de ração, 15 dias antes e 15 dias depois do acasalamento que ocorreu, sempre, aos 90 dias de idade. O primeiro grupo recebeu ração *ad libitum* dos 75 aos 105 dias de idade. O segundo, seguiu um programa de restrição alimentar quantitativo, recebendo 70% do consumo voluntário de ração no mesmo período. O terceiro, recebeu ração *ad libitum* até o acasalamento e foi submetido ao programa de restrição alimentar pós-acasalamento. O inverso ocorreu com o quarto grupo. No Experimento 2, 120 fêmeas foram distribuídas em quatro grupos e submetidas a programas de restrição alimentar quantitativa durante o período gestacional: R7 = restrição até o dia 7, R14 = restrição até o dia 14, R21 = restrição até o dia 21 e Controle = acesso irrestrito ao alimento. O terceiro experimento envolveu 40 fêmeas distribuídas em dois grupos: o Voluntário (V) recebeu a ração *ad libitum* e o outro Restrito (R), seguiu um programa de restrição alimentar quantitativo, durante os 15 dias que antecederam o acasalamento. As fêmeas dos dois grupos foram eutanasiadas no dia 7 de gestação para determinação da taxa de ovulação, contagem dos sítios de implantação e pesagem da gordura abdominal. No experimento 1, houve resultados favoráveis às fêmeas do grupo com consumo voluntário na fase pré-reprodutiva ($P < 0,05$) para as seguintes características: nascidos totais, peso nascidos, peso vivo da ninhada, nascidos vivos. No experimento 2 foi detectada diferença ($P < 0,05$) entre os grupos para o peso da fêmea aos 7, 14, 21 dias de prenhez e a desmama. O peso vivo médio da ninhada apresentou tendência ($P < 0,10$) de ser mais elevado no grupo R14. Não se detectou diferença entre os grupos para outras características de desempenho de ninhadas. No experimento 3, não houve diferença entre os grupos, para as características número de corpos lúteos, sítios de implantação e peso da gordura abdominal. A restrição alimentar quantitativa na fase pré-acasalamento não mostrou

efeitos favoráveis sobre o desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* no primeiro ciclo reprodutivo. Na fase pós-acasalamento, por não ter sido detectada diferença entre os grupos quanto ao desempenho reprodutivo, o efeito da restrição quantitativa pode ser considerado favorável, em relação aos custos do sistema de produção. Em estudos futuros sugere-se aperfeiçoar o manejo alimentar de tal forma que, as fêmeas submetidas à restrição, recebam ração parcelada em mais de uma porção diária e que se controle o consumo logo após o período de restrição, evitando o consumo compensatório.

Palavras chave: Restrição alimentar, Rata, Wistar, Corpo lúteo, Reprodução.

QUANTITATIVE FEED RESTRICTION IN WISTAR FEMALE (*Rattus norvegicus*)
IN THE PRE-REPRODUCTIVE PHASE AND IN THE FIRST REPRODUCTIVE
CYCLE

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effects of a quantitative feed restriction in the pre and post mating phases on the performance of *Wistar* female rats in the first reproductive cycle. Three experiments were carried out involving a total of 220 young females. In the first experiment, 60 females were assigned to one of four groups according to the availability of feed 15 days before and 15 days after mating, which occurred at 90 days of age in all cases. The first group had free access to feed from 75 to 105 days of age. The second group followed a quantitative feed restriction program receiving 70% of the voluntary feed intake in the same period. The third group had free access to feed until mating and was submitted to the feed restriction program afterwards. The opposite occurred with the fourth group. In experiment 2, 120 females were assigned to one of four groups: a control which had free access to feed during gestation or three groups submitted to quantitative feed restriction programs. R7: from day 1 up to day 7; R14: from day 1 up to day 14; R21: from day 1 up to day 21. The third experiment involved 40 females assigned to one of two groups: a control group which had free access to feed or a treatment group which followed a quantitative feed restriction program during the 15 days that preceded mating. The females were euthanized on day 7 of gestation when the ovulation and implantation rates as well as the abdominal fat weight were determined. In the first experiment, females from the voluntary intake group showed superior performance ($P<0.05$) regarding total number born, born alive and litter birth weight. In the second experiment body weights of females on days 7, 14 and 21 of gestation and at weaning differed ($P<0.05$) among groups. Feed consumption also differed among groups ($P<0.05$) in the three weeks of gestation. The mean litter birth weight tended ($P<0.10$) to be higher in the R14 group. No further differences among groups were detected for litter performance traits. In The third experiment, no difference was detected between groups for the ovulation rate, number of implantation sites and abdominal fat weight. The quantitative feed restriction

program in the pre-reproductive phase did not show favorable effects on the performance of *Wistar* females in the first reproductive cycle. Post mating quantitative feed restriction was considered favorable relative to feed costs, because no differences among groups were observed regarding reproductive performance. In future studies feeding management should be improved such that females submitted to quantitative feed restriction receive more than one meal per day and also that feed availability be controlled right after the restriction period in order to avoid over feeding.

Key words: Feed restriction, *Wistar* female, corpora lutea, production.

Introdução

Em 1914 Osborne e Mendel desenvolveram estudos de nutrição utilizando o rato como modelo. O rato é um animal onívoro de fácil adaptabilidade a dietas diversas. Donaldson, em 1924, elegeu o rato excelente modelo experimental, ressaltando as muitas similaridades entre esta espécie e o homem, do ponto de vista da pesquisa biológica, afirmando que: “o rato tem os mesmos hábitos alimentares” e “em algumas situações, resguardando-se as devidas relações de idade, os resultados obtidos com um, podem ser transferidos, muito precisamente, para o outro...”.

Recentemente, o desenvolvimento de diversas linhagens com características específicas, como o caso das linhagens SHR e Zucker, sendo a primeira, um modelo para o estudo da hipertensão e a segunda, usada para o estudo do diabetes, facilita o estudo destas doenças (Nutrient Requirements of Laboratory Animals, (NRC), 1995). O impacto da dieta na nutrição humana e seu papel na qualidade de vida, constituem tema de especial interesse de diversas áreas da pesquisa científica. Nesse contexto, a restrição energética vem-se destacando pelo reconhecido efeito positivo sobre a longevidade. Experimentos demonstraram que, muitas espécies são mais saudáveis e, conseqüentemente, vivem mais tempo, se não lhes permitirem tornar-se obesas (Kemnitz *et al.*, 1989, Ator, 1991; Lane *et al.*, 1992, 1997; Turturro *et al.*, 1999). Ratos submetidos à restrição alimentar quantitativa suficiente para causar redução de 25% no peso corporal, comparados àqueles controles, alimentados *ad libitum*, vivem mais tempo sem prejuízo de crescimento ou de índices da rotina clínica de saúde (Hubert *et al.*, 2000).

O crescimento e o desempenho reprodutivo são dois indicadores chaves da adequação dietética. É importante que os investigadores de animais de laboratório, estejam atentos não só ao ganho de peso, mas, principalmente, à curva de crescimento e à reprodução destes animais. O grande número de linhagens e de genótipos diferentes, não possibilita descrever um único padrão para o crescimento ou desempenho reprodutivo aplicável a todos os ratos do laboratório. Poiley (1972) resumiu ganhos de peso do nascimento a aproximadamente, 24 semanas de idade, para 18 linhagens endogâmicas (*inbred*) e 3 linhagens de ratos não endogâmicas (*outbred*). Apesar do rato

ser um excelente modelo para os estudos de nutrição, não se encontra na literatura nacional disponível no que diz respeito aos dados de produção, ou seja, ele é utilizado como meio para estudos nutricionais específicos, como por exemplo, avaliar a ação de uma droga no consumo alimentar, e não como instrumento de pesquisa para avaliar seu próprio desenvolvimento, diante destes novos conceitos de restrição alimentar.

A linhagem *Wistar* foi a primeira a ter suas características definidas em 1915, quando da publicação do livro *The Rat*. Atualmente é a mais utilizada nos protocolos de estudos nacionais, conseqüentemente, a mais produzida nos biotérios do Brasil.

A hipótese deste experimento foi de que: ratas que são arraçadas *ad libitum* com rações de alta densidade nutricional desde o nascimento, e acasaladas aos 90 dias de idade, viessem a comprometer seu desempenho reprodutivo a partir da primeira parição.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição alimentar quantitativa sobre o desempenho reprodutivo de ratas *Wistar*, na fase pré-reprodutiva e no início de sua vida útil reprodutiva.

Material e Métodos

Local, instalações e manejo geral

O experimento foi realizado no Setor de Ratos *Wistar*, do Biotério Central do Instituto Butantan – SP. As salas dos animais apresentam fluxo de pessoas e insumos definido, são protegidas com barreiras sanitárias (autoclave de barreira, sistema de filtração de ar, diferencial de pressão) e a temperatura ambiente é controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Há sistema de exaustão na altura das gaiolas, impedindo a dispersão da amônia no ambiente, 15 a 20 trocas de ar/h e ciclo de luz definido (12L:12E). A distribuição das gaiolas nas prateleiras das estantes, foi igual entre os grupos. Todo o sistema é ligado a um gerador, que garante a manutenção de seu funcionamento em caso de falta de energia elétrica.

O modelo biológico, foi Rato *Wistar*, oriundo da colônia de multiplicação do Setor de Ratos do Biotério Central do Instituto Butantan, cujos animais são de padrão sanitário controlado. Os utilizados nos experimentos, descritos a seguir, foram mantidos em gaiolas de polipropileno, medindo 46 x 31 x 21 cm, que permitiram livre acesso à água potável e à ração. As gaiolas foram forradas com cama de maravalha autoclavada.

A rotina de manejo dos animais compreendeu: três trocas semanais das gaiolas e água fresca três vezes por semana. A ração utilizada foi, comercial, peletizada, Nuvital[®], com os seguintes níveis de garantia: proteína bruta mínima de 22%, matéria fibrosa máxima de 8%, umidade máxima de 12,5%, extrato etéreo mínimo de 4%, material mineral máximo de 10%, cálcio máximo de 1,4% e fósforo mínimo de 0,8%. Apresentou a seguinte composição básica: Carbonato de cálcico, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos. A formulação, segundo o fabricante, obedece às recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA, própria à espécie. Esta ração foi oferecida *ad libitum*, com exceção aos animais submetidos à restrição.

Este estudo foi dividido em quatro etapas:

- 1 *Pré-experimento*, determinação do consumo voluntário das fêmeas e definição do percentual de restrição a ser utilizado.
- 2 *Restrição Pré e Pós Acasalamento*.
- 3 *Restrição Pós Acasalamento e*
- 4 *Restrição Pré-acasalamento* visando determinação da taxa ovulatória (Contagem de Corpos Lúteos) e taxa de implantação.

Pré-experimento: Determinação do consumo voluntário.

O Pré-experimento foi desenvolvido durante o período de 90 dias. Iniciou-se quando as fêmeas estavam com 45 dias de idade e perdurou até o desmame dos seus filhotes. Cinco fêmeas com 45 dias de idade foram mantidas em gaiolas individuais, recebendo ração Nuvital[®], *ad libitum*. Semanalmente, pesava-se a ração oferecida, as sobras e os animais, estabelecendo o consumo médio semanal de ração (Tabela 1). Aos 90 dias de idade, todas as fêmeas foram acasaladas monogamicamente com machos, comprovadamente, férteis.

Para determinar a intensidade de restrição alimentar a ser empregada nos experimentos subsequentes, foi realizado um levantamento bibliográfico, onde se observou que os poucos estudos com restrição quantitativa adotaram o índice de 30% de restrição (Oliveira *et al.*, 2000). Com base nestes achados, 10 fêmeas foram mantidas até 60 dias de idade em gaiolas individuais. Após esta idade, foram distribuídas em dois grupos de cinco fêmeas cada. Um grupo, recebeu 60% da quantidade de ração

consumida no pré-experimento e o segundo grupo, recebeu alimentação *ad libitum* (Figura 1). Fundamentado nos resultados encontrados com a restrição de 40%, onde houve uma diferença de peso média de 78,52g (32,5%) em relação ao grupo controle e fuga de um animal em busca de alimento. Considerando-se também que os experimentos seriam levados até o parto, julgou-se o nível de 40% de restrição excessivo, optou-se por trabalhar com o índice de restrição de 30%, adotado nos estudos citados anteriormente. No entanto, este nível de restrição foi ajustado, semanalmente, levando em conta, o estado fisiológico da fêmea, de acordo com os resultados do pré-experimento.

Experimento 1: Restrição pré e pós-acasalamento

Prevendo-se trabalhar com quatro grupos de, no mínimo 12 animais cada, produziram-se 60 fêmeas. Todas nasceram na mesma data e foram mantidas em ninhadas de oito filhotes, desde o nascimento até a desmama, que ocorreu aos 21 dias de idade. Após o desmame, foram distribuídas em grupos homossexuais de cinco fêmeas por gaiola, até 75 dias. A partir desta idade, já alojadas em gaiolas individuais, 56 fêmeas foram distribuídas em quatro grupos de acordo com a disponibilidade quantitativa de ração nos 15 dias que antecederam, e nos 15 dias que sucederam ao acasalamento. Este ocorreu, sempre, aos 90 dias de idade.

O primeiro grupo (VV) recebeu ração *ad libitum* nos dois períodos, ou seja, quinze dias antes do acasalamento e, também, do acasalamento até 105 dias de idade. O segundo grupo (RR) seguiu um programa de restrição alimentar quantitativo, recebendo 70% do consumo voluntário de ração nos dois períodos. O terceiro grupo (VR) recebeu ração *ad libitum* até o acasalamento e foi submetido ao programa de restrição alimentar pós-acasalamento. O inverso ocorreu com o quarto grupo (RV). Com base no pré-experimento, foram oferecidos 70% do consumo voluntário semanal, para cada fêmea (Tabela 1). A ração semanal total oferecida a cada fêmea foi dividida em sete porções. Semanalmente foram pesadas todas as fêmeas, a ração e as sobras. Calculando-se por diferença o consumo semanal.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2 X 2 (restrição pré x pós-acasalamento) e o efeito do tratamento, foi investigado sobre as

seguintes características reprodutivas: duração da gestação, peso da fêmea ao parto, nascidos totais, peso total da ninhada, nascidos vivos, peso médio da ninhada ao nascer, peso médio dos nascidos vivos por ninhada e taxa de parição. Os pesos vivos semanais das fêmeas foram considerados como medidas repetidas, portanto, as semanas foram tratadas como sub-parcelas. As taxas de parição foram analisadas pelo teste de qui-quadrado.

Aos 90 dias de idade, todas as fêmeas foram submetidas à coleta da secreção vaginal, pelo método de esfregaço, para identificar a fase do ciclo estral em que se encontravam. Esta foi considerada a primeira leitura, antes da cópula. Durante uma semana, sempre no início do período escuro (18:00 h), as fêmeas foram encaminhadas à gaiola de um macho comprovadamente fértil, tendo, previamente, a ração retirada, no caso de receber uma fêmea em restrição alimentar. No início do período claro (07:00 h), as fêmeas foram retiradas das gaiolas de machos e, antes de regressarem à sua gaiola de origem, procedeu-se a segunda leitura da secreção vaginal, realizada para a determinação da fase do ciclo estral e identificação da presença de espermatozóides. Caso fosse detectada a presença de espermatozóides a fêmea não era mais conduzida à gaiola do macho. Foi obedecida a mesma formação dos casais durante todo o período de acasalamento. Após as coletas, procedeu-se à leitura das lâminas a fresco.

Experimento 2: Restrição pós-acasalamento

Cento e vinte fêmeas foram produzidas e o mesmo procedimento de manejo geral foi seguido nesta nova etapa. Aos noventa dias de idade (dia 1) todas as fêmeas foram alojadas individualmente e acasaladas com machos, comprovadamente, férteis ao final do dia, por volta das (17:00 h), permanecendo, nesta composição, durante uma semana. A partir do dia 2 e, sempre no início do período claro (07:00 h), a secreção vaginal foi coletada de cada fêmea para a determinação da fase do ciclo estral e identificação da presença de espermatozóides. Procedida a leitura diária de todas as lâminas, aquelas em cuja secreção vaginal se registrava a presença de espermatozóides, foram, aleatoriamente, classificadas em quatro grupos: Controle (fornecimento de alimento *ad libitum* por toda gestação), R7 (restrição alimentar durante os 7 primeiros dias de prenhez), R14 (restrição alimentar durante os 14 primeiros dias de prenhez), R21 (restrição alimentar durante os 21 dias de prenhez). Imediatamente após o sorteio

diário, as fêmeas foram separadas dos machos, inseridas no seu grupo de restrição e então o tratamento foi iniciado. Diariamente, o sorteio dos grupos se iniciou pelo grupo que obteve o menor número de fêmeas no dia anterior e, ao final da semana (7 dias), as fêmeas que não apresentaram espermatozoides na secreção vaginal, foram descartadas do experimento. Após os dias estabelecidos para a restrição, elas voltaram à alimentação *ad libitum*. Durante todo período de restrição alimentar, o fornecimento de água sempre foi *ad libitum*. O efeito dos tratamentos foi investigado sobre as seguintes características reprodutivas: nascidos totais, peso total da ninhada, nascidos vivos, peso médio da ninhada ao nascer, peso médio dos nascidos vivos por ninhada e o peso da fêmea ao acasalamento, ao parto e a desmama dos filhotes.

Nesta etapa do estudo a ração utilizada foi peletizada, comercial, Agroceres[®], devido a mudanças de fornecedor na instituição, um fator que, infelizmente, ocorre nos biotérios nacionais. Esta nova ração apresenta os níveis de garantia semelhantes à usada anteriormente: proteína bruta mínima de 22%, matéria fibrosa máxima de 9%, umidade máxima de 12,5%, extrato etéreo mínimo de 3%, material mineral máximo de 10%, cálcio máximo de 1,4% e fósforo mínimo de 0,6%, apresentando a seguinte composição básica: Carbonato de cálcio, aditivo antioxidante, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, 01-metionina, L-lisina HCl, milho integral moído, farelo de trigo, farelo de soja, premix mineral vitamínico. A formulação, de acordo com os fabricantes, obedeceu às recomendações do National Research Council, (NRC), e National Institute of Health, (NIH), – USA.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado. Uma análise preliminar conjunta foi conduzida com todos os pesos das fêmeas. Nesta análise, cada rata foi considerada como parcela principal e os pesos semanais, como medidas repetidas. Foi empregado o procedimento MIXED do SAS (2001). Esta análise revelou efeito da interação tratamento x semana ($P < 0,05$) sobre a variável estudada. Nova análise de variância foi realizada usando o procedimento GLM do SAS (2001), para o peso a cada semana, incluindo, no modelo, apenas o efeito fixo de tratamento. As médias dos pesos semanais de cada um dos tratamentos foram confrontadas às do grupo controle através de contrastes pré-planejados.

Experimento 3: Efeito da restrição alimentar pré-acasalamento sobre a taxa ovulatória e número de sítios de implantação

Os animais foram produzidos e mantidos durante o período de restrição alimentar até a confirmação da prenhez, no mesmo ambiente dos demais animais, ou seja, no Setor de Ratos *Wistar*, do Biotério Central do Instituto Butantan – SP. Os procedimentos para a determinação da taxa ovulatória (contagem dos corpos lúteos) e dos sítios de implantação foram realizados no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

Produziram-se 40 fêmeas, prevendo-se possíveis perdas pré-experimentais; o manejo geral foi idêntico ao adotado nos experimentos anteriores. Aos 75 dias de idade foram alojadas em gaiolas individuais e submetidas a dois tratamentos diferentes. Um grupo denominado Voluntário (V) composto por 20 fêmeas, continuou a receber a ração *ad libitum*. O outro grupo, também composto de 20 fêmeas, denominado Restrito (R) seguiu um programa de restrição alimentar quantitativo, recebendo 70% do consumo voluntário de ração. O fornecimento de ração foi ajustado semanalmente com base no experimento piloto, oferecido em uma porção diária pela manhã. O programa de restrição foi encerrado ao acasalamento, que, ocorreu aos 90 dias de idade. As fêmeas foram pesadas ao acasalamento, semanalmente e no dia da eutanásia.

A partir dos 90 dias de idade e durante uma semana, ininterruptamente, cada fêmea recebeu, em sua gaiola, um macho comprovadamente fértil. Neste período, colheu-se, diariamente, a secreção vaginal, pela manhã, para identificação da presença de espermatozóides. Foi obedecida a mesma formação dos casais durante todo o período de acasalamento. Após as colheitas, procedeu-se à leitura das lâminas a fresco. Considerou-se como o dia 1 de prenhez, a data da primeira leitura sendo encontrados espermatozóides na secreção vaginal. No dia 7 de prenhez, as fêmeas foram eutanasiadas para a contagem dos corpos lúteos e dos sítios de implantação.

Os animais foram eutanasiados com overdose de pentobarbital sódico e fixados em placas de parafina, com a ajuda de fita crepe e agulha. Após a constatação da cessação dos sinais vitais, realizou-se uma incisão mediana mento-púbica e ressecção de todos os planos da parede do abdômen. Foi retirado todo o aparelho reprodutor e acondicionado em placa de petri previamente, identificada com o número do animal e com as letras E e D, significando lado esquerdo e lado direito respectivamente (Figura

2). Após a retirada, do aparelho reprodutor, foi coletada e pesada a gordura da cavidade abdominal em balança de precisão. Os ovários foram separados do útero e, com a ajuda de microscópio estereoscópio modelo *Technival*, e de uma pinça, realizou-se a contagem dos corpos lúteos do ovário direito e esquerdo de cada fêmea (Figura 3), que somados, corresponderam à taxa de ovulação. A contagem dos sítios de implantação foi realizada a olho nu (Figura 4), por, pelo menos, duas pessoas e, posteriormente, confirmada com o auxílio do microscópio.

O delineamento foi inteiramente casualizado. Uma análise preliminar conjunta foi conduzida com todos os pesos das fêmeas, empregando-se o procedimento MIXED do SAS (2001). Esta análise preliminar revelou efeito ($P < 0,05$) da interação tratamento x semana sobre peso. Novas análises de variância foram conduzidas usando o procedimento GLM do SAS (2001) para o peso a cada semana, bem como, para taxa ovulatória e número de embriões implantados, incluindo no modelo, somente o efeito fixo de tratamento.

Resultados

No experimento 1, (*Restrição pré e pós acasalamento*) o peso médio inicial das fêmeas por tratamento não apresentou diferença ($P > 0,05$), portanto, a amostra foi considerada homogênea. Quando analisamos o peso vivo ao longo das quatro semanas, observamos que o grupo RR manteve o peso (peso inicial 224,32g e peso na quarta semana 224,95g) (Figura 5). Já o grupo RV, ao final do período de restrição, apresentava peso de 218,45g. Porém, quando passou ao consumo voluntário, apresentou peso extremamente ascendente, alcançando na quarta semana 286,43g, valor semelhante ao atingido pelo grupo VV (286,06g) para o mesmo período.

Não foi detectado efeito da interação restrição pré e pós acasalamento ($P > 0,05$) sobre as características reprodutivas. O número de nascidos totais, nascidos vivos por ninhada, peso total da ninhada e peso de nascidos vivos, foram mais elevados no grupo voluntário, em relação ao que foi submetido à restrição na fase pré-acasalamento (Tabela 2). A restrição alimentar pós-acasalamento não apresentou efeito sobre as características de ninhada estudadas (Tabela 2).

Tonete (1983), trabalhando com restrição quantitativa e qualitativa, uma ração com apenas 1% de proteína, encontrou resultados semelhantes aos do experimento pré e

pós, especificamente, na fase pós para a característica peso dos nascidos. Isso quando trabalhou com restrição na primeira metade da prenhez.

A taxa de parição no grupo VV foi 92,86%, no grupo RR 78,57%, enquanto de 71,47% nos outros dois grupos VR e RV, mas, não se detectou diferença entre os quatro grupos pelo teste de qui-quadrado. Apesar de vários autores (Cherkin, 1979; Hayflick, 1994; Cutler, 1982), destacarem a restrição alimentar por seu reconhecido efeito sobre a longevidade, no que se refere ao desempenho reprodutivo, na fase pré-acasalamento, obteve-se melhores resultados com o consumo voluntário. Caso houvesse interesse em se reduzir o número de filhotes nascidos com o intuito de reduzir a eliminação de filhotes em excesso de 8, poder-se-ia adotar um programa de restrição alimentar quantitativa pré-acasalamento. No entanto, devido à preferência dos pesquisadores por ratos machos, não há interesse em se reduzir o tamanho das ninhadas ao nascer.

No experimento 2, (*Restrição pós-acasalamento*), a análise estatística preliminar revelou efeito da interação tratamento x semana ($P < 0,01$), para o peso vivo das fêmeas (Tabela 3 e Figura 6). Portanto, novas análises foram conduzidas para peso a cada semana. O peso corporal inicial das ratas ao acasalamento, não diferiu, portanto, a amostra foi considerada homogênea ($P > 0,05$). A evolução do peso corporal das ratas, durante a prenhez, mostrou valores diferentes entre os grupos nos dias 7, 14, ao parto, e a desmama (Figura 6). Para a variável peso da fêmea aos 7 dias de gestação, houve diferença entre grupos R7, R14 e R21 em relação ao controle. No peso das fêmeas aos 14 dias de prenhez, os grupos R14 e R21 diferiram do controle. E no momento do parto, apenas o grupo R21 diferiu do grupo controle. Conforme esperado a variável consumo no dia 7 de prenhez, registrou-se diferença entre os grupos R7, R14 e R21 em relação ao grupo controle (Figura 7). No dia 14 de gestação os grupos R7, R14 e R21 mantiveram a diferença em relação ao grupo controle. No dia 21 de gestação, ou seja, ao parto, os grupos R14 e R21 diferiram do grupo controle, enquanto o R7 não. Estes resultados confirmam a eficácia do programa de restrição adotado.

Cabe comentar que neste estudo, apenas no grupo R7, registrou-se um caso de natimortalidade da ninhada. E que o número de fêmeas que registraram prenhez positiva, (presença de espermatozóide na secreção vaginal) e que não pariram, foi, praticamente, igual para todos os grupos: 2 fêmeas em cada grupo restrito e uma fêmea no grupo controle. Ao comparar as características reprodutivas avaliadas nesta fase

(Tabela 4), não se detectou diferença ($P > 0,05$) entre os grupos. O peso médio vivo da ninhada apresentou tendência de ser mais elevado no grupo R14 ($P = 0,0629$).

Para o terceiro experimento, foram produzidas, inicialmente, quarenta fêmeas, que foram distribuídas em dois grupos voluntário ($n=20$) e restrito ($n=20$), cujos pesos antes do início do período de restrição (75 dias de idade) não diferiam ($P = 0,1719$). Porém, ao acasalamento, ou seja, após a leitura da secreção vaginal e identificação de espermatozóides, as fêmeas selecionadas, agora 10, para cada grupo, apresentaram diferença no peso ($P < 0,0456$) favorecendo o grupo voluntário (Figura 8). Houve interação tratamento x semana sobre o peso, portanto como já mencionado, as análises foram procedidas separadamente para cada semana. As características taxa de ovulação número total de sítios de implantação não diferiram entre os tratamentos (Tabela 5).

Discussão

Ao final dos experimentos, ou seja, das três etapas, aferindo o consumo das fêmeas alimentadas *ad libitum*, e calculando por diferença o consumo das fêmeas submetidas à restrição, verificamos ter sido alcançada uma intensidade de restrição alimentar média de 30,19%.

Quando se avaliou a restrição alimentar nas fases pré- e pós-acasalamento, a taxa de parição foi maior no tratamento VV (93%) em relação aos demais grupos. Inicialmente, este achado sinaliza melhor resposta reprodutiva para as fêmeas de consumo voluntário. Porém, o grupo RR apresentou um taxa de parição superior aos grupos VR e RV. Quanto ao desempenho de ninhadas, encontramos diferenças significativas para as características: nascidos totais, peso dos nascidos, peso vivo e nascidos vivos, mais uma vez, favorecendo o consumo voluntário na fase pré-acasalamento. Estes achados devem ocorrer devido à mobilização de reservas corporais para a manutenção, visto que, ocorreu diminuição do seu peso corporal e menor disponibilidade de nutrientes para a ninhada que está sendo gerada.

Terry et al. (2005), submeteram ratas a um programa de restrição alimentar que iniciando 14 dias antes do acasalamento e perdurou até o dia 7 de gestação. O programa consistia em fornecer 7,5 g, 10 g, 15 g, 20 g diários de ração ou acesso irrestrito à ração, (grupo controle) durante todo o período estudado. É fácil aceitar que nesta condição os animais do grupo que receberam 7,5 g apresentaram uma queda acentuada no estado clínico geral, tão forte que todo o grupo foi eutanasiado. O grupo que recebeu 10 g

(n=20), apenas 13 animais, conseguiram prosseguir no estudo, os demais tiveram, também, que ser eutanasiados. No início deste experimento, a média de consumo *ad libitum* das fêmeas do grupo controle era de $20,4 \pm 2,3$ g e a idade inicial de aproximadamente 60 dias. O grupo que recebeu 10 g, apresentou baixo número de corpos lúteos, implantações e implantações viáveis, ($P < 0,05$) em relação aos grupos *ad libitum* e ao grupo que recebeu 20 g. Não foi analisado o desempenho de ninhadas, apenas parâmetros de fertilidade da fêmea. No nosso estudo, apesar de não submetemos as fêmeas a níveis tão altos de restrição e iniciarmos com uma idade de 75 dias, também encontramos melhores respostas com o consumo *ad libitum*.

Gurmini et al, (2005) trabalharam com restrição alimentar em ratas, durante toda a gestação, usando intensidade de restrição de 50% em relação ao consumo voluntário. Detectaram valores maiores ($P < 0,05$) para o peso final das fêmeas, ganho de peso das fêmeas e peso ao nascimento dos filhotes no grupo controle. Porém, as características número de filhotes e peso da ninhada, apresentaram valores menores, para o grupo restrito. Resultados que se assemelham aos encontrados no nosso estudo na fase pós-acasalamento.

Na espécie bovina foram desenvolvidos trabalhos de restrição alimentar em raças com aptidão para produção de carne e para produção de leite. Santos (2005), trabalhando com vacas holandesas não lactantes, mantidas em pastagem e recebendo quantidades diferentes de concentrado, com dois fornecimentos diários, observou que; as vacas que recebiam 8 kg de concentrado por dia, apresentaram menor concentração plasmática de progesterona 4 e 12 horas após a ingestão do mesmo, do que aquelas que receberam 2 kg. Esses resultados estão de acordo com Rabiee et al. (2001), Pescara et al.(2005) e Hommeida et al.(2004), também constataram que o aumento da ingestão de matéria seca, reduziu as concentrações de progesterona em vacas. Vasconcelos et al.(2003), parcelando a dieta em 4 refeições em um período de 24 horas (25% desta a cada 6 horas) não observaram diminuição na concentração plasmática de progesterona. Estes resultados indicam que, em vacas, o fornecimento da dieta fracionada atua, evitando a diminuição da concentração plasmática de progesterona.

Embasados nestes dados, podemos sugerir que os animais envolvidos neste estudo que dispuseram do alimento à vontade, (e que naturalmente têm o hábito de se alimentar várias vezes durante o dia), podem ter apresentado concentração plasmática

de progesterona diferente daqueles restritos, que, quando, recebiam a sua cota diária de alimento, consumiam tudo imediatamente. Podemos sugerir que a elevação do clearance da progesterona plasmática, decorrente da forma de alimentação, pode afetar a implantação e a manutenção da prenhez da rata.

Os estudos de restrição alimentar quantitativa, ou mesmo qualitativa, desenvolvidos em ratos, não têm os mesmos objetivos daqueles desenvolvidos com os animais de produção. Assim, não visam o melhor desempenho reprodutivo do animal. Quase sempre são executados para gerar informação que auxilie na dissociação dos efeitos secundários do ganho de peso corporal, aumentado ou diminuído, durante um determinado período, daqueles que devem estar diretamente relacionados à exposição de drogas farmacológicas. Não é muito raro, os autores citarem que apesar da restrição, os animais não chegaram à anorexia.

Fleeman et al. (2005), não detectaram efeito de tratamento sobre a viabilidade fetal, restringindo ratas durante o período de 6 a 17 dias de gestação, porém, registraram diferença significativa no peso da fêmea. Estes autores afirmaram, embasados em estudos anteriores, que ratas prenhes, no estágio da organogênese, foram menos sensíveis à restrição alimentar do que ratas não prenhes. O ganho de peso pós-restrição, no presente estudo, parece estar relacionado a um ganho compensatório, visto que, o consumo neste período foi de 28,01g a mais que o consumo do grupo *ad libitum*. Arrigoni et al. (1998), trabalhando com bovinos inteiros oriundos do cruzamento Simental x Nelore, concluíram que a restrição alimentar permitiu explorar o ganho compensatório, resultando em melhor conversão alimentar, graças à diminuição das necessidades de manutenção. É importante considerar que, à medida que a maturidade fisiológica do animal se aproxima, diminui a taxa de deposição de massa muscular e aumenta a de gordura.

Não se detectou diferença nas taxas ovulatórias e no número de sítios de implantação entre fêmeas submetidas à restrição pré-acasalamento e as do grupo controle. Os resultados sugerem haver diferença no número de corpos lúteos entre os ovários (dados não apresentados), apesar deste aspecto não ter sido analisado estatisticamente. Uma outra observação pertinente, é a taxa de parição que foi 100% no grupo voluntário e 85% para o grupo submetido à restrição alimentar.

Nas três etapas do trabalho, percebe-se que o grupo voluntário apresentou melhor desempenho. Esses resultados devem considerar alguns pontos como: a idade das fêmeas, pois, mesmo nas etapas de pré-acasalamento, as fêmeas já haviam atingido pleno desenvolvimento e maturidade sexual. Outro fator que devemos considerar é que, apesar do consumo voluntário não fugir do pré-planejado, ou seja, ao final dos experimentos foi aferida uma intensidade de restrição de 30,19%, houve um consumo compensatório após os períodos de restrição. A forma de administração diária da ração em cota única, também pode ter interferido no nível de progesterona no grupo restrito. Estudos mostram que a leptina tem participação importante na função ovariana em mamíferos. A leptina do tecido adiposo parece enviar um sinal para o sistema reprodutivo, indicando se reservas de energia adequadas estão disponíveis (Swain et al., 2004).

Por fim, deve-se observar a condição ambiental, visto que alguns autores, (Dobson, et al.2003, Cwikela et al 2004, Terry et al.2005) afirmam haver interação reprodução-estresse. Neste estudo, em particular, as condições de bem estar animal, foram garantidas em todos os experimentos. Um fator que não foi objeto de estudo, mas que, ao final do trabalho e diante dos resultados encontrados, deve ser considerado, é o fator econômico. Há evidência de que, a restrição alimentar quantitativa até o dia 14 de gestação resultaria em economia de ração e, portanto, redução dos custos de produção, sem influenciar o desempenho da fêmea no primeiro ciclo reprodutivo.

Conclusão

A restrição alimentar quantitativa na fase pré-acasalamento não mostrou efeitos favoráveis no desempenho reprodutivo de ratas *Wistar*. Na fase pós-acasalamento, no primeiro ciclo reprodutivo, por não ter sido detectado diferença sobre o desempenho reprodutivo, o efeito pode ser considerado favorável, em relação aos custos do sistema de produção.

Sugere-se a realização de novos experimentos onde a oferta da ração seja parcelada e o consumo pós-restrição controlado, para evitar o sobre consumo. Estas mudanças talvez, possam levar a resultados diferentes daqueles encontrados no presente estudo.

Bibliografia:

ARRIGONI, M.D.B.; VIEIRA, P. de F.; SILVEIRA, A.C.; FURLAN, L.R.; DAL PAI, V.; COSTA, C.; CHARDULO, L.A.L.; OLIVEIRA, H.N. de. Estudo dos efeitos da restrição alimentar nas características das fibras musculares de bovinos jovens confinados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, p.1121-1127, 1998.

ATOR, N. A. (1991). Subjects and instrumentation. In I. H. Iversen & K. A. Lattal (Eds.), *Techniques in the behavioral and neural sciences: Experimental analysis of behavior* (pp. 1–62). Amsterdam: Elsevier.

CHERKIN, A (1979) Letter to the editor. *Age* 2, 51

CUTLER, RG (1982) Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis. In *Testing the Theories of Aging* (Adelman RC, Roth GS, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 25–114.

CWIKEL, J.; GIDRON, Y.; SHEINER, E.. 2004. Psychological interactions with infertility among women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 117: 126–131.

DOBSON, H.; GHUMAN, S.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R.; 2003. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 125:151–163.

DONALDSON, HH. The rat: data and references tables for the Albino rat (*mus norvegicus albinus*) and the Norway rat (*mus norvegicus*). 2ed. Philadelphia; 1924. p 1-33.

FLEEMAN, T.L.; CAPPON, G.D.; CHAPIN, R.E.; HURTT, M.E.. Effects of Feed Restriction During Organogenesis on Embryo-Fetal Development in the Rat, *Birth Defects Research (Part B)* 74:442–449 (2005).

GURMINI, J.; CECÍLIO, W.A.C.; SCHULER, S.L.; OLANDOSKI, M.; NORONHA, L.. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 4, p. 271-8, agosto 2005.

HAYFLICK, L (1994) *How and Why We Age*. New York: Ballantine.

HOMMEIDA, A., NAKAO, T., KUBOTA, H. Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology*, v. 62, p. 217-225, 2004.

HUBERT, M.-F., LAROQUE, P., GILLET, J.-P., and KEENAN, K.P. (2000). The effects of diet, ad libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicological Science*, 58, 195-207.

KEMNITZ, J.W., GOY, R.W., FLITSCH, T.J., LOHMILLER, J.J., and ROBINSON, J.A. (1989). Obesity in male and female rhesus monkeys: Fat distribution, glucoregulation, and serum androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 69, 287-293.

LANE, M.A., INGRAM, D.K., CUTLER, R.G., KNAPKA, J.J., BARNARD, D.E., and ROTH, G.S. (1992). Dietary restriction in non-human primates: Progress report on the NIA study. *Annals of New York Academy of Sciences*, 26, 36-45.

LANE, M.A., INGRAM, D.K., BALL, S.S., and ROTH, G.S. (1997). Dehydroepiandrosterone sulfate: A biomarker of primate aging slowed by calorie restriction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 2093-2096.

Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995 Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition - Committee on Animal Nutrition - Board on Agriculture - National Research Council NATIONAL ACADEMY PRESS Washington, D.C. 1995.

OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B.. The influence of butter-fat on growth. *J Biol Chem* 1914; 16: 423-37.

PEREIRA FILHO, J.M.; RESENDE, K.T.; TEIXEIRA, I.A.M.A.; SOBRINHO, A.G.S.; YAÑEZ, E.A.; FERREIRA, A.C.D. Efeito da Restrição Alimentar no Desempenho Produtivo e Econômico de Cabritos F1 Boer x Saanen - *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.1, p.188-196, 2005

PESCARA, J.B., VASCONCELOS, J.L.M., SÁ FILHO, O.G., LOSI, T.C. Influência da densidade nutricional da dieta na concentração sérica de progesterona e taxa de concepção em vacas da raça Brangus. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, CD-ROM, 2005. (Resumo).

POILEY, S.M. 1972. Growth tables for 66 strains and stocks of laboratory animals. *Lab. Anim. Sci.* 22:759-779.

REBIEE, A.R., MACMILLAN, K.L., SCHWARZENBERGER, F. The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring faecal progesterone metabolites in grazing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.67, p.205-214, 2001.

SANTOS, R.M. Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas holandesas não-lactantes na progesterona plasmática, composição do fluido folicular e produção de prostaglandina pelo endométrio. Jaboticabal, SP, 2005, 102p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

SAS User's Guide Statistics. Statistical Analyses System Institute, Inc. Versão 8.02, Cary, NC. 2001.

SWAIN, J.E., DUNN, R. L., Connell, D., MARTINEZ, J.G., SMITH, G.D. Direct Effects of Leptin on Mouse Reproductive Function: Regulation of Follicular, Oocyte, and Embryo Development. *Biology of Reproduction*, 71, 1446–1452 (2004).

TERRY, K.K.; CHATMAN, LA.; FOLEY, GI.; KADYSZEWSKI, E.; FLEEMAN, TL.; HURTT, ME.; CHAPIN, RE. Effects of Feed Restriction on Fertility in Female Rats. *Birth Defects Research (Part B)* 74:431–441 (2005)

TONETE, S.S.Q., NÉBREGA, F.J., SARTOR, M.E.A., TRINDADE, C.E.P., LOPEZ, F.L., CURI, P.R.. Desnutrição Intrauterina em Ratos. II Estudo do peso e mortalidade do produto da concepção. *Archivos Latinoamericano de Nutricion*, Vol.XXXIII, Marzo de 1983, N°. 1.

TURTURRO, A., WITT, W. W., LEWIS, S., HASS, B. S., LIPMAN, R. D. & HART, R. W. (1999) Growth curves and survival characteristics of the animals used in the biomarkers of aging program. *J. Gerontol.* 54A: B492–B501.

VASCONCELOS, J.L.M., SANGSRITAVONG, S., TSAI, S.J., WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, v.1, 1-13, 2003.

Tabela 1: Peso semanal médio das fêmeas e consumo voluntário semanal e diário médio de ração dos 45 dias de idade até o parto.

Semanas	Peso Médio Semanal das Fêmeas (g)	Consumo Voluntário Médio Semanal (g)	Consumo Médio Diário (g)
1 ¹	184,65 ± 9,11	99,26 ± 2,58	14,18
2	196,68 ± 10,91	130,21 ± 13,46	18,60
3	218,58 ± 16,10	140,30 ± 17,16	20,04
4	227,65 ± 18,97	143,50 ± 14,79	20,50
5	240,92 ± 21,57	147,52 ± 15,63	21,07
6	247,38 ± 21,72	153,82 ± 15,18	21,97
7 ²	253,08 ± 21,72	165,80 ± 10,67	23,69
8	272,53 ± 21,55	168,36 ± 13,88	24,05
9	293,76 ± 27,92	180,63 ± 14,87	25,80
10 ³	349,10 ± 36,25	167,71 ± 16,62	23,96

1 Fêmeas com 45 dias de idade

2 Semana em que ocorreu o acasalamento das fêmeas

3 Semana onde ocorreram os partos

Tabela 2: Desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* submetidas à restrição alimentar 15 dias antes ou depois do acasalamento

Características	Pré		P	Pós		P
	Voluntário	Restrito		Voluntário	Restrito	
Dias de gestação (g)	21,86 ± 0,12	21,84 ± 0,12	0,9394	21,76 ± 0,12	21,94 ± 0,12	0,2734
Peso ao parto (g)	289,15 ± 57,50	287,76 ± 58,73	0,8662	293,69 ± 57,54	283,21 ± 58,72	0,2099
Nascidos totais	12,39 ± 0,51	10,69 ± 0,53	0,0267	11,19 ± 0,51	11,89 ± 0,52	0,3451
Peso nascidos (g)	79,06 ± 3,38	69,26 ± 3,45	0,0490	70,82 ± 3,37	77,49 ± 34,46	0,1744
Peso vivos (g)	78,39 ± 3,67	68,04 ± 3,74	0,0555	70,54 ± 36,70	75,89 ± 3,745	0,3148
Nascidos vivos	12,30 ± 0,58	10,42 ± 0,59	0,0294	11,15 ± 0,58	11,57 ± 0,59	0,6134
Peso médio total (g)	63,90 ± 14,99	64,88 ± 15,30	0,6643	64,15 ± 14,99	64,67 ± 15,30	0,8081
Peso médio vivo (g)	63,90 ± 2,52	63,12 ± 2,57	0,8312	64,17 ± 2,52	62,84 ± 2,57	0,7143

Tabela 3: Peso médio de ratas *Wistar* submetidas a restrição alimentar durante 7 (R7), 14 (R14) ou 21 dias (R21) após o acasalamento

Características	Tratamentos ¹				P
	Controle (n=23)	R7 (n=22)	R14 (n=23)	R21 (n=24)	
Peso das fêmeas ao acasalamento (g)	245,46 ± 4,76	240,03 ± 4,87	245,45 ± 4,76	247,84 ± 4,66	0,7014
Peso das fêmeas aos 7 dias de prenhez (g)	264,76 ± 4,54	239,00 ± 4,64**	236,26 ± 4,54**	243,14 ± 4,44**	0,0001
Peso das fêmeas aos 14 dias de prenhez (g)	294,31 ± 5,35	291,33 ± 5,47	261,50 ± 5,35**	264,35 ± 5,24**	0,0001
Peso das fêmeas ao parto (g)	283,51 ± 4,89	282,79 ± 5,00	273,32 ± 4,89	253,05 ± 4,78**	0,0001
Peso das fêmeas a desmama (g)	290,43 ± 4,79	298,37 ± 4,90	286,21 ± 4,79	279,18 ± 4,69†	0,0450

¹Médias comparadas ao controle através de contrastes pré-planejados † P < 0,10; * P < 0,05 ; ** P < 0,01

Tabela 4: Características reprodutivas de ratas Wistar submetidas a restrição alimentar durante 7 (R7), 14 (R14) ou 21 dias (R21) após o acasalamento

Características	Tratamentos				Probabilidade
	Controle (n=23)	R7 (n=22)	R14 (n=23)	R21 (n=24)	
Nascidos totais	11,13 ± 0,59	10,73 ± 0,60	11,69 ± 0,59	11,00 ± 0,57	0,6989
Nascidos vivos	11,13 ± 0,58	10,73 ± 0,60	11,56 ± 0,58	11,00 ± 0,57	0,7892
Peso ninhada viva (g)	70,45 ± 3,51	67,37 ± 3,60	74,17 ± 3,51	61,39 ± 3,44	0,3125
Peso médio vivo (g)	6,36 ± 0,14	6,34 ± 0,15	6,54 ± 0,14	6,00 ± 0,14 [†]	0,0629
Nº desmamados	11,04 ± 0,58	10,50 ± 0,59	11,56 ± 0,58	10,87 ± 0,56	0,6296
Peso desmamados (g)	425,66 ± 18,83	419,34 ± 19,25	436,59 ± 18,83	420,37 ± 18,44	0,9127

[†]Médias comparadas ao controle através de contrastes pré-planejados † P < 0,10; * P < 0,05 ; ** P < 0,01

Tabela 5: Número total de corpos lúteos, sítios de implantação nos cornos uterinos e gordura da cavidade abdominal das fêmeas submetidas à restrição alimentar por 15 dias antes acasalamento

Características	Tratamentos		Probabilidade
	Controle	Restrito	
CL total	13,10 ± 0,50	12,70 ± 0,50	0,5786
Sítios de implantação	12,90 ± 0,47	12,20 ± 0,47	0,3105
Gordura total (g)	5,44 ± 0,43	5,68 ± 0,43	0,7019

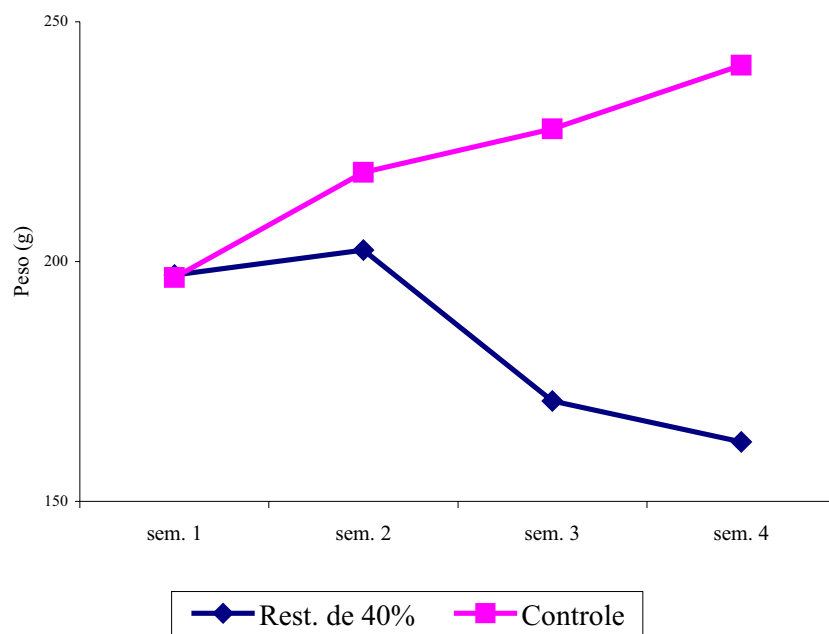


Figura 1: Peso das fêmeas do grupo controle e do grupo com restrição de 40% de alimento no período de quatro semanas.

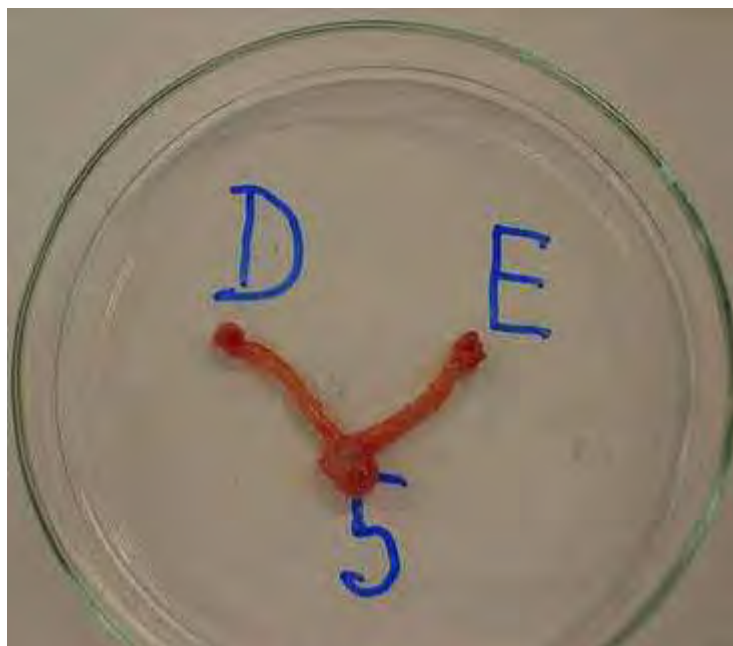


Figura 2: Aparelho reprodutivo da fêmea número 5 identificando os ovários direito e esquerdo e os cornos uterinos.

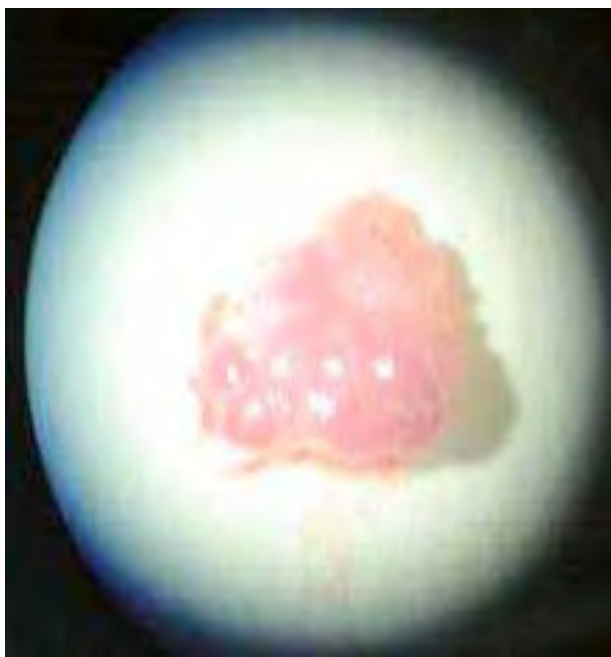


Figura 3: Ovário da rata no sétimo dia de prenhez

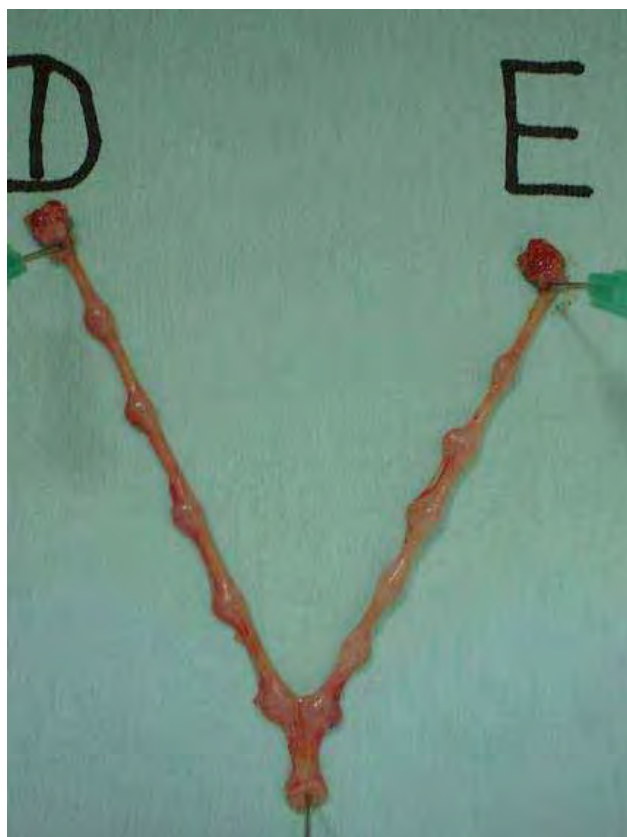


Figura 4: Útero de rata no sétimo dia de prenhez com a presença de embriões implantados nos dois cornos.

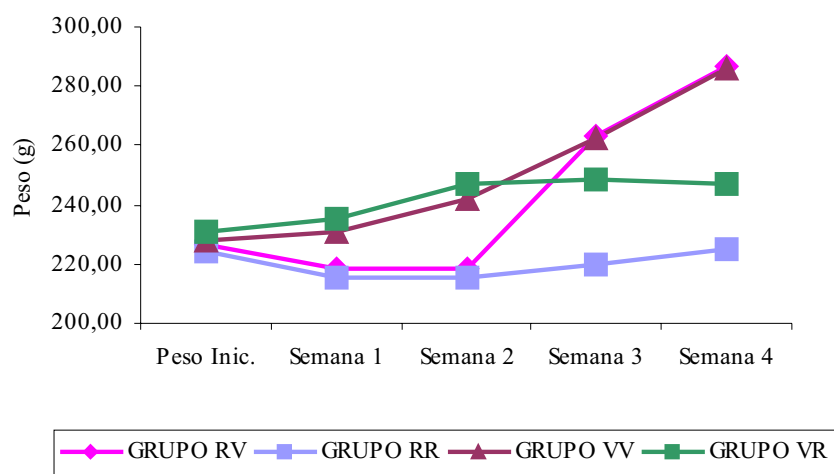


Figura 5: Médias de peso das fêmeas do experimento restrição pré e pós-acasalamento.

RV = Restrito na fase pré e voluntário na fase pós-acasalamento;

RR = Restrito nas duas fases; VV = Voluntário nas duas fases;

VR = Voluntário na fase pré e voluntário na fase pós-acasalamento.

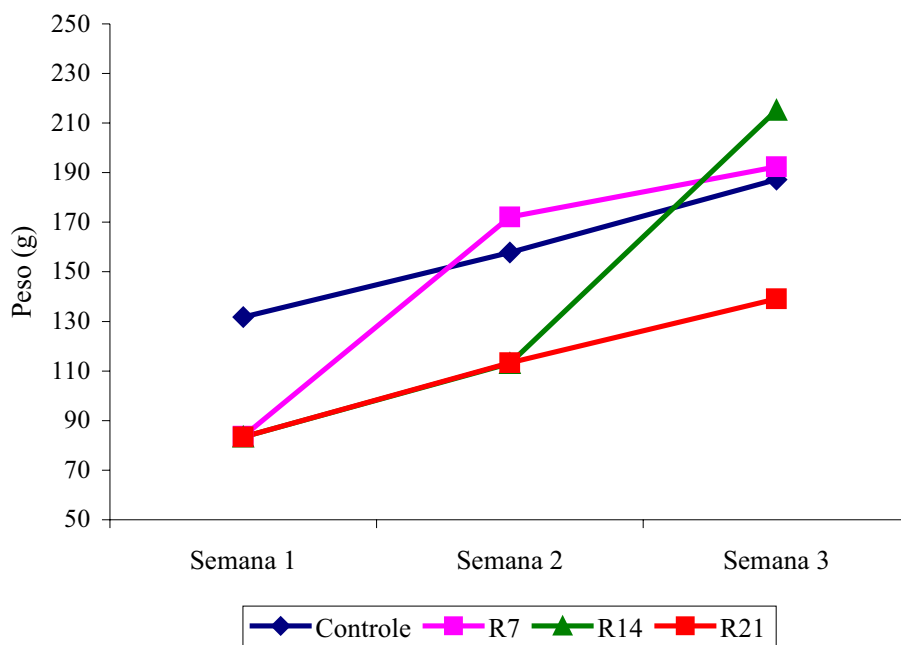


Figura 6: Peso das fêmeas durante a prenhez no experimento restrição pós-acasalamento. (R7) = 7 dias de prenhez, (R14) = 14 dias de prenhez e (R21) = 21 dias de prenhez.

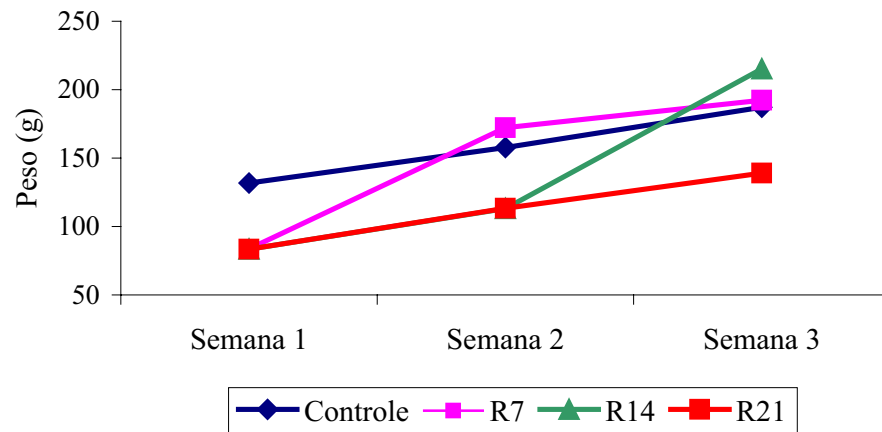


Figura 7: Consumo alimentar das fêmeas durante a prenhez experimento pós-acasalamento. (R7) = 7 dias de prenhez, (R14) = 14 dias de prenhez e (R21) = 21 dias de prenhez.

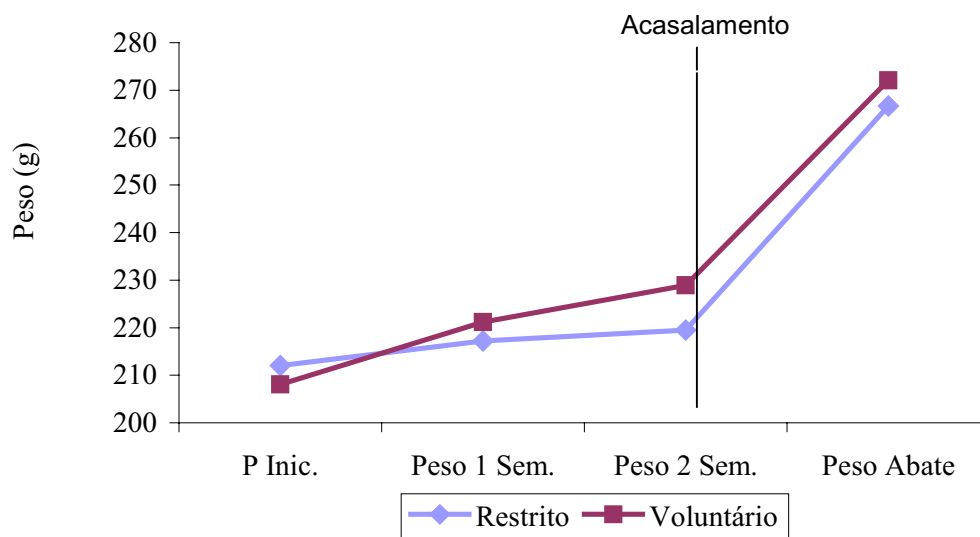


Figura 8: Peso das fêmeas do experimento Restrição pré-acasalamento para contagem de CL e sítios de implantação, desde a idade de 75 dias (Peso inicial) até o momento do abate.

CAPÍTULO III

Técnicas de sincronização do estro de ratas Wistar

Poucos cientistas passam tempo no biotério, mas foi lá que eu fiz minhas melhores observações, tendo como meu único aparato, um palito de dente.

Dr. Wesley K. Whitten

*Técnicas de sincronização do estro de ratas Wistar (Rattus norvegicus)
nulíparas*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sincronização de ratas *Wistar*, induzidas ao estro de duas diferentes formas: pela presença de machos adultos vasectomizados (MV) e pelo odor do macho (OM), tendo como controle positivo, machos comprovadamente férteis (MF) e controle negativo, ausência de macho e de odor do macho (SM). Sessenta fêmeas foram distribuídas em quatro grupos contendo 15 fêmeas cada. No tratamento MV, cada fêmea foi exposta à presença de um macho adulto vasectomizado. No tratamento OM cada fêmea foi exposta ao odor do macho, ou seja, foi colocada diariamente em uma gaiola, contendo maravalha proveniente de uma gaiola de macho adulto. No grupo MF, cada fêmea foi colocada diretamente com um macho, comprovadamente, fértil. No grupo SM, as fêmeas permaneceram sem contato com macho ou com maravalha de macho. Em todos os grupos, as fêmeas foram submetidas ao tratamento durante quatro dias consecutivos. Diariamente, foi coletada de todas as fêmeas a secreção vaginal, pelo método de esfregaço, para identificar a fase do ciclo estral. Para comparar os tratamentos, foi utilizada a análise de sobrevivência. De acordo com o teste *log rank*, houve uma tendência ($P < 0,0971$) de os grupos se diferenciarem, em relação ao número de dias, para apresentar estro. Nos quatro dias consecutivos, a incidência de fêmeas em estro foi a seguinte: MV 6,66%; OM 40%; MF 20% e SM 20%; MV 26,66%; OM 13,33%; MF 20% e SM 20%; MV 13,33%; OM 20%; MF 20% e SM 26,66%; e MV 26,66%; OM 26,66%; MF 40% e SM 20%. O grupo submetido ao odor de macho apresentou maior incidência de estro em menor número de dias. Pode-se recomendar a exposição de fêmeas ao odor do macho na maravalha para sincronizar o estro de ratas *Wistar* nulíparas.

Palavras chave: estro, sincronização, *rato Wistar*, efeito Whitten.

Estrus synchronization techniques in Wistar nuliparous female rats (Rattus norvegicus)

ABSTRACT

The objective was to evaluate the estrus synchronization of *Wistar* female rats through two techniques: the presence of vasectomized males (MV) and the presence of male odor from the bedding (OM). The presence of intact males was used as positive control (MF) and the absence of males and male odor as a negative control (SM). Sixty females were assigned to one of four treatments with 15 females each. In the MV treatment, each female was exposed to an adult vasectomized male. In the OM treatment, each female was exposed to male odor, i.e., she was placed daily in a cage containing bedding from an adult male. In the MF treatment each female was directly exposed to a certified fertile male. In the SM treatment females had no contact with males or male bedding. In all groups females were exposed to treatment for four consecutive days. All the females were submitted daily to vaginal cytology for estrous cycle phase determination. A Survival Analysis was employed to compare treatments. According to the log rank test treatments tended ($P < 0.0971$) to differ in relation to the number of days to present estrous. In the four consecutive days, the incidence of females in estrous was as follows: MV 6.66%; OM 40%; MF 20% and SM 20%; MV 26.66; OM 13.33; MF 20% and SM 20%; MV 13.33%; OM 20%; MF 20% and SM 26.66%; and MV 26.66; OM 26.66%; MF 40% and SM 20%. The OM treatment presented the highest incidence of estrous in a shorter time. Exposure to adult male bedding can be recommended for estrous synchronization of female nuliparous *Wistar* rats.

Keywords: estrous, synchronization, *Wistar* rat, Whitten effect.

Introdução:

A puberdade é o momento na vida, quando, gametas maduros são produzidos pela primeira vez, e a atividade reprodutiva é iniciada. Na maioria das espécies, a transição, para a idade adulta, inclui mudanças graduais no comportamento e na aparência corpórea. Essas mudanças refletem uma cadeia de eventos que se originam no cérebro: aumento da produção de esteróides sexuais pelas gônadas, em resposta a aumento na secreção de gonadotrofinas da glândula pituitária anterior, que, por sua vez, está sendo guiada pelo aumento da secreção do hormônio liberador de gonadotropinas, GnRH, pelo hipotálamo. Esses sinais têm origem interna e estão relacionados ao crescimento, enquanto outros, têm origem externa e fornecem informações sobre o ambiente em que o animal vive (FOSTER & NAGATANI, 1999). Em roedores, as mudanças progressivas na pulsatilidade do GnRH, parecem dirigir o desenvolvimento sexual.

Em torno dos sessenta dias de idade, a rata atinge a maturidade sexual (HAFEZ, 1970). Porém, na prática, aguarda-se até noventa dias, quando a fêmea pesa aproximadamente 250g, para realizar o primeiro acasalamento. O ciclo estral dura de quatro a cinco dias e possui quatro fases (diestro, proestro, estro e metaestro), que podem ser observadas através da análise citológica da secreção vaginal.

As fêmeas dos mamíferos, especialmente daqueles que vivem em grandes grupos, estão envoltas em um ambiente social muito rico e complexo, repletos de estímulos sensitivos, provenientes dos demais componentes do grupo (MARTIM, 2002). Em camundongas, a presença de fêmeas adultas atrasa a puberdade de fêmeas jovens. Em alcatéias, embora as fêmeas subordinadas apresentem cio e até cortejem os machos, elas não copulam, a menos que a fêmea dominante seja removida do grupo (ALCOCK, 1993). A identificação e o reconhecimento dos indivíduos ocorrem pelo cheiro inato de cada espécie, resultante, da liberação de substâncias químicas, denominadas de feromônios.

Feromônios são produtos químicos temporários, liberados pelos animais que causam mudanças comportamentais, fisiológicas e, possivelmente, psicológicas em outros membros da mesma espécie. Podem influenciar o desempenho reprodutivo dos ratos e ser usados para ajudar o investigador (HAFEZ, 1970).

A manipulação hormonal do ciclo reprodutivo murino é, agora, prática comum, usada como ferramenta, para técnicas como: criopreservação de embriões, limpeza sanitária de colônias, transgênese. A sincronização do ciclo estral e a programação do parto são indispensáveis para a aplicação destas técnicas. A sincronização pode ser realizada por diversos métodos; efeito *Whitten*; sincronização hormonal pela administração de gonadotropina coriônica eqüina, GCE, ou usando o hormônio liberador de gonadotropinas, GnRH; e pela presença de machos vasectomizados. O efeito *Whitten* caracteriza-se pelo sincronismo do ciclo estral, quando fêmeas de camundongo, alojadas em grupos homossexuais e apresentando anestro, são expostas a um macho ou ao odor de sua urina, promovendo a liberação de gonadotrofina e ativando o ciclo ovariano de forma sincronizada (WHITTEN, 1956).

A hipótese deste experimento é que maravalha, com cheiro do macho, é uma técnica eficiente para sincronizar o estro de ratas *Wistar*.

O objetivo deste trabalho é avaliar a sincronização de fêmeas *Wistar* no momento do acasalamento, quando induzidas ao estro de duas diferentes formas: pela presença de machos adultos vasectomizados e pelo odor do macho na maravalha.

Material e Métodos

Local e Instalações

O experimento foi realizado no Setor de Ratos *Wistar*, do Biotério Central do Instituto Butantan – SP. As salas dos animais apresentam fluxo de pessoas e insumos definido, são protegidas com barreiras sanitárias (autoclave de barreira, sistema de filtração de ar, diferencial de pressão, etc.), a temperatura ambiente é controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Existe um sistema de exaustão na altura das gaiolas, impedindo a dispersão da amônia no ambiente. São realizadas 15 a 20 trocas de ar/h e o ciclo de luz é definido (12L:12D). Todo o sistema é ligado a um gerador, garantindo o funcionamento em caso de falta de energia elétrica.

Animais e Manejo Geral

O modelo biológico foi o Rato *Wistar*, com animais oriundos da colônia de multiplicação do Setor de Ratos, do Biotério Central do Instituto Butantan. Os

animais são de padrão sanitário controlado, mantidos em gaiolas de polipropileno, medindo 46 x 31 x 21cm, que permitem livre acesso à água potável e à ração. As gaiolas foram forradas com cama de maravalha autoclavada. A rotina de manejo dos animais compreendeu: duas trocas semanais da gaiola e água fresca três vezes por semana. A ração foi comercial da marca Nuvital[®], peletizada, própria à espécie e oferecida *ad libitum*. De acordo com o fabricante, a formulação obedece às recomendações do National Research Council (NRC) e National Institutes of Health (NIH).

Delineamento Experimental

Produziram-se 60 fêmeas com o intervalo máximo de dois dias entre os nascimentos, que foram mantidas em ninhadas de 8 filhotes, desde o nascimento até o desmame, que ocorreu aos 21 dias de idade. A partir desta idade, continuaram em grupos homossexuais, agora de seis fêmeas por gaiola, até a idade de 90 dias. Aos 90 dias foram separadas, formando quatro grupos de 15 fêmeas cada, identificadas e mantidas em gaiolas individuais. Durante o período compreendido entre o desmame e o acasalamento as fêmeas e os machos foram mantidos em salas separadas. No Grupo MV, cada fêmea foi exposta à presença de um macho adulto vasectomizado. No Grupo OM, cada uma foi exposta ao odor do macho, ou seja, foi colocada diariamente em uma gaiola contendo maravalha com odor dos machos. No Grupo MF, o controle positivo, cada fêmea foi colocada diretamente na presença de um macho comprovadamente fértil. No Grupo SM, controle negativo, as fêmeas permaneceram sem contato com macho ou com maravalha de macho. Em todos os grupos, as fêmeas foram expostas ao tratamento durante quatro dias consecutivos. Diariamente, todas as fêmeas foram submetidas à coleta da secreção vaginal pelo método de esfregaço, para identificar a fase do ciclo estral (Figura 1). Após a coleta, procedeu-se à leitura das lâminas não coradas, a fresco em microscópio ótico, sem a utilização das lentes do condensador. O uso da objetiva de aumento de 10 vezes facilitou a análise da proporção entre os três tipos celulares presentes no material. O uso da objetiva de aumento de 40 vezes, permitiu o reconhecimento de cada um dos tipos celulares.

Para comparar os tratamentos, em relação ao número de dias necessários ao aparecimento do primeiro estro, no intervalo de tempo estudado, a análise de

sobrevivência foi empregada, com o auxílio do procedimento *LIFETEST* do SAS (2001).

Produção de Machos e Vasectomia

Este procedimento foi aprovado pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP.

Foram produzidos 50 filhotes machos, que após o desmame foram mantidos em ninhadas compostas de cinco animais cada. Deste total, 18 animais foram vasectomizados aos 30 dias de idade, seguindo o esquema descrito na Figura 2. Todos os machos foram previamente acasalados com o intuito de ser certificada a fertilidade ou não, no caso dos vasectomizados.

Para realização da vasectomia, os animais foram anestesiados por via intra-peritoneal com ketamina (7%) e xilasina (0,3%) na proporção de 2:1 mL, com 0,2 mL/100 g de peso da solução. Em seguida, posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, tendo suas extremidades fixadas com fita adesiva, tricotomizados e submetidos à antisepsia. Foi feita uma incisão com 0,5cm de comprimento, com lâmina de bisturi, a uma distância de aproximadamente 1cm acima do pênis, seguindo a linha mediana, abrangendo pele e aponeurose. Realizou-se a fixação da musculatura abdominal com as pinças de Allis, para tracionar a parede abdominal, com o intuito de facilitar o processo. Chegou-se aos ductos deferente, cada ducto, foi separado da membrana mesentérica, apreendido com uma pinça em dois pontos, com aproximadamente 5mm de distância. Os dois pontos foram seccionados e termo-cauterizados. A sutura foi realizada com fio nº15, em dois planos, com pontos separados (Figura 2). Os animais foram levados para a área tranqüila do laboratório. A temperatura ambiente foi controlada entre 30 e 33°C (a temperatura recomendada para ratos é 27° a 30°C para adultos e 35 a 37°C para neonatos (FLECKNELL, 1998)). O ideal seria ter uma incubadora, permitindo melhor controle da temperatura, e evitando a hipotermia, comum no período pós-cirúrgico. Durante a recuperação, os animais foram dispostos em camas de papel toalha que não aderiam à ferida cirúrgica. Sempre foi mantido um animal por gaiola para evitar traumas ou até canibalismo. Não foi necessário o uso de antibióticos, porque foi utilizada técnica estéril de manipulação. Nas primeiras horas após o procedimento cirúrgico, observou-se o comportamento e registrados os parâmetros fisiológicos. O alimento foi

disponibilizado, colocando-se ração umedecida no fundo da caixa, e água *ad libitum*. Foram usados analgésicos para alívio da dor.

Resultados e Discussão

A Tabela 1, apresenta o número de fêmeas em estro, por dia de observação e por tratamento. Diariamente foram examinadas e lidas 60 lâminas. Observou-se que o grupo de fêmeas expostas aos machos vasectomizados e o grupo fêmea sem macho, apresentaram maiores valores no diestro, sugerindo que, nestas condições, as fêmeas apresentaram diestros mais longos (dados não apresentados).

O número de animais, no início do experimento, foi igual (n=15) nos quatro grupos. Os grupos: OM e MF, alcançaram 100% de estro durante o período estudado de 4 dias (Figura 3). No grupo SM, 13 fêmeas (86,66%) apresentaram estro no período e no grupo MV, apenas 11 fêmeas (73,33%) apresentaram estro ao longo das quatro leituras avaliadas. De acordo com o teste *log rank* houve uma tendência ($P < 0,0971$) de os grupos se diferenciarem em relação ao número de dias para apresentar estro.

Desde o início do experimento, observou-se melhores resultados para o grupo OM, que já no primeiro dia de leitura apresentou 40% das fêmeas em estro. Os melhores resultados persistiram até a quarta leitura, quando 100% das fêmeas apresentaram estro. O controle positivo, grupo MF, também apresentou 100% na quarta leitura. Não se encontrou uma explicação clara para os resultados obtidos com machos vasectomizados. Em teoria o macho vasectomizado deveria apresentar o mesmo estímulo que o macho inteiro. (Figura 3).

HOWARD & MARSH, (1970), demonstraram que fêmeas com implantes de 20mg de testosterona apresentavam feromônios em suas urinas e que a urina de machos castrados, não teve influência no ciclo estral. Porém, há autores que afirmam que o efeito *Whitten* não é tão pronunciado em ratos, quanto o visto nos camundongos (SHARP & LA REGINA, 1998). SCHANK (1997), afirma que o ciclo estral de ratas selvagens é, possivelmente, mais longo e mais regular que nas raças domésticas. Sugere, também, que a sincronia é um relacionamento entre os indivíduos de um grupo e não uma característica de um indivíduo. A sincronização responde de várias maneiras diferentes, dependendo da espécie e até mesmo da linhagem avaliada, como também de

fatores externos, como o número de indivíduos e a disponibilidade de alimento (ANDERSEN, 2004).

Conclusão

Pode-se recomendar o odor do macho na maravalha para induzir o estro das fêmeas, uma vez que, no dia-a-dia dos biotérios, é grande a quantidade de fêmeas que necessitam acasalar.

Bibliografia

ALCOCK, J. *Animal behavior: an evolutionary approach*. 5 ed. Sunderland: Sinouer Associates, 1993. 624p.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA; V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES.L.E; TUFIK, S. *Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. 2004. 179p.

FLEKNELL, P. 1998 Assessment and alleviation of post-operative pain. *Animal-Welf-Inf-Cent-news*. v. 8 (3/4) p. 8-14.

FOSTER, D.L., NAGATANI, S. Physiological Perspectives on Leptin as a Regulator of Reproduction: Role in timing Puberty. *Biology of Reproduction*. v. 60, p. 205-215, 1999.

HAFEZ & HAFEZ. *Reprodução Animal*. 7ª Edição, Editora Manole. 2004. (HAFEZ, 1970).

HOWARD and MARSH, R. E. 1970. Olfaction in rodent control. Proc. 4th Vertebrate Pest Conference, pp 64-70.

MARTIN, G.B. Social-sexual signals and reproduction in mammals: an overview in: CURSO INTERNACIONAL SOBRE FEROMONAS Y BIOESTIMULACIÓN SEXUAL, Ciudad de México, 2002 [S.I.:s.n.],2002. p 11-28.

National Institute of Mental Health (2002). *Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals: Report of a National Institutes of Health Workshop*. Morrison AR; Evans HL; Ator NA; Nakamura RK (eds). NIH Publication No. 02-5083. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

SHARP, P.E. & M.C. LA REGINA. 1998. **The laboratory rat**. CRC Press. p.214

SCHANIC, J.C.; Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? *Physiology & Behavior* 72 (2001) 129 – 139.

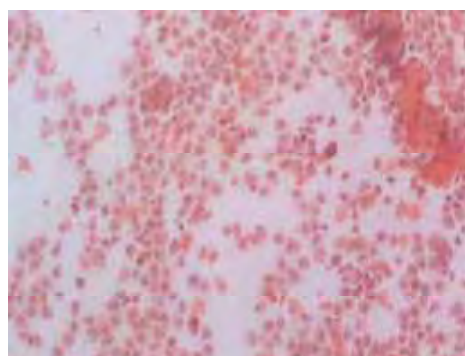
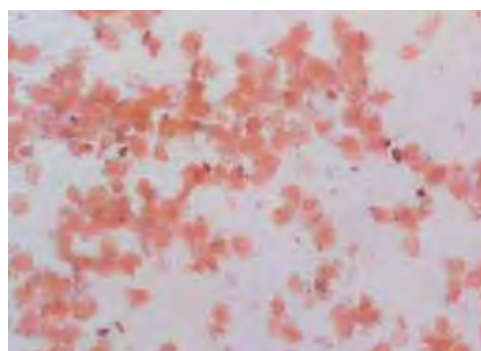
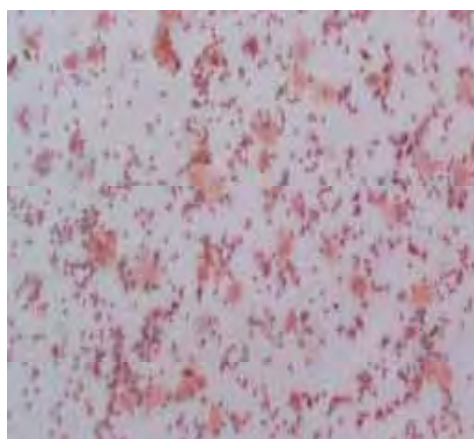
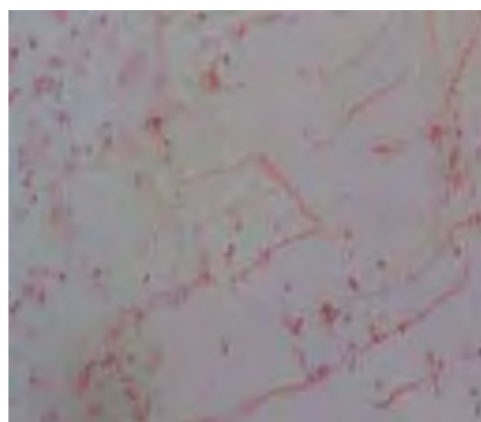
WHITTEN, W.K. 1956. Modification of the estrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *Journal of Endocrinology*, 13: 399-404. RICHARD, E.

Tabela 1: Incidência de fêmeas em estro durante os quatro dias de leituras, de acordo com o tratamento.

GRUPOS	N	1ª Leitura	2ª Leitura	3ª Leitura	4ª Leitura	Estro total
MV	15	1	4	2	4	11
OM	15	6	2	3	4	15
MF	15	3	3	3	6	15
SM	15	3	3	4	3	13

MF = macho fértil; MV = macho vasectomizado

OM = odor do macho; SM = sem macho

**PROESTRO****ESTRO****METAESTRO
DIESTRO I****DIESTRO
DIESTRO II****Figura 1: Citologia vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata.**

(Fotos de Andersen, M.L, *et al.* In: Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação, 2004)

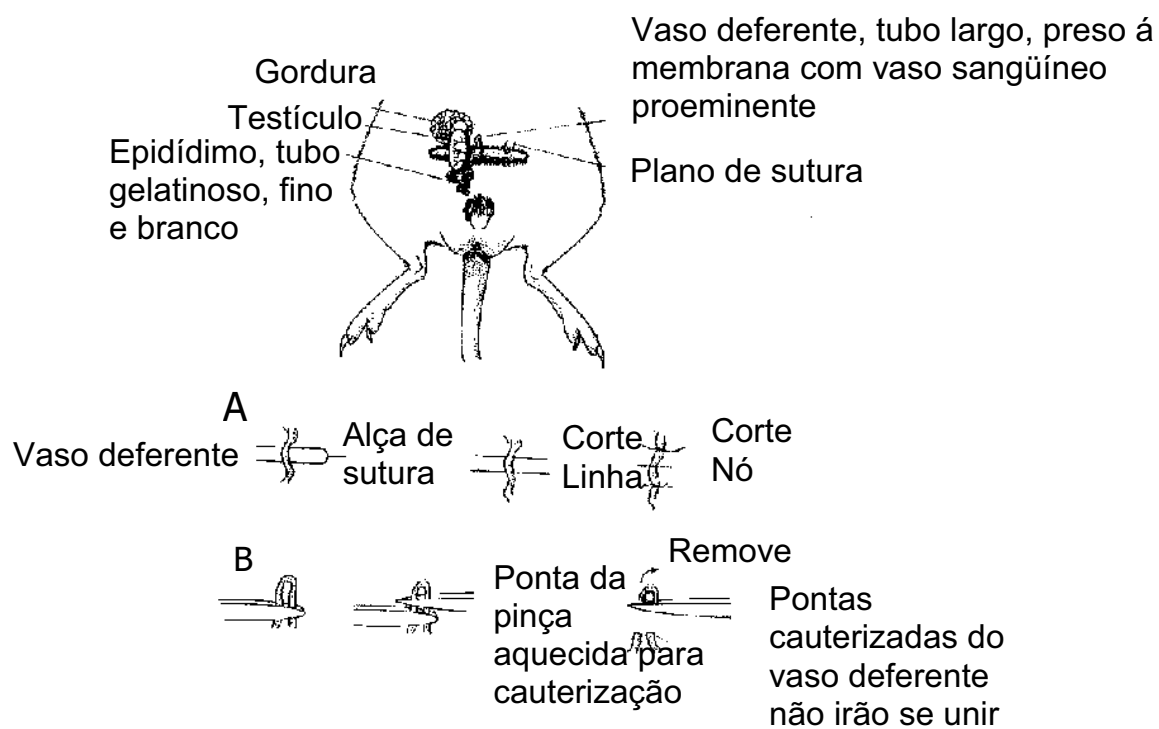


Figura 2: Esquema de vasectomia (modificado de Hogan,B., *et al.*.In: Manipulating the Mouse Embryo – Second Edition - 1994)

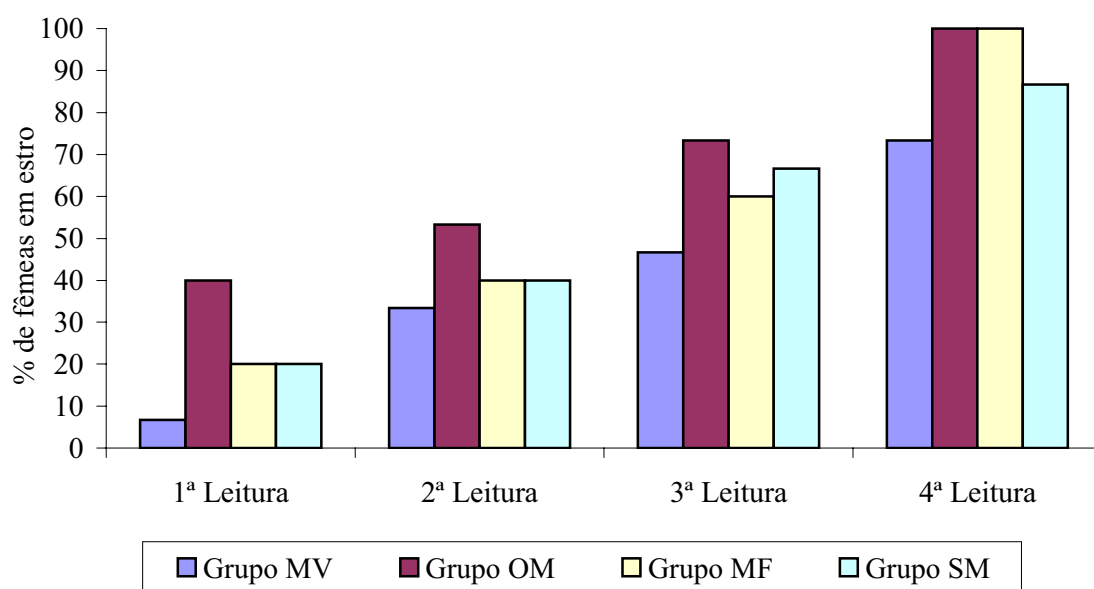


Figura 3: Frequência acumulada de fêmeas em estro em quatro dias de leitura.

MF = macho fértil; MV = macho vasectomizado;

OM = odor do macho; SM = sem macho

CAPÍTULO IV

Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de produção

***O maior erro da ética é a crença de que ela só pode ser aplicada
em relação aos homens.***

Albert Schweitzer

Produtividade de ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) em diferentes sistemas de produção

RESUMO

Algumas características tornam o rato um modelo atraente para pesquisa: pequeno porte, ciclo biológico curto, baixo custo de manutenção e sua similaridade com os seres humanos. O objetivo deste trabalho é em avaliar a produtividade e uniformidade da produção durante toda a vida reprodutiva de ratas *Wistar*, em três sistemas de produção mais utilizados nos biotério nacionais: Sistema Monogâmico, Sistema Poligâmico Permanente e Sistema Poligâmico Temporário. Sessenta fêmeas foram distribuídas em três grupos, de acordo com o sistema de produção: 1) Monogâmico (MG): 20 casais, um por gaiola, em sistema intensivo; 2) Poligâmico Permanente (PP): 20 fêmeas acasaladas poligamicamente, em sistema intensivo, foram alojadas em 10 gaiolas contendo, duas fêmeas e um macho cada; Poligâmico Temporário (PT): 20 fêmeas foram acasaladas em sistema poligâmico rotativo de macho. Assim, o macho permaneceu na gaiola com duas fêmeas até à certificação da prenhez, que ocorreu no período de 7 a 10 dias; em seguida, foram retirados da gaiola, retornando somente após o desmame das ninhadas. Foi definido, como vida reprodutiva, seis partos e todas as fêmeas foram acasaladas pela primeira vez aos 90 dias de idade. A gaiola foi considerada como a unidade experimental. Durante o período de vida reprodutiva dos animais, foram avaliadas as características: número de nascidos totais (MG $57,38 \pm 4,32$; PP $109,67 \pm 5,59$; PT $117,17 \pm 5,59$), peso total das ninhadas ao nascer (MG $405,40 \pm 27,26$; PP $727,48 \pm 36,06$; PT $798,43 \pm 36,06$ g), número de desmamados (MG $38,09 \pm 2,52$; PP $69,58 \pm 3,33$; PT $82,66 \pm 3,33$), peso total das ninhadas à desmama (MG $1799,73 \pm 119,81$; PP $3395,73 \pm 158,50$; PT $4311,13 \pm 158,50$ g), mortalidade pré-desmame. (MG $6,48 \pm 1,29$; PP $13,08 \pm 1,59$; PT $6,67 \pm 1,69$). Detectou-se diferença entre os sistemas de produção ($P < 0,05$) para todas as características. O sistema PT pode ser recomendado, quando se tem como objetivo, o desempenho de ninhadas, principalmente, em relação ao desmame de animais com peso mais alto e uniforme e com menores taxas de mortalidade de fêmeas e filhotes.

Palavras chave: *Wistar*, sistema de produção, acasalamento, monogâmico, poligâmico.

Productivity of *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*) in different production systems

ABSTRACT

The rat is the preferred species in the world; some characteristics made it an attractive research model: small body size, short life cycle, low maintenance costs and similarity to humans. The objective of this work is to evaluate the productivity and the uniformity of the lifetime reproduction of *Wistar* females in the three production systems usually adopted in the Brazilian production units: Monogamous System, Permanent Polygamous System, and Temporary Polygamous System. Sixty female rats were assigned to one of the three groups: 1) Monogamous (MG): 20 mating pairs, one per cage in an intensive system; 2) Permanent Polygamous (PP): 20 females, housed two per cage with a male in an intensive system; 3) Temporary Polygamous (TP): 20 females housed two per cage with a male in a rotational system, that is, the male was kept in the cage with the two females until their pregnancies were certified, which occurred in 7 to 10 days. They were then removed from that cage and returned after the litters were weaned. Lifetime reproduction was defined as six parturitions and the females were first mated at 90 days of age. The cage was considered as the experimental unit. Lifetime production for total number born (MG 57.38 ± 4.32 ; PP 109.67 ± 5.59 ; TP 117.17 ± 5.59), total litter birth weight (MG 405.40 ± 27.26 ; PP 727.48 ± 36.06 ; TP 798.43 ± 36.06 g), total number weaned (MG 38.09 ± 2.52 ; PP 69.58 ± 3.33 ; TP 82.66 ± 3.33), total litter weaning weight (MG 1799.73 ± 119.81 ; PP 3395.73 ± 158.50 ; TP 4311.13 ± 158.50 g), total pre-weaning mortality (MG 6.48 ± 1.29 ; PP 13.08 ± 1.59 ; TP 6.67 ± 1.69). Differences among the production systems ($P < 0.05$) were detected for all the traits. The TP system could be recommended to improve litter performance, especially for higher and more uniform weaning weight and a lower young and dam mortality rates.

Key words: *Wistar*, production system, mating, monogamous, polygamous

Produtividade de ratos *Wistar* em diferentes sistemas de produção

Introdução

O rato primeiro mamífero domesticado com fins científicos, é o animal mais utilizado em laboratório e a linhagem *Wistar*, a predileta em todo o mundo. Diversas características tornaram-no um modelo atraente para pesquisa: pequeno porte, ciclo biológico curto, baixa manutenção e, sua similaridade com os seres humanos. Como aproximadamente 80% do DNA dos ratos é idêntico ao do homem, aumentou a predileção por este roedor (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). A publicação em 1915, da primeira edição do livro *The Rat* de autoria de Donaldson, foi fundamental para a caracterização da linhagem *Wistar* e sua difusão nas pesquisas biomédicas (Andersen, *et al.*, 2004). Os ratos utilizados em pesquisas pertencem à espécie *Rattus norvegicus*, e a *Wistar*, uma linhagem não-endogâmica (*outbred*).

No cenário nacional, os laboratórios que utilizam ratos em projetos de pesquisa preferem trabalhar com machos. Esta preferência ocasiona um enorme problema nos biotérios, pois torna necessária a identificação do sexo em recém-nascidos e a imediata eliminação das fêmeas, na tentativa de diminuir o seu descarte mais tardio. Para aumentar a produção, os bioteristas optam por ninhadas de sete machos e uma fêmea, aumentando a necessidade de produção, pois é alta a quantidade de animais eliminados, gerando problemas éticos sérios. Esta composição de ninhadas pode, ainda, influenciar a prolificidade e a proporção de machos e fêmeas ao nascer. Braga *et al.* (2002), verificaram uma tendência de decréscimo na média do número de nascidos de fêmeas cujas ninhadas anteriores foram padronizadas para conter sete machos e uma fêmea, em relação às ninhadas com quatro fêmeas e quatro machos.

Nos biotérios nacionais, os ratos são fornecidos aos usuários com peso vivo, variando entre 200 a 300g, ou seja, com 2 a 3 meses de idade, o que significa que, após o desmame, com cerca de 50g, eles permanecem em estoque no biotério, ganhando peso por aproximadamente 60 a 70 dias. Com o objetivo de produzir animais sempre nessa faixa de peso, procura-se obter desmames homogêneos e com pesos mais elevados para que o tempo de espera, possa ser cada vez menor, diminuindo os espaços físicos destinados ao estoque. Esta meta deve ser alcançada através de ferramentas que

não resultem em seleção, uma vez que, manter as colônias o mais próximo possível do seu padrão de origem, é um requisito primordial no bioterismo e o peso vivo, uma característica de herdabilidade média a alta (Falconer, 1981). A saída neste caso, é manejar a fêmea da colônia de produção, pois, desta colônia, não são retidos exemplares para perpetuação, assim, tudo que é produzido, é fornecido aos usuários.

No estudo dos animais destinados à produção de alimentos, encontramos disponível, muita literatura nacional e internacional sobre técnicas de produção, sistemas de acasalamentos intensivos e extensivos, confinados ou não, sistemas permanentes e rotacionais de reprodução para todas as espécies e até para raças em particular. No caso da produção de animais de laboratório, acontece um paradoxo, existem animais produzidos através de modernos recursos da biotecnologia, como os OGM (Organismos geneticamente modificados), transgênicos, *knock-out* (animais que têm genes suprimidos) de acordo com a necessidade do estudo de determinadas patologias. Porém, o uso destes animais ainda não é a maior demanda da comunidade nacional. A grande produção científica brasileira, é realizada com animais oriundos de colônias endogâmicas ou heterogâmicas tradicionais existentes no país. Nos grandes biotérios brasileiros, a produção de roedores é sempre muito alta, devido à necessidade destes animais para pesquisa científica, produção de imunobiológicos, controle de qualidade e mesmo alimentação de outras espécies.

O Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) determinou, no artigo IV de seus Princípios Éticos de Pesquisa, de 1988 que: “Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriadas e apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o número mínimo necessário para obtenção de resultados válidos”.

Para reduzir, é necessário conhecer o desempenho reprodutivo e a resposta dos animais aos diferentes ritmos reprodutivos. Não se dispõe de justificativas científicas para as técnicas de produção utilizadas atualmente, elas foram adotadas de forma empírica. Cada biotério realiza acasalamentos em sistemas distintos: alguns utilizam acasalamentos monogâmicos intensivos durante um ano, isto é, a fêmea permanece na produção por aproximadamente sete partos. Outros utilizam acasalamentos poligâmicos (2 fêmeas e 1 macho) intensivos. Há alguns, que adotam o sistema poligâmico rotativo, permitindo o descanso das fêmeas durante o período de lactação.

Duas ferramentas de manejo podem ser trabalhadas com o objetivo de tornar a produção animal mais eficiente: o ritmo reprodutivo e a formação dos grupos para reprodução.

A hipótese deste experimento foi avaliar se o sistema de produção Monogâmico, onde se tem um macho para cada fêmea durante todo ciclo reprodutivo, realmente é a melhor ferramenta para produção de maior número de ratos, com peso ao desmame mais elevados e uniformes.

O objetivo deste trabalho concentra-se em avaliar a produtividade e uniformidade de peso entre três sistemas de produção de ratos mais utilizados nos biotério nacionais: Sistema Monogâmico, Sistema Poligâmico Permanente e Sistema Poligâmico Temporário.

Material e Métodos

Local e Instalações

O experimento foi realizado na Área de Produção de Ratos *Wistar* do Biotério Central do Instituto Butantan – SP – Brasil. As salas dos animais apresentam fluxo de pessoas e insumos definido, e são protegidas com barreiras sanitárias (autoclave de barreira, sistema de filtração de ar, diferencial de pressão). A temperatura ambiente é controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, existe sistema de exaustão na altura das gaiolas, impedindo a dispersão da amônia no ambiente, ocorrem 15 a 20 trocas de ar/h e o ciclo de luz é definido (12L:12D). Todo o sistema é ligado a um gerador, que garante a manutenção do seu funcionamento em caso de falta de energia elétrica. Este experimento utilizou uma sala com capacidade de aproximadamente 60 gaiolas.

Manejo Geral

O modelo biológico, foi o Rato *Wistar*, oriundo da colônia de multiplicação do Setor de Ratos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais são de padrão sanitário controlado, mantidos em gaiolas de polipropileno, medindo 49 X 31 X 21cm, que permitem livre acesso à água potável e a ração. As gaiolas foram forradas com cama de maravalha autoclavada. A rotina de manejo dos animais compreendeu duas trocas semanais de gaiola e água fresca três vezes por semana. A ração utilizada foi a peletizada, comercial, Nuvital[®], com os seguintes níveis de garantia: proteína bruta mínima de 22%, matéria fibrosa máxima de 8%, umidade máxima de 12,5%, extrato

etéreo mínimo de 4%, material mineral máximo de 10%, cálcio máximo de 1,4% e fósforo mínimo de 0,8%. De acordo com o fabricante, a fórmula obedece às recomendações do *National Research Council e National Institute of Health* (1996), para a espécie e foi oferecida *ad libitum*. Todos os procedimentos obedeceram às recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2003).

Protocolo experimental

Sessenta fêmeas nascidas em setembro e 40 machos nascidos em agosto de 2005, todos da linhagem *Wistar*, foram acasalados, quando as fêmeas completaram 90 dias de idade. Os machos tiveram a fertilidade comprovada, anteriormente, ao seu uso no experimento. Três grupos foram formados: Monogâmico (MG): 20 casais, um por gaiola, em sistema intensivo, isto é, os casais foram formados aos 90 dias de idade e ficaram nessa composição, por toda a vida reprodutiva; Poligâmico permanente (PP): 20 fêmeas acasaladas poligamicamente, em sistema intensivo, assim, alojadas em 10 gaiolas contendo duas fêmeas e um macho cada, desde os 90 dias até o final da vida reprodutiva; Poligâmico temporário (PT): 20 fêmeas foram acasaladas aos 90 dias de idade até o fim da vida reprodutiva em sistema poligâmico rotativo de macho, ou seja, o macho permaneceu na gaiola com duas fêmeas até à certificação da prenhez, em seguida foram retirados da gaiola, retornando após o desmame das ninhadas. Foi definido, como vida reprodutiva, seis partos da fêmea, ou seja, após a certificação da sexta prenhez foram retirados os machos e as fêmeas de todos os sistemas pariram a última ninhada sozinhas, sem o macho. As ninhadas foram niveladas ao nascer, permanecendo oito filhotes por matriz. No caso das fêmeas, que pariram mais de oito filhotes, o critério de formação das ninhadas adotado foi o de quatro machos e quatro fêmeas. Os excedentes foram eliminados. Este ajuste de ninhada foi considerado no cálculo da mortalidade dos filhotes do nascimento a desmama. Calculou-se a mortalidade dos filhotes multiplicando-se o número de partos pelo valor de ajuste (oito filhotes) e subtraindo-se deste resultado, o número de filhotes desmamados. O registro do número de nascidos foi feito no dia do parto, porém, as pesagens das ninhadas foram realizadas no dia seguinte ao parto, momento em que se fazia a identificação do sexo dos filhotes e o nivelamento das ninhadas. Os animais foram pesados ao nascer e a desmama ocorreu aos 21 dias de idade.

Durante todo o período de vida reprodutiva das fêmeas, foram avaliadas características reprodutivas como: número de partos, número de ninhadas por gaiola, desempenho das ninhadas ao nascer (número de nascidos totais e peso da ninhada ao nascer) e a desmama (número de desmamados, peso da ninhada ao desmame, peso individual à desmama e mortalidade pré-desmame).

As medidas de uniformidade da produção adotadas foram o número e a porcentagem de filhotes desmamados (por gaiola) cujo peso, se encontrava no intervalo da média geral de todos os desmamados mais ou menos 10% (Robinson, *et al.*, 2006). Para isto, computou-se a média geral do peso individual à desmama e em, seguida, o número total de filhotes desmamados por gaiola cujo peso, se enquadrava no intervalo definido. Denominou-se TDF, o número médio de dias para produzir um filhote desmamado, que foi calculado, dividindo-se o número de dias do ciclo completo de produção, pelo número de filhotes desmamados, por gaiola em cada sistema.

A gaiola foi considerada como a unidade experimental. As análises estatísticas foram efetuadas, usando o procedimento GLM do SAS (2001). O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento (sistema) e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Resultados

A média geral do peso individual à desmama foi de $49,58 \pm 7,01$ g, portanto, o Intervalo de Uniformidade, que compreendeu os valores 10% acima e 10% abaixo da média de peso geral à desmama foi de 44,62 g a 54,54 g.

A produtividade numérica e o desempenho de ninhadas por gaiola até à desmama, nos três diferentes sistemas de produção, são apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Detectou-se efeito do sistema de produção sobre nascidos totais, nascidos vivos, número de desmamados, peso da ninhada ao nascimento, peso da ninhada a desmama ($P < 0,0001$), (Tabela 1). Peso da ninhada a desmama médio ($P < 0,0006$), número de desmamado médio ($P < 0,0583$), número de filhotes desmamados com peso dentro do intervalo de uniformidade ($P < 0,001$), (Tabela 2). Não foi observado efeito de tratamento sobre a porcentagem de filhotes desmamados com peso dentro do intervalo

de uniformidade (PUNIF), nascidos totais médio, nascidos vivos médio e peso da ninhada ao nascimento médio.

O tratamento MG, iniciou o experimento com 21 gaiolas, o PP e o Poligâmico temporário PT com 12 gaiolas cada. Todos os grupos foram iniciados (acasalados) na mesma data e o intervalo de tempo (dias), entre o primeiro dia do acasalamento e a desmama da última ninhada, como esperado, diferiu entre eles. O grupo PT apresentou o maior intervalo 262,50 dias, o PP 191,75 dias e o MG 156,29 dias. O número médio de dias, para produzir um filhote desmamado por gaiola, também diferiu entre os sistemas. O sistema MG apresentou o maior intervalo ($4,2 \pm 0,20$ d), o PT foi semelhante ($3,2 \pm 0,26$ d) ao sistema MG ($2,9 \pm 0,26$ d).

Ao longo do experimento, a taxa de mortalidade das fêmeas oscilou entre os tratamentos. O grupo MG apresentou taxa de 4,76% (1/21), o PP 16,66% (4/24) e o PT não registrou morte de fêmea. O número de filhotes mortos do nascimento à desmama, apresentou diferença entre os sistemas (Tabela 1). Avaliando a Tabela 1, podemos notar que o grupo PT apresentou valores superiores às características de produtividade numérica e de desempenho de ninhadas até a desmama.

O peso total à desmama médio e o número médio de desmamados foram superiores para o grupo PT, porém não diferiram entre os outros dois grupos (Tabela 2).

Discussão

Os resultados encontrados devem ser analisados sob vários aspectos, como: produtividade por gaiola, espaço físico necessário, funcionalidade de manejo, uniformidade à desmama, viabilidade econômica, tempo para produção e bem-estar animal.

Quanto à produtividade por gaiola, o sistema PT se destacou. Este grupo apresentou os melhores valores para as características: nascidos totais, nascidos vivos, número de filhotes desmamados dentro do intervalo de uniformidade, peso da ninhada ao nascimento, quando comparado ao sistema PG. Para as características: número de desmamados, peso da ninhada a desmama, peso total a desmama médio e número de desmamados médio, ele foi superior em relação ao sistema PP. Ressaltando que, dentre todas as variáveis analisadas, para as quais foram detectadas diferenças significativas, o

sistema PT obteve os melhores resultados. E, quando comparamos as médias, pelos testes *t* e Tukey, verificamos que os valores do sistema PT, são sempre, os mais desejáveis.

Confrontando os valores da característica mortalidade dos filhotes, em relação à quantidade de filhotes desmamados com peso dentro do intervalo de uniformidade (NUNIF), constatamos a superioridade do sistema PT, em relação ao sistema MG. Outro ponto de extrema relevância favorecendo o sistema PT, foi a ausência de mortalidade de fêmeas durante todo ciclo reprodutivo. Dentro dos atuais conceitos de bem-estar animal, este sistema parece demonstrar o uso adequado do potencial animal, respeitando-se o estado fisiológico requerido para cada evento, seja prenhez ou lactação.

O peso médio da ninhada ao nascimento, o número médio de nascidos totais e o número médio de nascidos vivos, não diferiram entre os sistemas de produção. Isto demonstrou que, todos os três sistemas apresentaram ninhadas equivalentes, quanto ao número e ao peso dos filhotes ao nascer. Já na desmama, o grupo PT apresentou uma diferença média em valores absolutos de 915,38g no total de ninhadas no ciclo completo de produção. Inicialmente, era esperado que o sistema MG apresentasse peso a desmama dos filhotes mais elevado que o do sistema PP, devido às condições de densidade populacional na gaiola, mas, isto não ocorreu. Acredita-se que, tenha sido decorrência de uma fêmea adotar os filhotes de outra, nos sistemas poligâmicos, possibilidade essa, que não existe no sistema MG.

Nestas condições, poderíamos concluir que o sistema PT seria o mais viável. Porém, quanto ao espaço físico, este sistema necessita de quantidade adicional de gaiolas, equivalente à metade do número das de fêmeas em aleitamento, para alojar os machos, pois durante este período, os machos ficam alojados, individualmente, em outras gaiolas. Uma opção, para contornar ou superar esta dificuldade de espaço físico, poderia ser adotada pelos biotérios mantendo um grande número de fêmeas em produção. Neste caso, é possível fazer o remanejamento dos machos entre as gaiolas das fêmeas, ou seja, é necessário um cronograma de acasalamentos, propiciando um intervalo, permitindo retirar os machos das gaiolas de um grupo de fêmeas com prenhez confirmada, para as gaiolas das fêmeas que estão para desmamar seus filhotes. Desta forma, os machos não ocupariam gaiolas adicionais, mas, seguiriam um rodízio programado entre as gaiolas de diferentes grupos de fêmeas. Uma outra limitação para o

sistema PT, que deve ser considerada, é a exigência e critério de manejo, devido à constante necessidade do remanejamento dos machos.

Quanto à porcentagem de filhotes desmamados com peso dentro do intervalo de uniformidade (PUNIF), não houve diferença entre sistemas. Em relação ao número de animais desmamados, dentro do intervalo de uniformidade (NUNIF), não houve diferença entre PT e PP, mas ambos diferiram de MG.

O sistema PP, apesar de não ter diferido, significativamente, do sistema PT para as características: nascidos totais, nascidos vivos, NUNIF, peso da ninhada ao nascimento e TDF, foi o sistema que apresentou a maior mortalidade de filhotes e de fêmeas. Provavelmente, essa mortalidade deva ser consequência de duas situações: primeiro, a presença do macho por todo tempo na gaiola, diminuindo o espaço disponível por animal, uma vez que, é o maior animal dentro da gaiola e, proporcionalmente, aumentando a densidade de animais na mesma. A segunda, o desgaste da fêmea, que por apresentar cio pós-parto e ser coberta pelo macho neste primeiro estro, inicia uma nova gestação enquanto aleita uma ninhada. No Brasil, não se trabalha com dietas especiais para estes casos, mas seria desejável dispor de rações com densidade de nutrientes diferentes nos vários estágios do ciclo de vida, especialmente, para as fases de crescimento, gestação ou lactação.

O sistema MG apresentou maior média de TDF (4,21 d). Analisando os resultados obtidos no sistema MG, em relação aos outros dois sistemas, e considerando o espaço físico utilizado para esta produção, os sistemas PT e PP apresentaram respostas reprodutivas superiores. Apesar do sistema MG não ter uma alta densidade animal, e de ter sido realizado o limite de ninhada ao nascimento, o peso médio da ninhada ao desmame, foi inferior. Como já relatado, este sistema não possibilita a adoção de filhotes, logo, uma fêmea, com um comportamento materno menos exacerbado, compromete o aleitamento das ninhadas.

Apesar de não ter sido realizada análise econômica, é fácil perceber que o sistema PT representa uma economia considerável, pois, maximiza a capacidade reprodutiva do macho, ou seja, o mesmo macho pode ser usado para cobrir várias fêmeas, reduzindo o número de machos utilizados para reprodução, o espaço físico e o custo de produção.

Em relação aos aspectos que envolvem bem-estar animal, é bom salientar que, embora os animais tenham alto padrão sanitário, condições ambientais e nutricionais controladas e adequadas à espécie, a densidade populacional deve ser considerada como um fator que elevou a mortalidade das fêmeas e dos filhotes.

Conclusão

O sistema de produção poligâmico temporário pode ser recomendado para produção de ratos, quando se tem, como objetivo, o desempenho de ninhadas, principalmente, em relação ao desmame de animais com peso mais alto e uniforme.

Os resultados obtidos pelo sistema poligâmico temporário devem ser utilizados como uma ferramenta de manejo, adequada aos preceitos de bem-estar animal, uma vez que, aumenta-se a produção, respeitando-se a biologia das fêmeas, diminuindo sua mortalidade e de seus filhotes. Quanto ao fator econômico, este sistema torna o custo de produção menor, pois possibilita o aproveitamento dos machos de uma forma mais racional, respeitando sua fisiologia e capacidade de fertilização de várias fêmeas no mesmo ciclo reprodutivo. A única ressalva que fazemos, é a necessidade de maior mão de obra mais qualificada para o manejo deste sistema.

Bibliografia:

ANDERSEN, M.L; D'ALMEIDA; V.;KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES.L.E; TUFIK, S. Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. 2004. 179p

BRAGA, L.M.; OLIVEIRA, G.M.; SESTERHEIM, P. Influência da sexagem precoce no tamanho da futura ninhada de *Rattus norvegicus*. **Revista da Patologia Tropical**, v.31 sup.2 ,2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA); Acessado em: www.cobea.org.br.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care (CCAC), 1984.v.1 120p.

DONALDSON, H. H., The rat, Memoirs of the Wistar Institute of Anatomy and Biology., No. 6, Philadelphia, 1915.

FALCONER, D.S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1981. 279p.

Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research 2003. In: **Anesthesia and Analgesia** - Institute for Laboratory Animal Research, The National Academies Press 2003.

National Institute of Mental Health (2002). Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals: Report of a National Institutes of Health Workshop. Morrison AR; Evans HL; Ator NA; Nakamura RK (eds). NIH Publication No. 02-5083. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

[Rat Genome Sequencing Project Consortium](#), Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution , *Nature* 428, 493-521 (1 April 2004) | doi: 10.1038/nature 02426

ROBINSON, F.E.; RENEMA, R.A.; ZUIDHOF, M.J. Otimização a Eficiência Reprodutiva de Matrizes Pesadas Modernas: O papel do fornecimento de ração e da foto-estimulação. Anais da Conferencia APINCO de Ciência e Tecnologia – p 317- 324 Santos – SP Maio de2006.

SAS User's Guide Statistics. Statistical Analyses System Institute, Inc. Versão 8.02, Cary, NC. 2001.

Tabela 1: Produtividade relativa ao ciclo completo de produção por gaiola ao nascer e a desmama, de acordo com o sistema de produção

Características	Tratamentos*			Valor de P
	Monogâmico	Poligâmico Permanente	Poligâmico Temporário	
Nascidos totais	57,38 ± 4,23 ^a	109,67 ± 5,59 ^b	117,17 ± 5,59 ^b	0,0001
Nascidos vivos	57,09 ± 4,20 ^a	107,42 ± 5,56 ^b	117,67 ± 5,56 ^b	0,0001
Desmamados	38,09 ± 2,52 ^a	69,58 ± 3,33 ^b	82,66 ± 3,33 ^c	0,0001
NUNIF ¹	12,14 ± 1,63 ^a	23,58 ± 2,15 ^b	28,75 ± 2,15 ^b	0,0001
Peso da ninhada ao nascimento (g)	405,40 ± 27,26 ^a	727,48 ± 36,06 ^b	798,43 ± 36,06 ^b	0,0001
Peso da ninhada a desmama (g)	1799,73 ± 119,81 ^a	3395,73 ± 158,50 ^b	4311,13 ± 158,50 ^c	0,0001
PUNIF % ²	31,54 ± 2,53	34,02 ± 3,34	34,26 ± 3,34	0,7548
Mortalidade dos ³ filhotes	6,48 ± 1,21 ^a	13,08 ± 1,59 ^b	6,67 ± 1,69 ^a	0,0045
TDF ⁴	4,21 ± 0,20 ^a	2,92 ± 0,26 ^b	3,22 ± 0,26 ^b	0,0004

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

¹ NUNIF= N°de filhotes desmamados com peso dentro do intervalo de uniformidade.

² PUNIF= Porcentagem de filhotes desmamados com peso dentro do intervalo de uniformidade.

³ Número de filhotes mortos do nascimento a desmama no período total em cada gaiola.

⁴ TDF = Tempo em dias para produzir um filhote desmamado por gaiola.

Tabela 2: Produtividade média relativa ao ciclo completo de produção por gaiola e por ninhada ao nascer e a desmama de acordo com o sistema de produção.

Características	Tratamentos*			Valor de P
	Monogâmico	Poligâmico Permanente	Poligâmico Temporário	
Nascidos totais médio ¹	10,13 ± 0,34	10,63 ± 0,45	10,47 ± 0,45	0,6499
Nascidos vivos médio ¹	10,07 ± 0,35	10,43 ± 0,47	10,48 ± 0,47	0,7262
Peso da ninhada ao nascimento médio (g) ¹	71,65 ± 2,10	70,88 ± 2,77	71,43 ± 2,77	0,9757
Peso da ninhada a desmama médio (g) ¹	322,69 ± 9,34 ^a	332,82 ± 12,36 ^a	386,57 ± 12,36 ^b	0,0006
Número de desmamados médio ¹	6,79 ± 0,16 ^a	6,78 ± 0,21 ^a	7,39 ± 0,21 ^b	0,0583

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

¹Obtidos pela razão entre o valor total da gaiola e número de ninhadas produzidas em cada gaiola.

CAPÍTULO V

Implicações

Você precisa fazer aquilo que pensa que não é capaz de fazer.

Eleanor Roosevelt

IMPLICAÇÕES

A restrição alimentar quantitativa, na fase pré-acasalamento, não apresentou efeitos favoráveis sobre o desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* no primeiro ciclo de produção. Porém, a restrição quantitativa na fase pós-acasalamento, pode ser considerada favorável, em relação aos custos do sistema de produção porque não apresentou efeito negativo sobre o desempenho reprodutivo.

Pode-se fazer uso do odor do macho na maravalha para induzir mais rapidamente o estro de ratas, uma vez que no dia-a-dia dos biotérios é grande a quantidade de fêmeas que necessitamos sincronizar.

A produção de animais de laboratório dentro dos novos conceitos de bem estar animal requer o desenvolvimento de técnicas mais viáveis de produção, que respeitem a biologia dos animais. O sistema poligâmico temporário deve ser utilizado nas Colônias de Produção de ratos como uma ferramenta de manejo adequada aos preceitos de bem-estar animal, uma vez que aumenta a produção respeitando-se a biologia das fêmeas, diminuindo sua mortalidade e de seus filhotes. Quanto ao fator econômico, este sistema torna o custo de produção menor, pois possibilita o aproveitamento dos machos de uma forma mais racional, respeitando sua fisiologia e capacidade de fertilização de várias fêmeas no mesmo ciclo reprodutivo.