

CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM RAÇÃO COMERCIAL AUTOCLAVÁVEL DE
DIFERENTES MARCAS**

por

KÁTIA TEIXEIRA DOS REIS

BELO HORIZONTE - MG

Março / 2008

**COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM RAÇÃO COMERCIAL AUTOCLAVÁVEL DE
DIFERENTES MARCAS**



Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Kátia Teixeira dos Reis

Orientador: Dr. Alvaro José Romanha - Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular - CPqRR/FIOCRUZ

Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli - Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos do Departamento de Microbiologia - ICB / UFMG

Colaboradores:

Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva - Escola de Nutrição / UFOP

Dr. Omar dos Santos Carvalho - Laboratório de Helmintoses Intestinais - CPqRR/FIOCRUZ

Dra. Ana Carolina Peixoto Teixeira - Biotério do CPqRR/ FIOCRUZ

Belo Horizonte – MG
Março / 2008

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R375c
2008

Reis, Kátia Teixeira dos.

Comparação do desenvolvimento de camundongos alimentados com ração comercial autoclavável de diferentes marcas / Kátia Teixeira dos Reis. – Belo Horizonte, 2008.

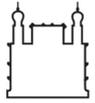
xvii, 140 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 108 - 114

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Camundongos/Crescimento & desenvolvimento 2. Ração animal/análise 3. Ração animal/utilização 4. Dieta/tendências 5. Dieta/métodos I.Título. II. Romanha, Álvaro José (Orientação). III. Nicoli, Jacques Robert (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.027 333



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Esta dissertação intitulada:

**COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM RAÇÃO COMERCIAL AUTOCLAVÁVEL DE
DIFERENTES MARCAS**

apresentada por:

Kátia Teixeira dos Reis

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Vera Maria Peters

Dr. Ênio Cardillo Vieira

Suplente: Dra. Patrícia Martins Parreiras

Dissertação defendida e aprovada em 31 de Março de 2008.

Aos meus queridos pais que sempre me incentivaram a nunca desistir de um sonho e sempre serão a razão de tudo! Ao meu querido “vô João” que se orgulhou de cada passo que dei na vida. Você se foi, mas estará sempre presente nos meus pensamentos como um exemplo de força e juventude!

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim como em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus por todos os dias da minha vida e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

Ao meu querido Douglas, de quem tenho um enorme orgulho de ser irmã!

À Antônia por ter feito os dias do meu avô mais felizes! Obrigada!

Ao Dr. Alvaro José Romanha, pela orientação, por acreditar na possibilidade da realização deste trabalho e pelo exemplo de profissionalismo que sempre admirei desde quando cheguei a essa Instituição!

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pela orientação, pelos ensinamentos não só profissionais, mas de caráter, trabalho em equipe e por ter aberto as portas do seu laboratório na UFMG para o que fosse necessário na realização deste trabalho.

À Dra. Ana Carolina Peixoto Teixeira pela colaboração, amizade e boa vontade em repassar de forma tão espontânea e clara os seus conhecimentos sobre microbiologia que certamente me auxiliaram muito no decorrer do trabalho. “Calú”, você chegou aqui na hora certa!

Ao Dr. Omar dos Santos Carvalho pela colaboração, sugestões, pela confiança a mim creditada e por permitir a utilização do Laboratório de Helminthoses sempre que necessário!

Ao Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva, pela dedicação pessoal na realização das análises composicionais das rações na Escola de Nutrição da UFOP.

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação do IRR/FIOCRUZ, Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, pela atenção a mim dedicada sempre quando necessário.

Ao Vice- Coordenador do Programa de Pós Graduação do IRR/FIOCRUZ, Dr. Paulo Marcos Zech Coelho pelo incentivo e por ter acreditado em mim! Obrigada professor!

Ao Dr. Roberto Sena Rocha por sempre ter me apoiado na trajetória profissional e acadêmica.

À minha grande amiga e irmã do coração, Tânia, pelo incentivo e estímulo constantes na minha vida profissional, pessoal, pelo carinho e presença em todos os momentos desde que a conheci! Obrigada a você minha querida amiga e as suas filhotas Mari, Dudula e Gabi por me permitirem participar de suas vidas em momentos tão agradáveis! Não poderia deixar de agradecer ao Marcos pela atenção a mim dedicada e por fazer à minha amiga irmã tão feliz! Vocês moram no meu coração!

Ao Celso pelo carinho, incentivo, amizade e pelos bons momentos compartilhados em que rimos muito! Valeu!

Ao Dr. Alexandre Barbosa Reis, pela disponibilidade em levar à UFOP as amostras de rações a serem analisadas.

Ao João Luiz Moreira e ao Dr. Álvaro Cantini pela disponibilidade e boa vontade no auxílio das análises referentes à Biologia molecular.

À Dra. Roberta Lima Caldeira, pelos ensinamentos preciosos relacionados à Biologia Molecular!

À Anna Carolina Lustosa da Bioestatística pelo profissionalismo e grande apoio neste trabalho! À Isabella Fernandes de oliveira, que me auxiliou já no final das análises estatísticas e tem se revelado uma grande profissional.

À equipe de informática e em especial ao Leandro Scott Rocha que colaborou na formatação do projeto.

À Dani, minha prima tão querida, obrigada pelo carinho! Você é muito especial!

À minha grande amiga Laiza, pelas boas risadas de tantas situações hilárias que passamos juntas e também pelos momentos difíceis em que esteve do meu lado!

À Rosana Alves, obrigada pelo estímulo constante! Conte comigo sempre!

À “Létice” pela torcida constante! O orgulho que sinto pela sua coragem em buscar novos horizontes é muito maior do que a saudade!

À Aline Magalhães pela amizade, positivismo e pelos momentos tão divertidos que compartilhamos!

À Ivanete, pela atenção e estímulo nesta trajetória!

À minha amiga e mais nova bioterista “Fê”, pela colaboração nas análises parasitológicas desenvolvidas neste trabalho, pelo carinho e disponibilidade! Você mora no meu coração!

À Patrícia Parreiras pelo bom convívio, pelo coleguismo e disponibilidade em ajudar sempre quando necessário!

Aos colegas do biotério: Jaci, Marcílio, Dona Vera, Moisés, Douglas e Vera por colaborarem tanto na realização deste trabalho. Sem vocês seria mais difícil!

Ao meu colega do biotério, Wanderley, pelo cuidado com os animais e principalmente pela amizade a mim dedicada!

À equipe da CME Vinícius, Eliana e Suraia pelo apoio que foi fundamental!

À minha “família” do coração, Janinha, Luiz, Breno, Luiza, Salzinha e Dé pelos momentos tão felizes que passamos juntos, pelo carinho e amizade! Adoro vocês!

À Dra. Zélia Profeta por ter confiado na minha carreira como bioterista desde quando cheguei ao Instituto René Rachou.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de microorganismos do depto de microbiologia da UFMG: Glauciane, Aline Matos, Fabiana, Ariane, Danielle, Silvia Crispim, Flaviano, Flavinha, Leandro, Tássia e todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada! Vocês são muito solícitos!

Ao técnico Bernardo, do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de microorganismos, UFMG, pela assistência e atenção durante a minha permanência no laboratório.

Aos meus colegas e amigos do mestrado: Mairinha, Grasi, Luti, “Carolzinha da Química” e à galera do Doutorado, Ana Vitta, Fernandinho, Vanessa e Dudu e todos aqueles que não mencionei e que tornaram esta caminhada mais agradável!

Às secretárias Cristiane Pinheiro e Andréa Dias, do Programa de Pós-Graduação, pela assistência e atenção sempre quando necessário!

À secretária do Núcleo de Apoio Técnico Científico, Sandra Carvalho, pelo apoio constante. Muito obrigada!

Ao Bibliotecário, Segemar, pelo profissionalismo e atenção na realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ pelo auxílio financeiro e pela oportunidade de ter sido liberada, como servidora, para fazer o mestrado.

À Rede Mineira de Bioterismo pelo apoio na melhoria das condições de infra-estrutura dos biotérios do IRR-FIOCRUZ.

Aos animais, protagonistas deste estudo e que cada vez mais contribuem para os avanços no campo da ciência biomédica, a eles todo o meu respeito e consciência ética!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
I – INTRODUÇÃO	19
II – REVISÃO DE LITERATURA	21
II.1 – Necessidades nutricionais preconizadas para a dieta de camundongos de laboratório.	22
II.2 Tipos de dietas.....	26
II.3 Influência da esterilização da ração sobre os seus componentes nutricionais e suas transformações sob condições de processamento e armazenamento	27
II.4 Importância das proteínas e outros componentes da ração no desenvolvimento e fisiologia do animal.....	31
II.5 – Ocorrência de endoparasitos em colônias convencionais de animais de laboratório.....	36
II.6 – Microbiota intestinal de camundongos de laboratório.....	40
III - JUSTIFICATIVA.....	45
IV - OBJETIVOS.....	47
IV .1 - Objetivo Geral	48
IV . 2 - Objetivos Específicos.....	48
V – MATERIAIS E MÉTODOS	49
V. 1- Rações	50
V. 2 - Análise composicional	51
V. 3 - Animais.....	51
V. 4 - Desenho experimental	52
V. 5 – Análise Clínica e Reprodutiva	53
V. 6– Análise Parasitológica	54
V.7 - Análise Microbiológica	55
V.7.1 – Identificação das enterobactérias.....	56
V.7.2 – Identificação dos <i>Lactobacillus</i>	57
V.7.2.1 – Extração de DNA	57
V.7.2.2 – Amplificação da região espaçadora intergênica 16S – 23S do gene do RNA ribossomal.....	58
V.7.2.3 – Digestão com enzimas de restrição.....	60
V.7.2.4 – Sequenciamento	61
V.8 – Análises Estatísticas	62
V. 9 - Considerações Éticas.....	62

VI – RESULTADOS	63
VI.1 Análise da composição nutricional das diferentes marcas de rações comerciais autoclaváveis	64
VI.2 - Avaliação da capacidade reprodutiva dos camundongos alimentados com as diferentes rações	66
VI.3 – Análise do desenvolvimento ponderal dos camundongos das gerações F0, F1 e F2	67
VI.4 – Avaliação do peso relativo do baço, fígado, rins, pulmão e coração de camundongos com 30 e 50 dias de idade alimentados com as diferentes rações comerciais.....	71
VI.5 - Ocorrência de endoparasitos em camundongos das gerações F0, F1 e F2, com 30 e 50 dias de idade, alimentados com diferentes rações comerciais.	78
VI.6 – Nível populacional de bactérias nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações	85
VI.7 – Identificação das enterobactérias isoladas nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações	90
VI.8 – Identificação dos lactobacilos isolados nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações comerciais.....	92
VII – DISCUSSÃO	96
VII. 1 - Composição nutricional das rações	97
VII.2 - Capacidade reprodutiva dos camundongos alimentados com as diferentes rações.....	100
VII.3 - Desenvolvimento ponderal dos camundongos das gerações F0, F1 e F2.....	101
VII.4 – Avaliação do peso relativo de órgãos de camundongos com 30 e 50 dias de idade, alimentados com as diferentes rações.	103
VII.5 - Ocorrência de endoparasitos em camundongos alimentados com as diferentes rações.....	104
VII.6 - Nível populacional de bactérias nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações	104
VIII - CONCLUSÕES	106
IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
X- ANEXOS	115
ANEXO 1 - PARECER DO CEUA.....	116
ANEXO 2 – Análise da composição nutricional do primeiro lote de rações Fabricação: Novembro 2006	117
ANEXO 3 – Análise da composição nutricional do segundo lote de rações Fabricação: Abril 2007.....	118
ANEXO 4 – Análise da composição nutricional do terceiro lote de rações Fabricação: Julho 2007	119
ANEXO 5 – Análise da composição nutricional do quarto lote de rações Fabricação: Setembro 2007	120
ANEXO 6: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos da geração F0 alimentados com diferentes rações comerciais.....	121
ANEXO 7: Desenvolvimento ponderal de camundongos fêmeas da geração F0 alimentados com diferentes rações comerciais.....	121

ANEXO 8: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos da geração F1 alimentados com diferentes rações comerciais.....	122
ANEXO 9: Desenvolvimento ponderal de camundongos fêmeas da geração F1 alimentados com diferentes rações comerciais.....	122
ANEXO 10: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos da geração F2 alimentados com diferentes rações comerciais.....	123
ANEXO 11: Desenvolvimento ponderal de camundongos fêmeas da geração F2 alimentados com diferentes rações comerciais.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rações comerciais autoclaváveis para roedores preparadas para o processo de autoclavagem.....	50
Figura 2: Nematódeo oxiurídeo <i>Syphacia obvelata</i>	55
Figura 3: Kit API 20E (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, França).	57
Figura 4: Desenho esquemático da região espaçadora intergênica (ISR) 16S – 23S do rDNA mostrando o local onde ocorre o anelamento dos iniciadores.....	59
Figura 5: Desenho esquemático da região espaçadora intergênica do rDNA, subunidades 16S-23S.....	60
Figura 6: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos e fêmeas da geração F0 alimentados com diferentes rações comerciais.	68
Figura 7: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos e fêmeas da geração F1 alimentados com diferentes rações comerciais	69
Figura 8: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos e fêmeas da geração F2 alimentados com diferentes rações comerciais.	70
Figura 9: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos machos com 30 dias de idade pertencentes à F0	71
Figura 10: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos machos com 50 dias de idade pertencentes à F0	72
Figura 11: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos fêmeas com 30 dias de idade pertencentes à F0	72
Figura 12: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos fêmeas com 50 dias de idade pertencentes à F0	73
Figura 13: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos fêmeas com 30 dias de idade pertencentes à F1	74
Figura 14: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos fêmeas com 50 dias de idade pertencentes à F1	75
Figura 15: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos machos com 30 dias de idade pertencentes à F1	75
Figura 16: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos machos com 50 dias de idade pertencentes à F1	76
Figura 17: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos fêmeas com 30 dias de idade pertencentes à F2	76

Figura 18: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos fêmeas com 50 dias de idade pertencentes à F2	77
Figura 19: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos machos com 30 dias de idade pertencentes à F2	77
Figura 20: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos machos com 50 dias de idade pertencentes à F2	78
Figura 21: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F0 com 30 dias de idade.....	85
Figura 22: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F0 com 50 dias de idade.....	86
Figura 23: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F1 com 30 dias de idade.....	87
Figura 24: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F1 com 50 dias de idade.....	87
Figura 25: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F2 com 30 dias de idade.....	88
Figura 26: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F2 com 50 dias de idade.....	89
Figura 27: Porcentagens de enterobactérias isoladas nas fezes de animais alimentados com as diferentes rações.....	91
Figura 28: Gel de Agarose (1,4%) mostrando a amplificação pela PCR do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de amostras de <i>Lactobacillus</i>	92
Figura 29: Gel de Agarose (1,4%) mostrando a digestão do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	93
Figura 30: Gel de Agarose (1,4%) mostrando a digestão do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de <i>Lactobacillus johnsonii</i>	94
Figura 31: Gel de Agarose (1,4%) mostrando a digestão do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de <i>Lactobacillus reuteri</i>	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulação da AIN-93G de uma dieta ideal para roedores, nas fases de crescimento, gestação e lactação.	25
Tabela 2 - Perfil de restrição dos produtos amplificados dos espaçadores longo, médio e curto da região intergênica 16S-23S do rDNA de <i>Lactobacillus</i>	61
Tabela 3 – Análise da composição nutricional dos 4 lotes de rações.	64
Tabela 4: Porcentagem de fêmeas prenhas por marca de ração.	66
Tabela 5: Número de filhotes (média \pm desvio padrão e mediana) por fêmeas das gerações F0, F1 e F2 por marcas de rações.	67
Tabela 6 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F0 aos 30 dias de idade alimentados com diferentes rações.	79
Tabela 7 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F0 com 50 dias de idade alimentados com diferentes rações.	80
Tabela 8 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F1 com 30 dias de idade alimentados com diferentes rações.	81
Tabela 9 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F1 com 50 dias de idade alimentados com diferentes rações.	82
Tabela 10 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F2 com 30 dias de idade alimentados com diferentes rações.	83
Tabela 11 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F2 com 50 dias de idade alimentados com diferentes rações.	84
Tabela 12 - Relação MRS / MC das Gerações F0, F1 e F2 com 30 e 50 dias.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN-93G	American Institute of Nutrition – Instituto Americano de Nutrição (Dieta elaborada em 1993 para animais em fase de crescimento).
AIN-93M	American Institute of Nutrition – Instituto Americano de Nutrição (Dieta elaborada em 1993 para animais adultos em fase de Manutenção).
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of official analytical chemist – Associação oficial de análise química. Métodos analíticos oficiais.
ARDRA	Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado
CCAC	Canadian Council on Animal Care – Conselho Canadense no cuidado com animal.
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNFB	dinitrofluorbenzeno
ENUT	Escola de Nutrição
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IRR	Instituto René Rachou
ISR	Região espaçadora intergênica
L-ISR	Região espaçadora intergênica longa
M	Molar
M- ISR	Região espaçadora intergênica média
M.O	Microscópio óptico
MC	agar McConkey
MRS	agar de Man, Rogosa e Sharpe

NRC	National Research Council – Conselho Nacional de Pesquisa
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ppb	Partes por bilhão
RFLP	Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
S- ISR	Região espaçadora intergênica curta
Sd	Desvio Padrão
SPF	Specific Pathogen Free – Animais isentos de microorganismos Patogênicos.
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama de fezes
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UV	Ultravioleta
V	Volts
µL	Micro litro

RESUMO

As condições de desenvolvimento dos animais de laboratório, tais como crescimento, reprodução, potencial genético e resposta a estímulos estão intimamente relacionadas com o fator nutricional e conseqüentemente com a composição da ração que ingerem. Para os centros de pesquisa, ensino ou de produção de imunobiológicos que utilizam modelos animais para seus ensaios experimentais é de extrema importância conhecer os procedimentos e as práticas dos fornecedores e fabricantes e a composição da ração para que haja controle da qualidade da dieta. O objetivo deste trabalho foi acompanhar e comparar o desenvolvimento de camundongos da linhagem **Swiss webster** durante três gerações, alimentados com quatro das principais rações comerciais autoclaváveis. Adicionalmente, comparamos a composição nutricional das rações entre elas e com as necessidades nutricionais preconizadas para camundongos. As rações foram codificadas em letras **A**, **B**, **C** e **D**. De um modo geral os resultados mostraram que após a autoclavação as rações se mantiveram dentro dos valores recomendados pelo Instituto Americano de Nutrição - 93G e daqueles descritos nos rótulos das embalagens. A composição porcentual dos nutrientes das rações quase não apresentou diferenças significativas, à exceção do teor de fibras que foi acima dos valores descritos pelos fornecedores. A capacidade reprodutiva, a prolificidade e o ganho de peso foram maiores nos animais alimentados com a ração **A** do que nos animais alimentados com a ração **D**. O ganho de peso foi igualmente observado em camundongos de ambos os sexos. Os animais alimentados com as rações **B** e **C** apresentaram resultados intermediários. Não observamos diferenças significativas no peso relativo de órgãos (nos sexos e idades avaliados), na ocorrência de endoparasitos e nem na microbiota intestinal dos animais alimentados com as diferentes rações. Baseado nos resultados acima, recomendamos a utilização da ração **A** para a alimentação de camundongos de laboratório.

Palavras - Chaves: ração, dieta, nutrição, desenvolvimento de camundongos de laboratório, microbiota intestinal, endoparasitos.

ABSTRACT

The conditions for development of laboratory animals, such as growth, breeding, genetic potential and response to stimuli are closely related to nutrition, therefore to the foodstuff given to those animals. It is extremely important to know the procedures followed by suppliers and producers of animal food, as well as its composition so that the high quality of the animals diet can be assured in centers of research, education and production of the immunobiologicals that use animal models for their experiments. The present work aims at accompanying and comparing the development of three generations of **Swiss Webster** mice considering the intake of the four brands of autoclavable animal foodstuff and to compare of the nutritional components of food among themselves and with the nutrition necessities told to best meet mice needs. The foods were given identified by letters as **A**, **B**, **C** and **D**. Overall the results have shown that, after the autoclaving the food compositions remained mostly according to American Institute of Nutrition (AIN-93G) recommendations and according to what is written in their labels. The analysis of the food nutrients composition presented almost no differences except for fibers that were above the limits established by the suppliers. Concerned to the number of pregnant females, offspring and pondered development, the animals fed with foodstuff **A** presented better results than the animals fed with food **D**. The animals fed with foods **B** and **C** presented intermediary results. The relative weights of the organs (in both sexes and at 30 and 50 days of age), occurrence of endoparasites and populational level of intestinal bacteria presented no significant differences for the animals fed with different brands of foodstuff. Altogether our results point towards the use of the **A** foodstuff brand for to laboratory animals.

Key-words: foodstuff, diet, nutrition, development of laboratory animals, intestinal microbyote, endoparasites.

I – INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório tem contribuído cada vez mais nos avanços em pesquisas relacionadas à área de Ciências Biomédicas, especialmente em estudos de anatomia, virologia, fisiologia, imunologia, dentre outros. Assim, torna-se imprescindível que os animais utilizados em diversos ensaios experimentais sejam produzidos e mantidos de acordo com os padrões de qualidade exigidos gradativamente nas pesquisas científicas e seguindo-se preceitos éticos. Há uma preocupação crescente com o bem estar animal e um dos fatores que contribuem significativamente para a manutenção dos animais em melhores condições é a qualidade da dieta que lhes é oferecida. Diante disso foram constituídas subcomissões da Comissão sobre Nutrição Animal do National Research Council, que elaboraram métodos detalhados de tratamento das necessidades nutricionais de animais de laboratório. Deve haver um critério rigoroso na compra, transporte, armazenamento e manipulação do alimento para evitar a introdução de parasitas, vetores potenciais de doenças (por exemplo, insetos e outras pragas) e contaminantes químicos nos locais onde o alimento é armazenado.

A nutrição apropriada às espécies animais contribui certamente para que estes tenham condições de atingir o seu potencial genético, de crescimento e especialmente responder de forma adequada aos estímulos experimentais aos quais é submetido sem que haja alterações na interpretação de resultados experimentais. Sabe-se que determinadas enfermidades nutricionais dos animais de laboratório tais como as decorrentes de deficiência vitamínica podem causar anorexia com perda de peso, diminuição do crescimento de camundongos, ulcerações na córnea, crescimento anormal dos ossos, dentre outros. Portanto, a deficiência em componentes da dieta poderá afetar as condições de desenvolvimento satisfatório do animal.

Neste trabalho foram comparados parâmetros de desenvolvimento em grupos de camundongos convencionais da linhagem *Swiss webster* alimentados com quatro marcas de rações comerciais autoclaváveis para roedores. Foi avaliada a qualidade nutricional dessas rações e o impacto que o fator nutricional exerce sobre o desenvolvimento dos animais sob alguns aspectos como, desenvolvimento ponderal, reprodutibilidade, prolificidade e susceptibilidade dos mesmos a determinadas infecções seja por microorganismos típicos de colônias convencionais (determinadas espécies de endoparasitos) e o impacto sobre a microbiota dos camundongos alimentados com marcas diferentes de rações comerciais .

II – REVISÃO DE LITERATURA

II.1 – Necessidades nutricionais preconizadas para a dieta de camundongos de laboratório.

Nutrição é definida como o conjunto de processos pelo qual o animal recebe, transforma e utiliza os nutrientes contidos nos alimentos essenciais e imprescindíveis para a manutenção da vida. A necessidade nutritiva de um animal para um dado nutriente é a quantidade mínima deste nutriente que manteria o crescimento e reprodução em condições de normalidade evitando a aparição de sintomas de carência e, como consequência, estados patológicos ou simplesmente enfermidades inaparentes. A necessidade nutritiva assim considerada, comporta o chamado mínimo necessário para este nutriente (Paim, 1994). Os nutrientes são geralmente divididos em macro e micronutrientes. Os nutrientes contidos nas substâncias alimentares incluem as proteínas, as gorduras, os carboidratos, fibras, lipídios, vitaminas e minerais. Os últimos são classificados em macro e microelementos (Neves, 1996).

As condições de desenvolvimento dos animais de laboratório, tais como características do potencial genético, crescimento, reprodução e resposta a estímulos estão intimamente relacionadas com o fator nutricional e conseqüentemente com a composição da ração que eles ingerem, (Coates, 1984 ; Neves, 1996; Carvalho *et al.*, 2003).

A presença de contaminantes na ração pode alterar de maneira negativa os processos bioquímicos e fisiológicos dos animais. Como exemplo, podemos citar a indução de síntese de enzimas hepáticas por determinados contaminantes que alteram a resposta do animal a drogas (Neves, 1996). A ração pode conter contaminantes químicos e biológicos. Em relação aos contaminantes biológicos, dietas a base de produtos naturais podem conter microorganismos (bactérias, leveduras, bolores, etc). A aflatoxina B é comumente encontrada em grãos de cereais e é carcinogênica. Produtos de origem animal na ração são a principal fonte de bactérias patogênicas (*Salmonella spp.*, etc), enquanto a farinha de peixe, por exemplo é uma potencial fonte de nitrosaminas carcinogênicas (Canadian Council on Animal Care, CCAC, 1984). Quanto aos contaminantes químicos, pode-se citar as nitrosaminas e nitratos que, além de serem encontrados em grãos e nas proteínas do animal, podem também contaminar materiais da forragem das gaiolas e podem ocasionalmente estar presentes em alimentos comerciais peletizados com um nível permissível de não mais que 10 ppb. A qualidade

dos nutrientes e a presença dos contaminantes nas dietas dos roedores constituem uma freqüente variável experimental (CCAC, 1984).

O padrão sanitário dos animais de laboratório, bem como o seu metabolismo são influenciados pela composição da dieta e pelas práticas de experimentação. O desconhecimento sobre as variações na constituição da dieta dos animais pode ser um fator prejudicial para a obtenção de resultados experimentais mais precisos. O aspecto mais crítico na formulação de dietas está relacionado à presença de todos os nutrientes essenciais nas concentrações requeridas (Van Zutphen *et al.*, 1993).

Para uma nutrição adequada, a dieta ingerida deve ser: específica para cada espécie animal, de alta qualidade, isenta de contaminantes químicos ou microbiológicos e ser oferecida diariamente. Estes requisitos foram recomendados e elaborados pela Comissão sobre Nutrição Animal do National Research Council, criado pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos em 1916 para tratar de temas relacionados à garantia da qualidade nutricional de animais de laboratório (National Research Council, 2003).

Durante muitos anos a dieta para roedores preconizada pelo Instituto Americano de Nutrição, AIN-76A, foi utilizada extensivamente por todo o mundo. Devido a problemas técnicos e nutricionais relacionados à alimentação para animais de laboratório esta dieta foi revisada e foram criadas duas novas formulações: AIN-93G voltada para as fases de crescimento dos animais, gestação e lactação e a AIN-93M para a manutenção de animais adultos. As maiores mudanças nos ingredientes da dieta incluem a forma dos carboidratos, a forma e a quantidade de gordura e aminoácidos sulfúricos suplementares. Ocorreram mudanças na mistura mineral, incluindo a quantidade e a forma de fósforo e selênio, a forma de cálcio, a quantidade de manganês e a adição de molibdênio (Reeves *et al.*, 1993).

Uma dieta adequada para espécies de animais de laboratório envolve a formulação de rações com concentrações necessárias de aproximadamente 50 componentes essenciais e a manipulação de numerosos fatores relacionados com a sua qualidade (Neves, 1996).

Em relação aos nutrientes contidos nas dietas alimentares, as proteínas são consideradas os principais componentes, sendo essenciais para a formação das células, produção de hormônios, enzimas e outras substâncias que iniciam e controlam os processos básicos (Neves, 1996). O AIN-93G recomenda 200g/kg de proteína na dieta para roedores. Estudos a longo prazo utilizando animais que não estavam em período de gestação e

após completarem a fase de crescimento rápido mostraram que a quantidade de proteína preconizada pelo AIN-93M necessária para a manutenção de roedores adultos é 140g/kg (Reeves *et al.*, 1993).

Os carboidratos recomendados e as quantidades (g/kg) para a dieta AIN-93G são sacarose (100g/kg), amido de milho dextrinizado (132g/kg) e amido de milho (400g/kg). Estes valores podem variar dependendo da adição de premixes, por exemplo, os vitamínicos que são feitos com sacarose ou mudanças na concentração de proteína e gordura (Reeves *et al.*, 1993).

Em relação às gorduras, devido ao conteúdo de ácido linolênico, o óleo de soja é recomendado como fonte de gordura no AIN-93G, 70g/ kg de dieta. Esta quantidade é recomendada para machos e fêmeas durante o crescimento rápido e para fêmeas adultas durante reprodução e lactação. O óleo de soja contém cerca de 14% de ácidos graxos monossaturados, 51% de ácido linoléico e 7% de ácido linolênico. Quando os animais completam o crescimento rápido ou não estão em fase reprodutiva a quantidade de óleo de soja deve ser menor que 40g/kg (Reeves *et al.*, 1993). Existem muitas fontes comuns de gordura, portanto podem ocorrer alterações das composições de ácidos graxos, mas somente as fontes controladas devem ser utilizadas. Gorduras contendo ácidos graxos altamente saturados são digeridos pobremente. Fontes de ácido graxo altamente saturados requerem mais antioxidantes (Reeves *et al.*, 1993).

É importante levar em consideração o tipo de dieta, bem como a sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade aplicado a vitaminas em alimentos corresponde à parte do nutriente ingerido que tem o potencial de suprir as demandas fisiológicas em tecidos alvos (Mourão *et al.*, 2005). Dependendo da espécie animal, as necessidades nutricionais irão variar quantitativa e qualitativamente (Neves, 1996).

Os roedores devem ter uma certa restrição calórica em sua dieta, principalmente quando mantidos em experimentação. A restrição moderada na ingestão de calorias e proteínas aumenta a longevidade e diminui as taxas de obesidade em várias espécies. Para tal finalidade, é necessária uma diminuição na dieta do total de energia metabolizável e/ou da concentração protéica, o que pode ser obtido pelo controle da qualidade da ração ou pela frequência de alimentação dos animais (Ames *et al.*, 1993).

Segundo investigações nas áreas de toxicologia e oncologia, observou-se que dieta com menos proteínas e gordura é mais indicada para estudos a longo prazo (Reeves *et al.*, 1993).

Quando uma variedade de nutrientes não balanceados é oferecida aos animais, alguns não selecionam uma dieta balanceada e tornam-se obesos pelo consumo de alimentos energéticos e com baixo teor protéico. Além disso, mudanças bruscas na dieta dos animais devem ser evitadas, pois, podem causar distúrbios digestivos e metabólicos e ainda alterar resultados experimentais em pesquisas científicas. As rações para animais de laboratório são compostas basicamente de milho, trigo, soja, farinha de peixe e de carne, alfafa, sais minerais e vitaminas. De acordo com a espécie animal, a concentração dos elementos é variável. A composição das rações comerciais para camundongos e hamsters segundo especificações dos fabricantes (Neves, 1996) é a seguinte:

Componentes básicos	(%)
Umidade (máx)	12.50
Proteína (mín)	22.00
Extrato etéreo (mín)	4.00
Minerais (máx)	9.00
Fibra (máx)	8.00
Cálcio (máx)	1.40
Fósforo (mín)	0.85

A formulação acima descrita contém níveis superiores de nutrientes ao recomendado pelo NRC (National Research Council, Washington, D.C), devendo, portanto, ser submetida a controles químicos e físicos periódicos. A Tabela 1 refere-se às concentrações ideais dos componentes de uma dieta para roedores, segundo o American Institute of Nutrition (AIN-93G).

Tabela 1: Formulação da AIN-93G de uma dieta ideal para roedores, nas fases de crescimento, gestação e lactação:

Caseína (85% de proteína)	Mistura vitamínica.....1,0%
Sacarose.....10,0%	L-Cistina.....0,3%
Óleo de Soja.....7,0%	Bitartrato de colina.....0,25%
Fibra.....5,0%	Amido de milho.....q.s.p
Mistura salina.....3,5%	

Neves, 1996

II.2 Tipos de dietas

As rações para animais de laboratório podem ser classificadas como “ração convencional” aquela preparada rudimentarmente no próprio biotério e “ração padrão”, aquela preparada nas indústrias produtoras sob controles sanitários próprios. As rações “padrão” já apresentam uma linha de diversificação, ou seja: ração para crescimento, para manutenção, para engorda, sintética e semi-sintética (Paim, 1994).

As dietas podem ser formuladas com base nos requerimentos recomendados pelo National Research Council – USA (Canadian Council On Animal Care - CCAC, 1984). Segundo o CCAC os tipos de dieta preconizadas para roedores de laboratório são:

☐ Dietas à base de ingredientes naturais - Rações comercialmente preparadas são fonte usual de alimentação para camundongos. Estes são produtos naturais típicos da dieta e tem a vantagem de ser relativamente barata e prontamente disponível por vários fornecedores de confiança. Subdividem-se em duas classes:

1º) Fórmula aberta – Estimando a quantidade e garantindo a análise qualitativa de cada componente principal

2º) Fórmula Fechada – Ingredientes listados sem definições de quantidades exatas. A análise destas rações é limitada de valores reais, pois elas não dão a indicação do valor qualitativo do alimento. Muitos alimentos usados para roedores são classificados como fórmula fechada e, se obtidos de fontes confiáveis com bom controle de qualidade, estocadas corretamente e utilizadas no prazo de 90 dias, promoverão reprodução, crescimento e manutenção adequados para os animais (CCAC, 1984).

Uma dieta de fórmula aberta refere-se para alguns propósitos de pesquisas que requerem reprodutibilidade de dados, embora ainda um pouco variáveis em valores nutritivos reais (CCAC, 1984).

☐ Dietas definidas – Estas devem ser de dois tipos:

1º) Semi-purificada – Os ingredientes são refinados tais que a quantidade e a qualidade dos nutrientes são exatamente reprodutíveis. Uma dieta para camundongos e ratos foi elaborada por um comitê do American Institute of Nutrition (AIN, 1974).

2°) Dieta purificada (quimicamente definida) – Esta é feita inteiramente de químicos puros com um controle máximo sobre a qualidade dos ingredientes. Observa-se que os componentes da dieta purificada são ainda propensos à reações químicas dos componentes entre si. (CCAC, 1984).

Registros do comitê *ad hoc* do American Institute of Nutrition na padronização para estudos nutricionais recomendaram uma lista de termos e definições para a caracterização das dietas de animais de laboratório (AIN, 1977). Eles são:

- a) dietas baseadas em formulações compostas predominantemente de matérias de plantas e animais não refinados que devem ser designados como dietas baseadas em cereais, não refinadas ou não purificadas;
- b) dietas compostas primariamente de ingredientes refinados tais como as proteínas comercialmente disponíveis, carboidratos e gorduras, com misturas vitamínicas e minerais adicionadas que são chamadas dietas purificadas;
- c) dietas feitas à base de fontes puras de nitrogênio, carboidratos, gorduras, vitaminas, minerais e outros ingredientes que devem ser denominadas dietas quimicamente definidas.

Estas terminologias não são completamente precisas, mas continuam sendo utilizadas na padronização do estudo da composição da dieta na literatura e ajuda a eliminar muitas imprecisões (Reeves *et al.*, 1993).

II.3 Influência da esterilização da ração sobre os seus componentes nutricionais e suas transformações sob condições de processamento e armazenamento

Camundongos com deficiência imunológica e camundongos *Germ free* necessitam ser alimentados com uma dieta esterilizada (Canadian Council On Animal Care - CCAC, 1984). A esterilização da dieta por autoclavagem é essencial para a eliminação de germes e patógenos específicos comuns em colônias de animais de laboratório. A autoclavagem é feita a uma temperatura de 121° C por 20 minutos, porém apresenta vários problemas relacionados à perda ou diminuição do valor nutritivo, tendo um efeito acentuado sobre as proteínas (desnaturação) e algumas vitaminas. No caso da ração autoclavável, há necessidade de ajuste nas concentrações dos nutrientes termolábeis para compensar o processo natural de degradação durante a esterilização (Wostman, 1975).

A autoclavação a altas temperaturas, mais que 100°C, com vapor por um tempo suficiente, pode ser efetiva em realizar uma completa esterilização, mas uma exposição excessiva resulta em altas perdas de vitaminas e proteínas (Zimmerman & Wostmann, 1963; Coates, 1984). Alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes tempos de autoclavação na ração utilizada para ratos (*Rattus norvegicus*) em crescimento, bem como verificar a sensibilidade do teste de solubilidade da proteína em KOH como indicador de redução *in vivo* da qualidade da proteína devido à autoclavação. Os resultados deste estudo indicaram que a análise da solubilidade da proteína em KOH é um bom indicativo para se verificar o efeito da autoclavação em rações (Faria & Estabile, 2001).

Outra forma de esterilizar os alimentos é pela irradiação com raios gama, porém este procedimento envolve o uso de equipamentos caros e efeitos adversos são observados no alfa-tocoferol e tiamina, embora provavelmente seja o mais efetivo e menos deletério dos procedimentos de esterilização (CCAC, 1984; Neves, 1996).

Em relação aos fatores físico-químicos, alimentos peletizados tendem a ser mais estáveis que alimentos em pó (CCAC, 1984).

Temperaturas não muito acima de 80° C podem ser geradas durante a peletização causando pouco ou nenhum dano na qualidade nutritiva (vitaminas e proteínas). Contudo deve-se notar que muitas vitaminas e aminoácidos são termolábeis e serão destruídos sob condições de temperaturas muito excessivas. Variações em pH, umidade excessiva, exposição à luz solar e ao ar (O₂) devem ser evitados (CCAC, 1984).

Quanto às alterações das proteínas por tratamentos térmicos, como a pasteurização ou outro processo de esterilização de um alimento protéico, estas podem sofrer desnaturação. Nas condições de esterilização, podem ocorrer, pela alta temperatura, perdas de aminoácidos sulfurados e formação de H₂S (Bobbio, 2001).

As alterações químicas mais importantes das proteínas são aquelas relacionadas com o seu valor nutritivo que pode ser diminuído pela reação de Maillard, ou da ruptura e formação de novas ligações peptídicas. As proteínas são alimentos estruturais dos organismos animais e formam estruturas altamente hidratadas, géis, que podem sofrer alterações importantes pela variação da relação entre água livre e combinada de tais sistemas. Essas alterações podem modificar a forma das proteínas e estão relacionadas com a sua desnaturação. Todas essas possibilidades de alterações físicas, além dos efeitos texturais e organolépticos, podem também contribuir para alterar a reatividade química da proteína (Bobbio, 2001).

A qualidade da proteína pode deteriorar-se durante o processo de estocagem ou esterilização da dieta, uma vez que pode ocorrer a destruição dos aminoácidos pela oxidação e durante o tratamento prolongado pelo calor. A deterioração não é detectável facilmente e torna-se necessário um método para testar qualidade da proteína usada na dieta. Várias medidas biológicas foram propostas como indicadoras da qualidade protéica, dentre essas, a taxa de eficiência protéica, que é uma expressão do ganho de peso do animal por grama de proteína ingerida (Neves, 1996).

Fatores relacionados ao processo de estocagem da ração, seus componentes, processo de manutenção e as condições em que a ração é submetida entre a manufatura e o consumo pelo animal irão impactar na qualidade desse insumo. Em relação às condições de armazenamento, a ração deve ser armazenada em local com temperatura média baixa, seco, escuro e bem ventilado (Neves, 1996).

Segundo Reeves *et al.* (1993), as dietas devem ser estocadas à 4° C em recipientes plásticos com tampas bem adaptadas e bem vedadas. Devem ser congeladas em freezers caso sejam analisadas por longo período. Não devem ser estocadas por mais que 6 meses. Podem ser guardadas em geladeiras por não mais que 3 meses.

Os alimentos devem ser armazenados distantes do chão, em estrados, prateleiras ou carrinhos. Sacos de ração abertos e que não estejam em uso devem ser armazenados em recipientes para diminuir a contaminação e evitar a possibilidade de disseminação de patógenos. Com exposição a temperaturas acima de 21° C, bem como umidade relativa do ar muito alta, falta de higiene, luz, oxigênio, insetos e outras pragas aceleram a deterioração do alimento. (National Research Council, 2003).

Segundo o CCAC (1984), a estocagem da ração deve ser em uma área especial destinada a este propósito, preferencialmente com controle de temperatura a cerca de 15° C. A sala deve ser adequadamente ventilada, com baixa umidade. Sacos de ração devem ser empilhados em prateleiras permitindo assim a circulação de ar. Datas de fabricação devem ser verificadas para cada lote da ração ao recebimento e o alimento deve ser utilizado dentro do prazo de 90 dias. Além disso, uma maneira segura de salvar o alimento contra a deterioração é manter um inventário do mesmo (CCAC, 1984).

Durante o seu armazenamento, como no seu processamento, ou mesmo como meio de transferência de calor, ou transferência de massa, os lipídios podem sofrer transformações químicas das quais as mais importantes são: rancidez hidrolítica, rancidez oxidativa e a reversão. Todas são transformações que afetam profundamente as

qualidades organolépticas dos lipídios e são prejudiciais pelos efeitos sobre a sua aceitação (Bobbio, 2001).

A rancificação oxidativa ocorre em lipídios que contêm ácidos graxos insaturados e que podem sofrer oxidação, degradação e polimerização por ataque de radicais livres. A rancificação oxidativa pode provocar alterações em outros componentes do alimento pela ação oxidante dos peróxidos sobre as vitaminas, carotenóides, proteínas e outros componentes oxidáveis do alimento, alterando o seu valor nutricional (Bobbio, 2001).

Ainda que a inibição completa da rancificação oxidativa não tenha sido até agora conseguida, é possível retardar esta transformação por períodos longos, de modo a permitir o consumo dos lipídios ou dos alimentos que os contêm, mesmo após o seu armazenamento por muitos meses. Essa diminuição da velocidade da reação é obtida pela ação dos antioxidantes, representados por meios físicos e químicos. Os primeiros referem-se às embalagens que contenham pouco ar, que não permitam passagem de luz e o uso de temperaturas adequadas no armazenamento. Os meios químicos são o uso de compostos antioxidantes e a eliminação de metais contaminantes e pigmentos fotossensíveis. Embalagens capazes de evitar a entrada de ar e luz especialmente ultravioleta, certamente contribuem para retardar a rancidez (Bobbio, 2001).

As condições de manuseio do alimento e de processamento podem levar a uma maior ou menor eliminação das “barreiras celulares”, o que naturalmente leva à transformação no alimento. O processamento envolve frequentemente alguma forma de aquecimento e esse aumento de energia do sistema pode produzir um aumento da velocidade das reações químicas. O processamento e mesmo o armazenamento podem ser práticas consideradas destrutivas para o alimento. A função do processamento é a deterioração microbiológica e sempre que possível evitar as deteriorações químicas e físicas que afetariam a aceitação do alimento. As tecnologias mais modernas utilizam basicamente dois princípios: a eliminação de água disponível como meio para reações e desenvolvimento de microorganismos (congelamento, desidratação) ou inibição do desenvolvimento de microorganismos pelo calor (Bobbio, 2001).

Existe uma estreita relação entre o teor de água livre no alimento e a sua conservação. O teor de água livre é expresso como “atividade de água” (a_{H_2O}). Os alimentos ricos em água com a_{H_2O} maior que 0,90 poderão sofrer facilmente contaminação microbiológica. Os efeitos da variação da “atividade da água” em um alimento não somente estão ligados ao crescimento de microorganismos ou à deterioração química, mas, também à deterioração da sua consistência (Bobbio, 2001).

Visto que um dos principais riscos a que os animais de laboratório estão sujeitos é o da contaminação advinda do meio externo, este pode ser controlado, primariamente, pelo tipo de instalação e por procedimentos como limpeza, lavagem, desinfecção e esterilização. Um dos procedimentos que merece especial atenção é a ração fornecida, pois a presença de microorganismos na ração pode causar prejuízos aos animais. Neste caso, a eliminação dos microorganismos é necessária. Os métodos mais eficazes de esterilização para eliminação de microorganismos encontrados em rações são fumigação química, calor e a irradiação por raios gama (Faria & Estabile, 2001).

II.4 Importância das proteínas e outros componentes da ração no desenvolvimento e fisiologia do animal

As proteínas são constituídas por aminoácidos essenciais (aqueles que o organismo não pode sintetizar e devem ser recebidos por meio da alimentação) e aminoácidos não essenciais (aqueles que o organismo pode sintetizar, não necessitando de fonte externa de fornecimento). Existem ainda os aminoácidos semi-essenciais, sendo a cisteína e a tirosina caracterizadas como tais uma vez que os aminoácidos metionina e fenilalanina podem ser convertidos em cisteína e tirosina respectivamente (Neves, 1996). Os animais de laboratório necessitam de uma fonte de aminoácidos a partir dos quais eles sintetizarão suas próprias proteínas (Neves, 1996).

A quase totalidade da proteína consumida é de origem animal e vegetal e somente pequena quantidade é proveniente das chamadas fontes não-convencionais. Estas são provenientes de microorganismos como bactérias cultivadas com o uso de derivados do petróleo como fonte de carbono; as leveduras provenientes da fermentação da sacarose para produção de etanol; as algas como as *Chlorelas*. Com exceção das proteínas de origem animal, as demais apresentam deficiência em um ou mais dos aminoácidos essenciais, ou podem apresentar problemas nutricionais por estarem acompanhadas de substâncias tóxicas ou de inibidores de enzimas proteolíticas (Bobbio, 2001).

As necessidades de proteína para a manutenção do organismo dos animais aumentam durante o período de gestação, lactação e crescimento. A insuficiência protéica, tanto pelo aspecto quantitativo como pelo qualitativo afeta os tecidos de crescimento rápido, especialmente em animais jovens e em fêmeas durante o período de

gestação. O crescimento retardado, anemia e deformidades do crânio do animal são alguns dos sintomas decorrentes da desnutrição protéica (Neves, 1996).

Na desnutrição protéico-energética, o organismo responde às restrições de forma singular, manifestando fraqueza, caquexia, retardo do crescimento, não conseguindo adaptar-se à deficiência protéica que é acompanhada por edema, perda da massa muscular, fígado graxo (esteatose), dermatose, diminuição da resposta imune e debilidade geral (Lajolo & Tirapegui, 1998). As alterações anatômicas na deficiência protéico-energética podem ser generalizadas, como hipoplasia e atrofia dos tecidos e, conseqüentemente, diminuição do tamanho corporal e dos órgãos (Robbins *et al.*, 1986).

A restrição protéica na dieta de camundongos fêmeas adultas prenhas também pode induzir modificações em histonas e suprimir a expressão gênica fetal o que pode ocasionar baixo peso ao nascimento dos filhotes provenientes de mães alimentadas com uma dieta com deficiência protéica (Sharif *et al.*, 2007).

Um estudo voltado para a recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento foi realizado no município de Quissamã, RJ, utilizando-se *Rattus norvegicus* alimentados com dietas isoproteicas (10%) e isoenergéticas (350 Kcal/100g). Foi registrado o peso dos animais e após o sacrifício foram coletados e pesados fígado, rins e baço (Guzmán-Silva *et al.*, 2004). De acordo com os autores, o ganho ponderal médio aos 28 dias de idade dos animais do Controle Suplemento Alimentar foi significativamente inferior aos demais grupos e o do Controle Suplemento Alimentar e vitaminas + minerais foi o mais elevado. Quase todos os grupos de animais diferenciaram-se estatisticamente no peso médio do fígado, rins e baço (Guzmán-Silva *et al.*, 2004).

A subnutrição materna pode resultar em menor prole e contribuir para doenças tardias ao longo da vida do animal. Não se sabe se a nutrição gestacional afeta o desenvolvimento e o funcionamento dos vasos sanguíneos placentários. Um estudo foi feito objetivando descobrir se os distúrbios na angiogênese e integridade juncional foram característicos de uma junção de vasos da placenta de camundongos transgênicos Tie2-GFP alimentados com dieta controle (18% de proteína) ou com dieta deficiente em proteína (9%). Os animais alimentados com uma dieta deficiente mostraram uma diminuição significativa do peso fetal e do peso placentário e fetal, contudo, o peso materno e o tamanho das ninhadas permaneceram inafetados. Houve redução significativa da junção dos comprimentos dos vasos sanguíneos, mas não no diâmetro

do lúmen dos mesmos. A redução do comprimento dos vasos sugerem que a subnutrição causa disfunção vascular na placenta murina (Rutland *et al.*, 2006)

O camundongo macho tem a sua capacidade reprodutiva prejudicada com a deficiência em arginina. A deficiência de cisteína pode provocar degeneração e necrose hepática e a deficiência de colina prejudica o metabolismo das gorduras. O aminoácido triptofano está relacionado com a formação da hemoglobina e a sua falta ocasionará anemia, diminuição do crescimento, hipoproteinemia e alopecia (Neves, 1996).

A desnutrição protéica também modifica tanto a resposta imune específica quanto a inespecífica, fazendo com que os animais tornem-se mais susceptíveis a determinados agentes infecciosos. Como consequência, pode haver uma modificação da atividade fungicida e fagocítica de macrófagos em animais desnutridos. Deve-se, portanto, levar em consideração o binômio desnutrição-infecção (Souza *et al.*, 2001).

Outros estudos mostram a relação entre a deficiência de proteínas na dieta de fêmeas de camundongos prenhas e em sua prole. Segundo Millis & Offiah (2006), a deficiência de proteínas na dieta produz hipersensibilidade imune mediada por células em fêmeas prenhas de camundongos Balb/C e em sua prole. Neste estudo foi comparado o efeito de uma dieta controle (20% de proteína) com uma alimentação com 10% de proteína (deficiente) em condições *ad libitum*. A sensibilidade por contato dérmico ao 2,4 dinitrofluorbenzeno (DNFB) foi mensurada através do aumento da espessura da pele da orelha dos animais 72 horas após a imunização e também foi observado o número de filhotes viáveis por parto. As fêmeas alimentadas com dieta com deficiência protéica, além de apresentarem menor ganho de peso, apresentaram maior aumento da espessura da pele da orelha quando estimulado pelo DNFB e pariram um número menor de filhotes, ao contrário das mães alimentadas com uma dieta controle (Millis & Offiad, 2006).

Estudos envolvendo a nutrição de camundongos fêmeas e sua prole à base de dieta com ração contendo alta quantidade de gordura insaturada, alta quantidade de proteína e baixa quantidade de carboidratos durante as fases de gestação e lactação mostraram que houve uma modulação do metabolismo lipídico hepático na prole de fêmeas adultas. Neste estudo concluiu-se que uma dieta materna contendo alta quantidade de proteína e gordura altamente insaturada durante a gestação e lactação reduz a concentração do triglicéride hepático na prole de fêmeas e este fator está relacionado com o aumento dos níveis de proteína na oxidação de ácidos graxos (Zhang *et al.*, 2004).

As fontes potenciais de energia na dieta são os carboidratos, lipídios e proteínas.

Os carboidratos, componentes básicos do alimento, representam para o organismo a fonte de energia, sendo esta a sua principal função nas dietas de animais de laboratório. A fonte principal deste componente é obtida através do amido dos cereais que, em contato com as enzimas do aparelho digestivo, são convertidos em dextrina, maltose e glicose. A glicose é absorvida na corrente sanguínea e levada para os tecidos. A frutose e a galactose são outros dois açúcares simples que podem ser convertidos em energia. A frutose e a galactose são obtidas através da hidrólise da lactose que é o açúcar do leite. Para os animais lactentes a galactose é a mais importante fonte de energia (Neves, 1996). O leite como único alimento acessível aos lactentes deve conter todos os nutrientes necessários para o crescimento e manutenção dos órgãos e do indivíduo como um todo, o que parece não acontecer quando do processo de desnutrição. Em um determinado trabalho, autores estudaram a evolução ponderal e homeostase glicídica em ratos jovens cujas mães foram submetidas a dietas hipoprotéicas. A dieta foi oferecida durante a primeira ou segunda metade da lactação ou durante todo o período da lactação. A dieta com 4% de proteínas causou uma redução no consumo médio de aproximadamente 60%, em comparação com os animais controles. Após a recuperação dietética (com ração com 23% de proteínas), esses animais mostraram o mesmo padrão de consumo dos animais controles. Devido a essa mudança no consumo, os animais desnutridos mostraram uma significativa diminuição no ganho de peso e na evolução ponderal durante o tratamento e mesmo durante a recuperação nutricional. (Oliveira et al., 2003).

As fibras, também componentes das substâncias alimentares, são compostas por celulose, hemi-celulose, lignina, pectinas e gomas. A celulose, hemi-celulose e lignina são resistentes à degradação enzimática podendo ser parcialmente digeridas por fermentação bacteriana no cólon. Elas aumentam a motilidade intestinal e o volume fecal (Neves, 1996).

Os lipídios são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. A fração de lipídios na dieta é nutricionalmente importante uma vez que entre os macronutrientes é o que fornece maior quantidade de calorias por grama, contém ácidos graxos essenciais, veicula as vitaminas lipossolúveis, aumenta o tempo de digestão e diminui o volume da alimentação (densidade calórica). Os lipídios de maior importância em nutrição são os triglicérides, colesterol, fosfolipídios e esteróides. As funções principais

dos lipídios relacionam-se à regulação térmica do corpo do animal e reserva energética (Neves, 1996).

Estudos mostraram métodos de uso clínico para a avaliação do acúmulo de lipídios no fígado, onde induziu-se vários graus de acúmulo de gordura no fígado de camundongos e avaliou-se um método simples, baseado na flutuação de fragmentos de fígado em soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), para o diagnóstico e quantificação da lipidose hepática. Somente os animais mais velhos tornaram-se obesos e mostraram sinais macroscópicos de acúmulo de gordura no fígado, flutuando na menor concentração de NaCl (Rossi *et al.*, 2004).

Em relação às vitaminas, correlacionadas ao crescimento normal e à manutenção de vida do animal, essas são caracterizadas como compostos orgânicos essenciais necessários para estes fins. Elas são classificadas em lipossolúveis (solúveis em gordura) as vitaminas A, D, E, K; hidrossolúveis (solúveis em água) – B₁, B₂, B₆ e B₁₂, ácido pantotênico, biotina, ácido fólico, niacina e vitamina C. As hipovitaminoses e avitaminoses (deficiência e ausência de vitamina) podem causar perturbações nos animais (Neves, 1996).

Os minerais são também nutrientes considerados essenciais para os animais. Dentre os macroelementos e microelementos minerais podemos citar o cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio, cloro, enxofre, manganês, ferro, cobre, zinco, iodo e cobalto. Um estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de uma multimistura no combate à desnutrição em ratos machos Wistar, no que se refere à biodisponibilidade mineral. A importância da determinação da biodisponibilidade de minerais em dietas está centralizada no estabelecimento das recomendações de ingestão desses elementos em função das necessidades dos indivíduos. Assim, os estudos da biodisponibilidade de nutrientes devem ser específicos para cada país, tendo em vista a grande diversidade de dietas e de indivíduo (Santos *et al.*, 2004). Os minerais têm a função de estruturar tecidos duros do organismo, entram na composição de tecidos moles e atuam na formação de hormônios, vitaminas e hemoglobinas. O cálcio e o fósforo atuam na formação e manutenção dos ossos e dentes. A deficiência destes componentes pode causar osteomalácia em adultos e raquitismo em jovens. A deficiência de sódio e potássio pode causar crescimento retardado e transtornos reprodutivos. O ferro é um componente da hemoglobina e de outros pigmentos importantes na respiração celular (Neves, 1996). Os minerais, em seu conjunto vão desempenhar as seguintes funções no organismo animal: função energética; função plástica: constituintes de estruturas

(ex.: ossos); função físico-química: participam das reações do organismo e fazem parte de enzimas, hormônios, etc, (Paim, 1994). A gestação e a lactação parecem elevar o requerimento de selênio pelos animais (Smith *et al.*, 1987).

O risco de doenças metabólicas tais como arteriosclerose e diabetes mellitus em adultos é aumentada pela má- nutrição fetal. Deficiências de micronutrientes essenciais para a metilação contribuem, em parte, para o fenômeno de anormalidades epigenéticas. O zinco é um dos nutrientes essenciais para o epigenoma. A deficiência de zinco contribui para a patogênese de doenças metabólicas em adultos. Experimentos em roedores e/ou primatas não humanos mostram que a deficiência de zinco em fetos ou lactentes prejudica funções neurofisiológicas dos animais. Além disso, a deficiência de zinco na dieta de camundongos pode prejudicar o sistema imune da prole e os efeitos persistirão, mesmo após uma reabilitação nutricional, dentro das próximas gerações (Maret & Sandstead, 2007).

Experimentos mostraram que ratas alimentadas com a dieta AIN-93G por 12 semanas não apresentaram aumento na calcificação renal quando comparada com àquelas cuja dieta era a base se cereais. Por outro lado, ratos alimentados com a dieta AIN-76 A apresentaram 23 vezes mais calcificação em seus rins do que ratos alimentados com uma dieta a base de cereais (Reeves *et al.*, 1993).

Reis *et al.* (2002), sugeriu que a deficiência de magnésio está implicada direta ou indiretamente com a resistência à insulina no Diabetes mellitus, enquanto outros descrevem uma relação inversa ou, ainda, um aumento da captação de glicose decorrente da falta de magnésio.

A concentração de cálcio nos rins de machos não foi afetada por uma dieta ou outra. Como foi observado em estudos recentes, ratos fêmeas não apresentaram concentrações anormais de cálcio em seus rins quando alimentadas com uma ração comercial preparada a base de cereais com Ca:P com proporção molar menor que 1. Dietas baseadas em cereais contém tipicamente mais magnésio que dietas purificadas (Reeves *et al.* 1993). Altas concentrações de magnésio na dieta têm mostrado impedir a calcificação renal em ratos alimentados com dietas com baixa proporção molar de cálcio/fósforo (Shah *et al.*, 1980).

II.5 – Ocorrência de endoparasitos em colônias convencionais de animais de laboratório

Nas colônias de animais de laboratório, principalmente as convencionais, é freqüente a incidência de endoparasitos provocando várias alterações nutricionais. Os endoparasitos interferem no desenvolvimento dos animais e podem alterar bruscamente a fisiologia dos mesmos. As técnicas de cesariana e histerectomia têm auxiliado na obtenção de animais sanitariamente definidos (Marques, 2002).

A desnutrição também está relacionada com doenças infecto-parasitárias, sendo o seu processo de recuperação multifatorial, exigindo uma grande mobilização de recursos. A deficiência de zinco prejudica a resposta imune contra infecções intestinais e sistêmicas por parasitos nematódeos (Scott & Kosky, 2000).

Roedores tais como camundongos e ratos de laboratório mais comumente utilizados em pesquisas são raramente investigados para ecto e endoparasitos antes de serem utilizados em ensaios experimentais. Helmintos parasitos de animais de laboratório podem alterar a interpretação de resultados finais nas pesquisas (Perec-Matysiak *et al.* 2006). Segundo os autores, os helmintos que mais infectam os roedores são *Syphacia obvelata* e *Aspicularis tetraptera*, sendo que em ratos há maior ocorrência de *Syphacia muris*. O fato de muitas colônias de roedores de laboratório encontrarem-se parasitadas sugere que há necessidade de erradicação e promoção da qualidade dos animais de laboratório (Perec-Matysiak *et al.*, 2006).

Os endoparasitos podem prejudicar as pesquisas científicas pela indução de alterações fisiológicas e imunológicas no hospedeiro, impactando no aumento ou diminuição da susceptibilidade do hospedeiro ao stress experimental, induzindo danos teciduais, causando alterações de crescimento dos tecidos e competindo com o hospedeiro por nutrientes. Em um estudo, Gilioli *et al.* (2000) verificaram que a maioria dos biotérios convencionais brasileiros analisados não possui um sistema de barreiras sanitárias eficientes capaz de manter os animais sob condições sanitárias controladas. Os endoparasitos de maior prevalência nos biotérios convencionais investigados foram *Syphacea obvelata*, *Aspicularis tetraptera*, *Hymenolepis nana*, *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris* e *Giardia muris*.

Gilioli (2003), a partir de um questionário utilizado como instrumento para averiguação das condições sanitárias dos biotérios brasileiros, mostrou que a maioria deles mantém colônias de camundongos e ratos sob condições convencionais e estão instalados em locais não planejados para abrigar animais de padrão sanitário SPF.

Quanto à biologia dos endoparasitos, *Syphacia obvelata* é um nematódeo pertencente à família Oxyuridae, presente em quase todas as criações convencionais de

camundongos, ratos e hamsters. Habita o ceco, apresentando ciclo biológico direto, que se completa a cada 15 dias (Marques, 2002). O adulto apresenta coloração brilhante quase transparente, asa cefálica na região anterior com esôfago em forma de bulbo (rabditóide). A fêmea é quase três vezes maior que o macho e mede 3,4 a 5,8 mm. Seus ovos transparentes são depositados na região do colo e na região perianal; apresentam-se bastante leves e são dotados de achatamento em um dos lados em forma de “D” (Marques & Alexandre, 1996). Segundo Gilioli *et al.* (2000), em 15 colônias de camundongos e ratos produzidos em 18 biotérios de Instituições brasileiras a prevalência do parasito *S. obvelata* detectada entre as colônias investigadas foi de 86,6%.

O endoparasito *Aspicularis tetráptera*, pertencente à ordem Ascarida, família Oxyuridae é amplamente distribuído em colônias de roedores convencionais, parasitando ceco de camundongos e, raramente, ratos. É considerado um parasito não-patogênico. Apresenta ciclo biológico direto. Os ovos são eliminados com as fezes e requerem 6 a 8 dias de incubação, em temperatura ambiente, antes de se tornarem infectantes. A transmissão ocorre quando ovos embrionados são ingeridos. Os ovos eclodem no intestino, liberando as larvas que, em torno de 25 dias, tornam-se adultas, reiniciando o ciclo biológico (Marques, 2002).

O cestódeo *Hymenolepis nana* pertence à família Hymenolepidae e é normalmente encontrado em colônias convencionais de camundongos, ratos e, sobretudo, hamsters. Considerado um parasito não patogênico, pode ocasionalmente causar doença no hospedeiro, de acordo com o grau de infestação. Quando o animal apresenta alto grau de infestação, pode-se observar perda de peso e, em consequência, baixa absorção nutricional (Marques, 2002). Este cestódeo possui um ciclo biológico monoxênico, no qual o homem ou animal funcionam ao mesmo tempo como hospedeiros intermediários (cisticercóides nas vilosidades intestinais) e como hospedeiros definitivos. No ciclo heteroxênico, pequenos coleópteros funcionam como hospedeiros intermediários. A transmissão habitual se dá à ingestão de ovos e ocasionalmente à ingestão de insetos infectados (Mazzucco, 2002; Andrade *et al.*, 2002). No ciclo biológico direto, os cisticercóides podem ser encontrados no animal, após 14 dias, na mucosa intestinal, de onde migram para o jejuno e íleo. Os ovos apresentam em seu interior um embrião resistente, podendo sobreviver meses nas fezes do hospedeiro. Levando-se em consideração o tempo, o ciclo biológico indireto completa-se em 25 a 30 dias, ao passo que para o ciclo biológico direto são necessários

apenas 16 dias (Marques, 2002). Quanto à morfologia, o verme adulto mede aproximadamente 3 centímetros x 1 milímetro. O escólex possui uma única fileira de acúleos. O ovo tem um tamanho aproximado de 30 a 45 micrômetros e é transparente apresentando-se sob a forma oval ou arredondados (Mazzucco, 2002).

Quanto aos protozoários mais encontrados em colônias convencionais, a *Giardia muris* é um protozoário flagelado, pertencente à família Hexamitidae, subfamília Giardinae. As formas trofozoítas deste gênero apresentam aspecto periforme, dois núcleos, quatro pares de flagelo e habitam o intestino delgado de várias espécies de animais convencionais. A infecção é geralmente subclínica, entretanto podemos observar que os animais apresentam perda de peso, pêlos eriçados e distensão abdominal com intensa produção de gases. O trofozoíto de *G. muris* apresenta ciclo biológico direto e a transmissão se dá por ingestão dos cistos (Marques, 2002).

O *Tritrichomonas muris* é um protozoário flagelado, não-patogênico, pertencente à classe Mastigophora, habitante comum do ceco e colo de camundongos, ratos e Hamsters. Seu ciclo biológico é simples e direto. O trofozoíto é eliminado com as fezes, dificilmente formando cistos. Quando em grande quantidade pode ocasionar diarreia no hospedeiro (Marques, 2002). Segundo Gilioli *et al.* (2000), em 15 colônias de camundongos produzidos em 18 biotérios de Instituições brasileiras 80 % dos animais estavam infectados com *T. muris*. O *Tritrichomonas minuta* também é encontrado no ceco e colon de camundongos, ratos e hamsters. Wenrich (1947) registrou observações feitas em hamsters, encontrando formas flageladas tais como *T. minuta*.

O protozoário flagelado *Spironucleus muris* também chamado de *Hexamita muris* é encontrado no intestino delgado, principalmente no duodeno de camundongos, ratos e hamsters. Apresenta ciclo biológico direto e a reprodução se dá por divisão longitudinal binária. Esse parasito ocasiona uma enfermidade aguda e crônica. A forma mais grave ocorre em camundongos lactentes, podendo levá-los à morte. A fase inicial aguda da enfermidade se manifesta por diarreia e perda de peso. Em ambas as formas, aguda e crônica, os cistos aderidos às criptas da mucosa duodenal ocasionam uma forte resposta inflamatória, enterite (Marques, 2002).

Senlik *et al.* (2005), examinaram amostras fecais de alguns animais de laboratório para a detecção de helmintos. Foram examinadas fezes de ratos, camundongos, coelhos e cobaias. Em geral, 38,02% dos ratos e 83,59% de camundongos foram infectados com uma ou mais espécies de helmintos. A porcentagem de *Syphacia muris* e *Syphacia obvelata* foi de 32,48% e 12,67%

respectivamente em ratos e a porcentagem de *Aspiculuris tetráptera*, *Syphacia obvelata* e *Hymenolepis nana* foi de 79,18%, 10,72% e 15,45% respectivamente em camundongos. Nenhuma infecção helmíntica foi encontrada em cobaias (Senlik *et al.*, 2005).

Um estudo foi feito com o objetivo de detectar a dose infectante mínima e períodos pré-patentes dos protozoários *Giardia muris*, *Spironucleus muris* e *Tritrichomonas muris*. As doses mínimas infectantes de cistos de *S. muris* e pseudocistos de *T. muris* para camundongos atímicos foram determinadas. (Stachan & Kunstyr, 1983). Uma nova técnica utilizando-se um micromanipulador foi desenvolvida para selecionar números exatos menores de cistos frescos (novos) ou velhos e pseudocistos em fezes homogeneizadas. Esta técnica pode também ser valiosa na manipulação de parasitos protozoários de algumas espécies particulares. Somente os cistos e pseudocistos frescos que apresentaram-se com brilho sob a fase de contraste eram infectantes. Cistos e pseudocistos velhos que apresentaram-se escuros sob a fase de contraste não eram infectantes. O período pré-patente diminui com o aumento da dose infectante. A dose infectante mínima para os três protozoários foi: 10, 1 e 5 cistos/pseudocistos respectivamente. O período pré-patente foi 8, 5 e 10 dias (Stachan & Kunstyr, 1983).

Foram também investigados helmintos parasitos de camundongos de laboratório mantidos convencionalmente, linhagens *inbred* com uma adaptação da técnica de swab anal. Este trabalho adicionou novos dados sobre o estudo de helmintos parasitos de animais de laboratório, desde que grande interesse nesta área tem surgido e também considerando-se que os animais de experimentação, como hospedeiros de helmintos convencionais, são muito utilizados em avaliações de vários parâmetros biológicos. A modificação da técnica de swab anal possibilitou evitar-se a necrópsia dos animais para investigar os parasitos intestinais em colônias de roedores e a investigação de ovos de oxiúrideos que são de difícil detecção durante procedimentos de exames convencionais das fezes dos animais. Os parasitos encontrados foram os nematódeos *Aspiculuris tetráptera*, *Syphacia obvelata* e o cestódeo *Vampirolepis nana* (Gonçalves *et al.*, 1998).

II.6 – Microbiota intestinal de camundongos de laboratório

A instalação da microbiota é precoce, ocorre logo após o nascimento e é regulada por fatores internos e externos. Sofre influência do hospedeiro, bactérias e do meio ambiente (Brandt *et al.*, 2006).

O trato gastrointestinal de camundongos lactentes é colonizado em uma seqüência particular por vários tipos de bactérias naturais do trato digestivo.

Lactobacillus e *Streptococcus* anaeróbios facultativos são as primeiras bactérias a colonizar o trato gastrointestinal no 1º ou 2º dia após o nascimento dos camundongos. Essas bactérias são encontradas por todo o trato digestivo, mais particularmente no estômago, onde formam uma camada no epitélio escamoso estratificado queratinizado (Davis *et al.*, 1973). Usualmente atingem níveis populacionais de 10^7 a 10^8 bactérias viáveis por grama de tecido. No intestino delgado proximal eles aderem e se multiplicam nas células do epitélio escamoso estratificado e são continuamente lançados nas regiões mais baixas do intestino. No duodeno alcançam níveis populacionais de 10^5 a 10^7 e no jejuno e íleo em torno de 10^7 a 10^8 bactérias viáveis por grama de tecido (Savage, 1977; Tannock, 1989). Posteriormente, segue-se a colonização por coliformes e *Enterococcus*, poucos dias após o nascimento. As últimas bactérias correspondem às tolerantes e não tolerantes ao oxigênio (anaeróbias) que irão colonizar o trato digestivo durante a segunda semana após o nascimento. As aerotolerantes são predominantemente do gênero *Bacteroides*, as intolerantes são as formas fusiformes (bactérias de vários gêneros). Um ou mais tipos de bactérias fusiformes colonizam a mucina associada com o epitélio da mucosa do ceco e cólon de camundongos adultos. Tanto as aeróbias quanto as anaeróbias são formas presentes (Davis *et al.*, 1973).

Parte da microbiota é potencialmente patogênica. Algumas doenças podem estar relacionadas à desequilíbrios na instalação e composição desta microbiota intestinal, como a diarreia e a enterite pseudomembranosa. Na maior parte, a microbiota bacteriana intestinal é benéfica ao hospedeiro, com função digestiva, imunomoduladora e de inibição de patógenos (Brandt *et al.*, 2006).

Resultados experimentais obtidos nos ensaios biológicos usando animais possivelmente são influenciados pela microbiota intestinal característica de cada colônia animal. A microbiota intestinal característica de colônias diferentes de animais isentos de Germes Patogênicos Específicos mostra claramente a influência que os patógenos exercem no perfil imunológico de camundongos após o nascimento (Nagura *et al.*, 2005).

A dieta exerce acentuada influência sobre a composição relativa da microbiota intestinal e fecal (Barbosa *et al.*, 2006). A influência da deficiência protéica, da idade e da microbiota em parâmetros histológicos, anatômicos em camundongos isentos de germes e convencionais foi estudada por Lincoln *et al.* (2000), onde verificou-se que nos camundongos isentos de germes as modificações das funções e estruturas gastrointestinais são resultantes da falta de estimulação microbiana.

Um estudo sobre o entendimento de diferenças genéticas e fenotípicas entre animais experimentais (ambas dentro de uma única população e entre populações animais de diferentes locais) foi potencialmente importante para a explicação da variabilidade em respostas a drogas e outros agentes. Variações na microbiota intestinal têm uma influência no metabolismo de drogas e a toxicidade em homens e animais têm sido revisadas. Este estudo experimental indicou que uma variação significativa da microbiota em roedores de laboratório é provavelmente muito comum e a microbiota intestinal tem sido associada com a produção de metabólitos tóxicos ou genotóxicos de drogas e componentes alimentares (Holmes & Nicholson, 2005).

Segundo Robosky *et al.* (2005), diferenças fenotípicas dos animais foram predominantemente distintas pela microbiota intestinal dos mesmos, indicando que animais em diferentes locais foram expostos à diferentes microbiotas. Contudo, os efeitos diretos das diferentes microbiotas no metabolismo de drogas são desconhecidos. Os perfis metabólicos para cada fenótipo mostraram-se estáveis por no mínimo um ano. Os autores mostraram que na transferência de animais de uma sala para outra o perfil metabólico urinário dos mesmos rapidamente se adaptou para combinar com o perfil dominante dos animais já residentes ali, sendo que animais que originalmente excretavam uma maior taxa de metabólitos do ácido clorogênico passaram a excretar predominantemente hipurato após a mudança de local (Robosky *et al.*, 2005).

Em relação às ações da microbiota sobre o hospedeiro, as bactérias autóctones exercem proteção ecológica intestinal impedindo o estabelecimento das bactérias patogênicas. As Enterobactérias são subdominantes. O mecanismo principal desempenhado pela microbiota é conhecido como resistência à colonização pelo efeito barreira. A colonização ocorre pela ocupação de sítios de adesão celulares da mucosa, pela microbiota autóctone. Quanto a função metabólica/nutricional, esta relaciona-se à contribuição para nutrição e metabolismo do hospedeiro. A ação das bactérias sobre determinados nutrientes permite um melhor aproveitamento intestinal. Isto ocorre com substratos que chegam não digeridos ao lúmen do cólon, principalmente carboidratos,

que são fermentados e formam ácidos absorvíveis pela mucosa. Este processo forma os ácidos graxos de cadeia curta (Brandt *et al.*, 2006).

Determinados componentes nutricionais têm uma influência significativa na microbiota do ceco. Camundongos alimentados com oligossacarídeo apresentam mudanças na microbiota cecal e na concentração de ácidos orgânicos cecais (Nagura, 2005).

Lactobacillus fazem parte da microbiota dominante do trato gastrointestinal de roedores e de outros animais e são microorganismos naturalmente produtores de substâncias antagonistas, algumas delas com possibilidade de aplicações tecnológicas (Matos, 2007). São pertencentes ao filo Firmicutes, Classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae (Garrity, 2005). A espécie *Lactobacillus murinus* é habitante predominante da microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos (em especial roedores), onde exerce um papel importante na prevenção do crescimento exagerado de patógenos entéricos (Nardi *et al.*, 2005).

Os lactobacilos não possuem motilidade, são quimiorganotróficos e crescem em meios complexos, por isso estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como vegetais, leite, carne, trato gastrointestinal (Ferreira, 2003). Com relação às exigências nutricionais do gênero *Lactobacillus*, as espécies representantes necessitam de aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucléicos, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos estéreis, carboidratos fermentáveis e, ainda, pantoato e ácido nicotínico (Holt *et al.*, 1994).

Embora a maioria das espécies seja aerotolerante, o crescimento ótimo é alcançado sob condições de anaerobiose ou microaerofilia (Kandler & Weiss, 1986; Paço *et al.*, 2003; Ferreira, 2003). *Lactobacillus* crescem a uma temperatura ótima variando entre 30° a 40°C. Possuem entre 33 -55 mol% de citosina e guanina contidas na molécula de DNA, o que reflete a heterogenicidade do grande número de espécies inclusas neste gênero (Hammes & Vogel, 1995).

A identificação específica de *Lactobacillus* isolados em estudos de prospecção probiótica em humanos, animais ou em alimentos tornou-se mais fácil pela análise do perfil de restrição da região espaçadora intergênica do gene do RNA ribossomal 16S – 23S rRNA ISRs (Weisburg *et al.* 1989, Barry *et al.* 1991, Tilsala-Timisjarvi & Alatosava, 1997; Moreira *et al.*, 2005). Segundo os autores, a identificação mais precisa de *Lactobacillus* e outras bactérias co-isoladas durante estudos de ecologia microbiana de ecossistemas tais como o trato intestinal de humanos e animais, além de produtos

alimentares é uma tarefa difícil utilizando-se métodos fenotípicos, necessitando-se de testes adicionais tais como o perfil de lipídios e/ou proteínas.

Kabadjova *et al.* (2002) investigaram a conveniência da ISR dos genes 16S – 23S para o estabelecimento de um esquema rápido de identificação pela PCR-RFLP (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição) para espécies de *Carnobacterium* isoladas de alimentos. A técnica de PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), referida por Saiki *et al.* (1985) no mesmo trabalho em que a técnica de PCR foi descrita, baseia-se na amplificação pela PCR de qualquer gene e a subsequente digestão do fragmento amplificado com enzimas que cortam a fita dupla em sítios específicos de reconhecimento, denominados sítios de restrição.

As bactérias isoladas de diferentes estudos de prospecção probiótica usando o meio Man, Rogosa and Sharpe (MRS) foram identificadas especificamente pela amplificação por PCR do espaçador intergênico 16S – 23S, seguido da análise da digestão da restrição dos produtos do PCR (ARDRA - Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado) segundo Tannock *et al.* (1999); Moreira *et al.* (2005).

As bactérias lácticas têm uma grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham um importante papel na fermentação de uma variedade de alimentos. Estas bactérias podem inibir o desenvolvimento de microorganismos patogênicos e de microorganismos causadores de deterioração de alimentos (Matos, 2007).

Um dos principais riscos a que os animais de laboratório estão expostos é a contaminação por microorganismos provenientes do meio externo. A implementação de barreiras sanitárias eficazes pode controlar estas contaminações. Um fator que merece especial atenção é a ração fornecida, pois a presença de microorganismos na ração pode causar danos à saúde dos animais (Faria & Estabile, 2001).

III - JUSTIFICATIVA

Para os centros de pesquisa ou de produção de produtos biotecnológicos que utilizam modelos animais para seus ensaios experimentais é de extrema importância conhecer os procedimentos e as práticas dos fornecedores e fabricantes de ração para que haja proteção e garantia da qualidade da dieta. Devem ser exigidos, periodicamente, dos fornecedores deste insumo, dados sobre a análise de nutrientes essenciais dos produtos além da observação da data de fabricação e outros fatores que afetam o tempo de armazenamento dos alimentos.

O Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ/MG) possui dois biotérios, um destinado à produção e o outro à experimentação animal, nos quais os roedores recebem ração comercial autoclavável por longo período de tempo. Poucos estudos têm sido feitos sobre as necessidades nutricionais para roedores de laboratório. Nota-se uma carência de publicações nesta área especificamente. Diante da necessidade de produção contínua de um modelo animal de boa qualidade para os experimentos realizados no IRR, torna-se necessária uma análise comparativa do desenvolvimento dos animais quando alimentados com as diferentes marcas de ração autoclaváveis para roedores, comercializadas no Brasil. Desta forma, no presente projeto pretendemos obter informações que permitirão escolher a ração mais adequada a ser oferecida aos animais produzidos e usados em experimentação nos biotérios do IRR. Além disso, mais atenção deve ser dada ao fato de que os resultados obtidos na experimentação animal são influenciados pela presença de endoparasitos e pela microbiota intestinal dos animais mantidos em colônias convencionais de biotérios, com reflexo em particular no perfil imunológico dos animais.

Esperamos que os resultados obtidos neste projeto possam ser úteis não somente para o Instituto René Rachou, mas para outras Instituições de pesquisa, ensino ou de produção de produtos biotecnológicos que utilizam animais de laboratório para ensaios experimentais.

IV - OBJETIVOS

IV .1 - Objetivo Geral

Comparar o desenvolvimento de camundongos da linhagem **Swiss Webster**, não isogênica, alimentados com diferentes marcas comerciais de ração autoclavável.

IV . 2 - Objetivos Específicos

1- Comparar a composição nutricional de diferentes marcas comerciais de ração autoclavável entre elas e com as necessidades nutricionais preconizadas para camundongos.

2- Avaliar nos camundongos alimentados com diferentes marcas de rações comerciais autoclaváveis os seguintes parâmetros:

- a. Capacidade reprodutiva e prolificidade;
- b. Desenvolvimento ponderal até 50 dias de vida dos camundongos;
- c. Peso relativo de órgãos;
- d. Ocorrência de endoparasitos;
- e. Presença e nível populacional de **Lactobacillus** e de bactérias potencialmente patogênicas nas fezes dos camundongos;

V – MATERIAIS E MÉTODOS

V. 1- Rações

Foram utilizadas quatro marcas de rações comerciais autoclaváveis para roedores. Solicitou-se aos fabricantes das diferentes marcas a composição nutricional das rações. As rações foram codificadas por letras A, B, C e D. As marcas das rações não serão divulgadas.

A composição das rações analisadas foi comparada com aquela recomendada pelo AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) e com a análise feita pelo Dr. Marcelo Eustáquio Silva –Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto –MG.

As rações foram autoclavadas a 121° C por 20 minutos, utilizando-se o Autoclave Horizontal da marca Lufereco, modelo 39.209, funcionamento elétrico com duas portas de lados opostos, bomba de vácuo e capacidade de 960 litros (Figura 1).

As rações foram oferecidas *ad libitum* aos animais.



Figura 1: Rações comerciais autoclaváveis para roedores preparadas para o processo de autoclavação.

V. 2 - Análise composicional

Utilizamos os seguintes procedimentos para a análise composicional:

Proteína bruta - determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl.

Dosagem de lipídeos por extração com éter etílico a quente no aparelho de Soxhlet.

Para a análise da umidade foi feita a secagem da amostra a 105 ° C por 5 horas e a perda de peso correspondeu à umidade.

Dosagem de fibra bruta (celulose): Após tratamento com éter e do tratamento com ácido sulfúrico diluído, hidróxido de sódio diluído e álcool, o resíduo orgânico obtido é constituído em grande parte por celulose, que pode ser acompanhada ou não por lignina.

Cinzas: Resíduo obtido por aquecimento em mufla de uma amostra em temperatura entre 550 - 570 ° C.

O sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama. O cálcio foi dosado por titulometria (permanganometria). O fósforo e ferro foram dosados respectivamente com molibdato de amônia e com ortofenantrolina.

A metodologia utilizada para análise composicional das rações foi baseada no **AOAC** - Official Methods Of Analysis Of The Association Of Official Analytical Chemist , 13^o Ed., 1980.

Toda a parte referente à análise composicional dos lotes de rações foi realizada na Escola de Nutrição – ENUT – UFOP, pelo Prof. Dr Marcelo Eustáquio Silva.

V. 3 - Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem **Swiss webster**, convencionais, não isogênicos, de sexo e idade variando segundo o experimento, pertencentes ao biotério de produção do IRR / FIOCRUZ. Os animais produzidos no biotério são mantidos em um padrão sanitário convencional controlado, com barreiras sanitárias já implementadas, sendo o macro-ambiente dotado de temperatura variando entre 20° a 24° C, luminosidade controlada por “timer” com fotoperíodo de doze horas claro/12 horas escuro. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com as seguintes medidas: Para animais acasalados (30cm x 20cm x 12cm) e para animais desmamados (41cm x 34cm x 16 cm)

V. 4 - Desenho experimental

Fêmeas grávidas foram escolhidas aleatoriamente e separadas em grupos, de acordo com o número de rações avaliadas. Os filhotes (F0) foram pesados ao nascer (até 3 dias) e 15 dias, período no qual iniciam alimentação com ração. Aos 30 dias (período no qual a maioria dos laboratórios da Instituição requisita o animal para ensaios experimentais) os animais foram novamente pesados e, neste momento, as fêmeas reprodutoras excluídas do experimento.

Os animais recém – desmamados foram separados por sexo, pesados e submetidos aos exames parasitológicos, microbiológicos, além de ser feita uma avaliação do peso relativo do baço, fígado, rins, pulmões e coração dos mesmos. Para a avaliação do peso relativo dos órgãos, oito animais (4 machos e 4 fêmeas) de cada grupo/marca de ração foram utilizados. Os órgãos foram pesados utilizando-se a balança analítica de precisão da marca Marte. Destes 8 animais, 5 foram submetidos à análise parasitológica. Aos 50 dias de idade uma parte do grupo foi acasalada, evitando-se consangüinidade.

A capacidade reprodutiva foi avaliada pelo número de fêmeas grávidas por grupo/marca de ração e pelo número de filhotes por fêmeas. Foram feitos 8 acasalamentos por grupo de ração na modalidade 1 macho para duas fêmeas por caixa. Após ficarem prenhas as fêmeas foram separadas (uma em cada gaiola) para evitar que os filhotes se misturassem após o nascimento. Os machos foram retirados das gaiolas. Foram analisadas 16 fêmeas por grupo/marca de ração quanto ao número de filhotes vivos e natimortos por parto. A partir da geração F0 os animais tiveram o seu peso e a capacidade reprodutiva avaliados até a geração F2.

O peso dos animais, acompanhado ao longo do experimento, foi avaliado de forma independente a cada tempo de avaliação, uma vez que os animais para mensuração foram escolhidos aleatoriamente a cada tempo. O tamanho da amostra foi determinado segundo a metodologia preconizada pela OMS (Lemeshow, 1995) para comparação dos grupos:

$$n = \frac{\sigma^2 \cdot (z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{d^2}$$

em que,

z_{α} = nível de confiança;

z_{β} = poder do teste;

σ^2 = variância.

d^2 = diferença mínima significativa

O cálculo da amostra foi realizado a partir de dados de um estudo piloto, considerando 95% de confiança, 80% de poder do teste e diferença mínima significativa de 0,1.

O tamanho de amostra foi então definido como 11 animais por sexo e por marca de ração comercial.

Como foram analisados nos animais os pesos relativos dos seguintes órgãos: baço, fígado, rins, pulmões, coração, além dos exames parasitológico e microbiológico, o tamanho da amostra foi acrescido de mais 8 animais por sexo e por marca de ração em cada grupo, em função da necessidade de que os mesmos fossem eutanasiados para a realização de tais procedimentos. O método de eutanásia, método químico por inalação de CO_2 , foi o recomendado por Cardoso (2002) e Andersen *et al.* (2004). Portanto, os grupos foram formados por um número total de 19 camundongos machos e 19 camundongos fêmeas para cada marca de ração. Por questões de segurança trabalhamos com grupos constituídos de 25 animais.

V. 5 – Análise Clínica e Reprodutiva

Para as análises clínicas e reprodutivas foram analisados os pesos de 11 animais por sexo/ marca de ração, mas ao nascer (± 3 dias) e aos 15 dias o peso de 22 animais por grupo/ marca de ração foi registrado independente do sexo por uma questão de não expor os filhotes ao risco de serem rejeitados ou comidos pelas mães em função de um manuseio mais demorado para o procedimento de sexagem. Foi feita a análise dos pesos relativos dos órgãos (peso órgão/peso corporal), além dos exames parasitológicos e microbiológicos aos 30 e 50 dias de idade. A partir da F0, os procedimentos relacionados à quantificação do número de filhotes vivos e natimortos, pesagem dos animais, peso relativo dos órgãos, exames parasitológicos e microbiológicos das fezes e reprodutibilidade dos camundongos foram repetidos até a geração F2.

V. 6– Análise Parasitológica

Aos 30 dias de idade foram escolhidos aleatoriamente 5 camundongos por marca de ração e foi feito o exame qualitativo das fezes para avaliar a ocorrência de endoparasitos típicos de colônias convencionais, tais como, nematódeos oxiurídeos: *Aspicularis tetraaptera*, *Syphacia obvelata*; cestódeos: *Hymenolepis nana*, e dos protozoários *Spironucleus muris* e *Giardia muris* ou outros parasitos. Foram analisados ovos, larvas e adultos de helmintos além de cistos e trofozoítos de protozoários. Os animais foram eutanasiados. A investigação dos ovos, larvas e adultos de oxiurídeos foi feita através de “swab” anal com fita gomada. Foi feito o exame macroscópico, em placas de Petri em fundo preto, com solução salina 0.9%, observando-se a presença de larvas de helmintos e proglotes de cestódeos. Neste exame foram observadas também a coloração e a consistência das fezes (Marques, 2002).

Para a confirmação da presença de endoparasitos, além do exame parasitológico das fezes pelos métodos clássicos, foi feita a análise de segmentos do duodeno, próximo ao estômago, coletando-se a amostra do conteúdo interno e colocando em lâmina. Adicionou-se uma gota de solução salina a 0.85% (Gilioli *et al.*, 2000). A amostra foi homogeneizada, coberta com lamínula e examinada ao microscópio óptico.

Para a pesquisa de helmintos, segmentos do intestino delgado e grosso foram coletados, colocados em placas de Petri com solução salina, abertos longitudinalmente, macerados e levados ao microscópio estereoscópio.

Para a verificação de cistos e trofozoítos de protozoários foram examinadas amostras de conteúdo duodenal e do ceco. A identificação específica dos endoparasitos foi baseada na análise morfológica microscópica com aumentos de 100 e 400 X (Gilioli, 2003). A Figura 2 corresponde ao Nematódeo oxiurídeo *S. obvelata* observado no conteúdo cecal de camundongos com 30 dias de idade.



Figura 2: * Nematódeo oxiurídeo *Syphacia obvelata* observado ao M.O com aumento de 100 X.

A análise parasitológica foi repetida nos animais aos 50 dias de idade.

Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração do Laboratório de Helmintoses Intestinais do IRR/FIOCRUZ.

V.7 - Análise Microbiológica

Aos 30 e 50 dias de idade, 05 animais foram escolhidos aleatoriamente de cada grupo de ração e tiveram as fezes coletadas por estimulação anal, pesadas, homogeneizadas numa diluição 10^{-2} de salina tamponada (5,6g de NaCl; 1,0g de KH_2PO_4 ; 2,0g de Na_2HPO_4 ; 0,1g de KCl; 1000 mL de água destilada) e submetidas à diluições centesimais de 10^{-4} à 10^{-8} . Posteriormente, alíquotas de 100 μL de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo agar McConkey (Difco, Spark, USA) e agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose e por 48 horas em anaerobiose (Câmara anaeróbica Forma Scientific Company, Marietta, USA, contendo uma atmosfera de N_2 85%, H_2 10% e CO_2 5%), respectivamente, para McConkey e MRS. Após este tempo as colônias foram contadas e o número expresso em \log_{10} de Unidade Formadora de Colônia/g de fezes (UFC) e aquelas apresentando morfologias diferentes foram isoladas em Caldo BHI e Caldo MRS (Difco).

As amostras bacterianas utilizadas no experimento foram conservadas em freezer a -86°C , em meio líquido específico, acrescido de 10% de glicerol. Para realização de testes, o inóculo foi obtido de culturas puras, crescidas por 24 horas de incubação na câmara anaeróbica.

As culturas puras foram submetidas ao teste respiratório em aerobiose, anaerobiose e microaerofilia.

Para a identificação presuntiva foram acrescentados o teste da catalase e a coloração de Gram.

A prova da catalase foi realizada a partir da cultura em meio sólido. Com auxílio da alça de platina, o microrganismo foi suspenso em uma gota de H₂O₂ a 3%, depositada em lâmina. O aparecimento imediato de bolhas de gás revelou a presença da enzima catalase. Como controle positivo, foi utilizada a amostra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Todos os procedimentos foram realizados dentro da cabine de segurança biológica para que não houvesse nenhum tipo de contaminação e com chama do bico de Bunsen acesa para que as alças de platina fossem previamente flambadas.

Para o teste de Gram, uma gota de solução salina 0,9% foi colocada em uma lâmina e as placas de Petri contendo os isolados crescidos nos meios McConkey e MRS foram abertas para a retirada de cada diferente morfotipo com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada. O isolado foi estriado na solução salina, fixado rapidamente sobre a chama do bico de Bunsen e submetida às outras etapas para a coloração pelo método de Gram de acordo com a seqüência: 1 gota de cristal violeta e 2 gotas de bicarbonato de sódio por 1 minuto seguido de enxágüe; lugol por 1 minuto e enxágüe; éter – acetona colocação e enxague imediato e finalmente o acréscimo de safranina que deverá permanecer na lâmina por 30 segundos e seguida de enxágüe posterior.

V.7.1 – Identificação das enterobactérias

Os bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos isolados no agar McConkey foram congelados e foram identificados com auxílio do kit API 20E (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). O Kit API 20 E é um sistema padronizado que permite a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram-negativos existentes. Inclui 21 testes bioquímicos miniaturizados, assim como uma base de dados. O Kit apresenta ainda uma lista completa das bactérias possíveis de identificar com este sistema. A galeria do sistema API 20 E é composta de 20 microtubos que contém substratos desidratados, conforme a Figura 3. Nos microtubos foram inoculados uma suspensão bacteriana que reconstitui os testes. As reações produzidas durante o período de incubação em estufa a 37° C foram observadas pelas mudanças de cor

espontaneamente ou pela adição de substâncias reativas específicas. Para a leitura das reações foi utilizada uma tabela contida no Kit. A identificação das bactérias foi feita com o auxílio do software API LAB (bioMérieux).



Figura 3: kit API 20E (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, França) para a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram-negativos

V.7.2 – Identificação dos *Lactobacillus*

A identificação específica das amostras de *Lactobacillus* foi realizada pela técnica de Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), que consiste na amplificação, por PCR, do segmento intergênico do DNA ribossomal, empregando iniciadores que anelam nas subunidades 16S e 23S do rDNA de *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc* (Kabadjova et al. 2002), seguida por digestão enzimática dos produtos amplificados, segundo Moreira et al. (2005).

V.7.2.1 – Extração de DNA

As amostras bacterianas foram cultivadas em 10,0 mL de caldo MRS (Difco), em câmara de anaerobiose (Forma Scientific). Após incubação por 24 horas, a 37°C, as culturas foram centrifugadas a 1710xg, em centrífuga B4i (Jouan Industries S.A.S., Château Gontier, France), à temperatura ambiente, por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em 1,0 mL de LiCl 5M e transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. O material foi incubado por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação em Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Germany) e, então, centrifugado a 20.8000xg (Eppendorf 5417R, Hamburg, Germany), por 1 minuto. O sedimento foi

suspenso em 1 mL de água milli-Q estéril e centrifugado, novamente, a 20.8000xg (Eppendorf 5417R), por 1 minuto. O sedimento foi suspenso em 1 mL de solução de lisozima (10 mg/mL em TE10 – Tris-HCl 1,25M; EDTA 0,5M, pH 8) e os tubos agitados, delicadamente. Após incubação a 37°C, por 1 hora, sob agitação em Thermomixer 5436 (Eppendorf), a 1.400 rpm, a suspensão foi centrifugada a 20.8000xg, por 4 minutos, e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o DNA foi extraído, utilizando-se o kit **Wizard SV Genomic DNA Purification System** (Promega, Madison, USA), conforme instruções do fabricante.

A integridade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio. As amostras de DNA foram mantidas em freezer - 20°C até o momento de sua utilização.

V.7.2.2 – Amplificação da região espaçadora intergênica 16S – 23S do gene do RNA ribossomal

Foram utilizados os iniciadores senso 16-1A 5'- GTCGGAATCGCTAGTAATCG - 3', correspondente aos nucleotídeos 1361 a 1380 do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA e anti-senso 23-1B 5'- GGGTTCCCCCATTCGGA – 3', correspondente aos nucleotídeos 123 a 113 do gene que codifica a subunidade 23S do rRNA (Tilsala-Timisjarvi & Alatossava, 1997) conforme a Figura 4.

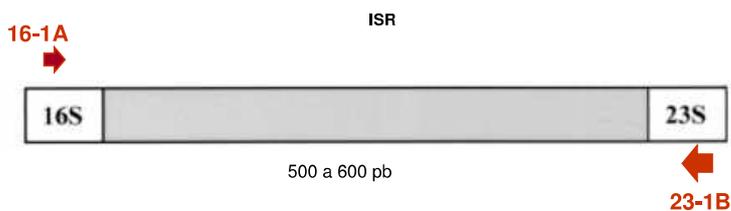


Figura 4: Desenho esquemático da região espaçadora intergênica (ISR) 16S – 23S do rDNA mostrando o local onde ocorre o anelamento dos iniciadores 16-1A e 23-1B. Esses iniciadores foram desenhados por Tilsala - Timisjarvi & Alatossava (1997).

A mistura de reação foi composta por de 5 μL de DNA molde (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 30 μL de PCR Master Mix (Promega), 6 μL de cada iniciador na concentração de 10 pmol/L e 13 μL de água quimicamente pura (Promega).

Foram utilizadas as seguintes condições de reação: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas em termociclador PCR Express PCYL001 (Thermo Hybaid, UK). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 100 V, por 1 hora. Após coloração com brometo de etídio, os géis foram observados em transiluminador UV. A presença de três bandas correspondentes aos espaçadores longo, médio e curto da região intergênica 16S-23S do rDNA sugeriram a identificação do gênero *Lactobacillus*. A Figura 5 representa um desenho esquemático mostrando que as bandas têm tamanhos diferentes dependendo da espécie de lactobacilo. A região espaçadora é hipervariável nas diferentes cópias, assim serão obtidos diferentes fragmentos.

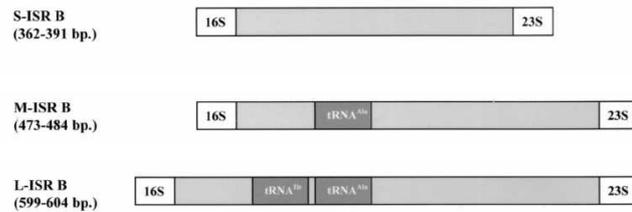


Figura 5: Desenho esquemático da região espaçadora intergênica do rDNA, subunidades 16S-23S (Kabadjova *et al.* 2002). S-ISR = Região Espaçadora Intergênica Curta M-ISR = Região Espaçadora Intergênica Média L-ISR = Região Espaçadora Intergênica Longa

V.7.2.3 – Digestão com enzimas de restrição

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão com as seguintes endonucleases de restrição: *Sph*I, *Nco*I, *Nhe*I, *Eco*RV, *Dra*I, *Sfu*I, *Ssp*I, *Vsp*I, *Hinc*II, *Eco*RI, *Hind*III (Promega) e *Avr*II (New England Biolabs, Beverly, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A escolha das enzimas de restrição foi baseada na análise *in silico* das seqüências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, por 1 hora, a 100 V. Após coloração com brometo de etídio, os géis foram examinados sob luz ultravioleta. As espécies de *Lactobacillus* foram identificadas comparando-se o resultado da digestão enzimática de cada amostra com o padrão de digestão já estabelecido de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de restrição dos produtos amplificados dos espaçadores longo, médio e curto da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus* identificados neste trabalho

<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfiI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HindI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>	ESPÉCIE
---	+++	---	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. johnsonii</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. murinus</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri</i>

Sinais +, ocorrência de digestão; Sinais -, ausência de digestão. Para cada enzima, os símbolos indicam digestão dos espaçadores longo, médio e curto, respectivamente. Adaptado de Moreira et al. (2005).

V.7.2.4 – Seqüenciamento

Na impossibilidade da identificação por ARDRA, a amostra foi submetida ao seqüenciamento da subunidade 16S do rDNA. A PCR foi realizada sob as mesmas condições descritas no item 7.2.2, com exceção do iniciador que foi o de seqüência senso 27F – 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' (desenhado por Katsumi et al. 1997) e anti-senso 1492R - 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' que amplifica a região do rDNA 16S (desenhado por Nilsen, 1999). Após excisão da banda correspondente ao fragmento de rDNA 16S, o produto foi purificado, empregando-se GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA), conforme as recomendações do fabricante. O seqüenciamento foi realizado no Núcleo de Análise e Expressão Gênica – NAGE (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG), utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit em seqüenciador automático MegaBACE™ 1000 Analysis Systems (Amersham Bioscience). Cada produto amplificado foi seqüenciado em duplicata, nos sentidos senso e anti - senso.

A seqüência obtida foi alinhada e comparada com seqüências depositadas no GenBank, através do programa BLAST (<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST>). A seqüência de similaridade maior ou igual a 98% com outra seqüência de nucleotídeos foi considerada identificada.

Toda a análise microbiológica deste trabalho foi realizada no laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos do Departamento de Microbiologia - ICB / UFMG e a molecular no laboratório de Genética molecular de Protozoários Parasitas ICB/UFMG com a colaboração do Mestrando João Luiz Moreira. A análise molecular também contou com a colaboração da Dra Roberta Lima Caldeira - IRR /FIOCRUZ.

V.8 – Análises Estatísticas

A comparação do efeito das rações sobre o acompanhamento do peso, o tamanho da prole, o peso relativo dos órgãos e os níveis populacionais de bactérias, foi realizada pelo teste de ANOVA seguido de comparações múltiplas pelo método de Tukey, quando as suposições deste teste foram válidas. Caso contrário, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas pelo método de Dunn's ou de Student-Newman-Keuls.

A comparação da razão MRS / MC com o valor teórico 1 foi realizada através do teste não paramétrico de Wilcoxon.

Os dados de ocorrência de endoparasitos e prevalência de *Lactobacillus* e bactérias patogênicas foram comparados entre as marcas de rações pelo teste Qui-quadrado (χ^2).

Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). As análises foram realizadas utilizando os programas estatísticos MINITAB 13 e SigmaStat 3.5.

V. 9 - Considerações Éticas

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - FIOCRUZ, sendo aprovado e licenciado pelo nº. L-0019/07 e está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A manutenção e o manejo dos animais nos experimentos também foram conduzidos respeitando-se o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", National Research Council, Washington, D.C., 1996.

O parecer da CEUA encontra-se no Anexo 1.

O método de escolha para a eutanásia dos animais foi o químico, por inalação de CO₂, segundo Cardoso (2002) e Andersen *et al.* (2004).

VI – RESULTADOS

VI.1 Análise da composição nutricional das diferentes marcas de rações comerciais autoclaváveis

Os dados apresentados na Tabela 3 referem-se à (média \pm desvio padrão) da análise composicional de quatro lotes de cada ração. Os lotes das rações foram fabricados em novembro de 2006; abril, julho e setembro de 2007. As análises de cada lote encontram-se nos Anexos 2 a 5.

Tabela 3 – Análise da composição nutricional das rações

Ração	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra (%)	Proteína bruta (%)	Carboidrato (%)
A - Rótulo	12 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
A - Autoclav.	8,11 \pm 0,46	9,97 \pm 2,35 ^A	12,77 \pm 1,32	10,39 \pm 1,93	21,13 \pm 0,67	37,63 \pm 2,08
A - Não autoclav.	8,40 \pm 0,33	8,74 \pm 0,57	10,75 \pm 2,17	10,26 \pm 1,51	21,25 \pm 3,25	40,61 \pm 2,43
B - Rótulo	13 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	10 (máx)	23 (mín)	NF
B - Autoclav.	7,90 \pm 0,87	6,96 \pm 0,45 ^B	8,82 \pm 3,56	11,12 \pm 0,96 ^a	22,13 \pm 0,51	43,09 \pm 3,02
B - Não autoclav.	8,16 \pm 0,60	6,50 \pm 0,77	11,15 \pm 2,92	9,38 \pm 0,46 ^b	20,24 \pm 3,83	44,74 \pm 2,09
C - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	3,0 (mín)	9,0 (máx)	22 (mín)	NF
C - Autoclav.	7,81 \pm 0,82	8,45 \pm 0,52 ^{A,B}	11,06 \pm 3,12	12,23 \pm 1,04 ^a	21,11 \pm 3,49	39,36 \pm 4,98
C - Não autoclav.	8,45 \pm 0,50	8,43 \pm 0,56	10,73 \pm 3,81	9,48 \pm 0,65 ^b	24,26 \pm 2,58	38,55 \pm 4,47
D - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
D - Autoclav.	8,20 \pm 1,27	7,84 \pm 1,34 ^b _{A,B}	10,82 \pm 2,39	10,23 \pm 0,78	22,42 \pm 0,85	40,50 \pm 4,47
D- Não autoclav	8,12 \pm 0,75	8,08 \pm 1,32 ^a	10,76 \pm 4,96	11,24 \pm 1,74	22,24 \pm 0,97	39,82 \pm 6,8
Recomendação AIN-93G*	6,6 (mín)	4,17 (mín)	7 (mín)	5 (mín)	19,3 (mín)	64 (mín)

*REEVES P.G., NIELSEN F.H. & FAHEY G.C., Jr. (1993)

NF = Não Fornecido

^{a,b} Letras distintas, na mesma coluna e na mesma marca de ração, indicam resultados estatisticamente diferentes.

^{A,B} Letras distintas, na mesma coluna, indicam resultados estatisticamente diferentes.

1º - Comparação da composição das rações AUTOCLAVADAS com a descrição dos rótulos das embalagens e com o recomendado pelo AIN-93G:

Observou-se que o teor de fibra em todos os lotes das 4 marcas de rações analisadas foi superior aos respectivos valores máximos descritos nos rótulos das embalagens, bem como o valor médio. À exceção dos carboidratos, os demais componentes das rações foram semelhantes. O teor de carboidrato mostrou-se abaixo do mínimo recomendado pelo AIN-93G em todas as rações analisadas, além disso, não estavam descritos nos rótulos das embalagens os valores de referência de carboidrato. De um modo geral, os outros componentes analisados apresentaram-se dentro dos valores mínimos recomendados pelo AIN 93-G e de acordo com o descrito nos rótulos das embalagens.

2º - Comparação do teor médio dos nutrientes dos diferentes lotes das rações analisadas após a autoclavação:

Foi observado que não houve diferença significativa do teor médio (dos quatro lotes) entre as marcas de ração analisadas após a autoclavação. Chamamos atenção apenas para o teor médio de cinzas (dos quatro lotes) na ração **B** que foi significativamente menor que na ração **A**.

3º - Comparação do teor dos componentes das rações antes e após a autoclavação

Observamos que não houve diferença significativa do teor dos componentes das rações antes e após a autoclavação. Chamamos atenção para o teor de fibra, nas rações **B** e **C**, que foi significativamente maior após a autoclavação. O teor de Cinzas, na ração **D**, antes da autoclavagem é significativamente maior que após a autoclavagem.

Foram utilizados os seguintes testes estatísticos para as análises dos teores dos componentes das rações: Teste - T, Wilcoxon Signed Rank Test, Análise de Variância, Teste de comparações Múltiplas de Dunn's e teste estatístico de Kruskal-Wallis.

VI.2 - Avaliação da capacidade reprodutiva dos camundongos alimentados com as diferentes rações

Foram analisadas três gerações de animais alimentados com as diferentes rações. Nas gerações F0, F1 e F2 foi analisado o número de fêmeas grávidas por grupo/marca de ração e o número de filhotes. As Tabelas 4 e 5 apresentam respectivamente a porcentagem de fêmeas prenhas e o número de filhotes/fêmea nos animais alimentados com as diferentes rações.

Tabela 4 -Porcentagem de fêmeas prenhas por marca de ração

Porcentagem de ♀ prenhas/ Gerações	Ração A	Ração B	Ração C	Ração D
F0	87,5 ^a	81,2 ^a	66,7 ^{a b}	43,7 ^b
F1	93,3 ^a	75,0 ^a	71,4 ^a	56,2 ^a
F2	81,2 ^a	62,5 ^a	87,5 ^a	62,5 ^a
Total	87,2 ± 4,9%	72,9 ± 6,4%	69,6 ± 6,8%	54,2 ± 7,2%

^{a,b} indicam resultados estatisticamente diferentes, nas linhas, pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Gerações: F0, F1, F2

Total de acasalamentos feitos por marca de ração: 08

Modalidade de acasalamento: 2♀ x 1♂

Total de fêmeas por grupo: 16

Observamos que os animais alimentados com as rações **A**, **B** e **C** apresentam um índice de prenhes quase semelhante. Os animais alimentados com a ração **D** comportam-se de forma diferente, especificamente na geração **F0**. Nas demais gerações observa-se uma tendência a um maior número de fêmeas prenhas quando alimentadas com a ração **A** e o contrário quando alimentadas com a ração **D**.

Tabela 5: Número de filhotes por fêmeas das gerações F0, F1 e F2 por marca de ração.

	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	V	N	V	N	V	N	V	N
Filhotes F1/♀	9,50 ± 4,13 ^{a,a}	0,06 ± 0,25	9,38 ± 4,84 ^a	0	4,81 ± 5,23 ^{a,b}	0	3,63 ± 4,98 ^b	0,06 ± 0,25
Filhotes F2/♀	9,20 ± 3,23 ^a	0	8,93 ± 4,53 ^a	0	6,21 ± 4,19 ^a	0	6,12 ± 5,66	0,25 ± 1
Filhotes F3/♀	8,12 ± 4,60 ^a	0	6,06 ± 5,30 ^a	0	6,87 ± 3,07 ^a	0	5,56 ± 4,58 ^a	0
Total	8,94 ± 4,00 ^a	0,02 ± 0,15	8,13 ± 5,03 ^a	0	5,96 ± 4,26 ^a	0	5,10 ± 5,10 ^a	0,10 ± 0,59

* Média ± desvio padrão

^{a,b} indicam resultados estatisticamente diferentes, nas linhas, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's ($p < 0,05$)

V = Filhotes vivos N = Natimortos

Observamos que há uma tendência a um menor número de filhotes por fêmeas quando alimentadas com a ração **D** em todas as gerações. O número de filhotes / fêmeas alimentadas com as rações **A** apresenta-se maior. Em relação à ração **C** observa-se um resultado intermediário. O número de natimortos foi zero ou próximo a zero.

VI.3 – Análise do desenvolvimento ponderal dos camundongos das gerações F0, F1 e F2

Os resultados obtidos em relação ao desenvolvimento ponderal de camundongos machos e fêmeas pertencentes às gerações F0, F1 e F2 estão descritos nas Figuras 6, 7 e 8 respectivamente. Aos 3 e aos 15 dias os animais não foram separados por sexo em todas as gerações analisadas. Nos anexos 6, 7, 8, 9, 10 e 11 estão apresentados os gráficos relacionados ao desenvolvimento ponderal de camundongos machos e fêmeas, separadamente, referentes às gerações.

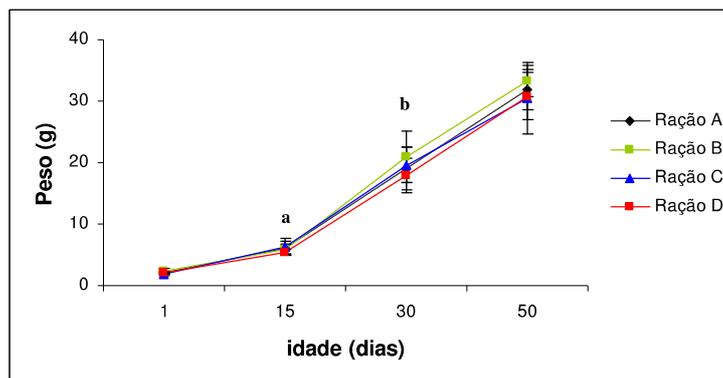


Figura 6: Desenvolvimento ponderal de camundongos **machos e fêmeas** da geração **F0** alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam o desvio padrão da média. ^a O ganho em peso dos animais alimentados com a ração C é estatisticamente maior do que o dos animais alimentados com a ração D ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Dunn's. ^b O ganho em peso dos animais alimentados com a ração B é estatisticamente maior do que o dos animais alimentados com a ração D ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Tukey.

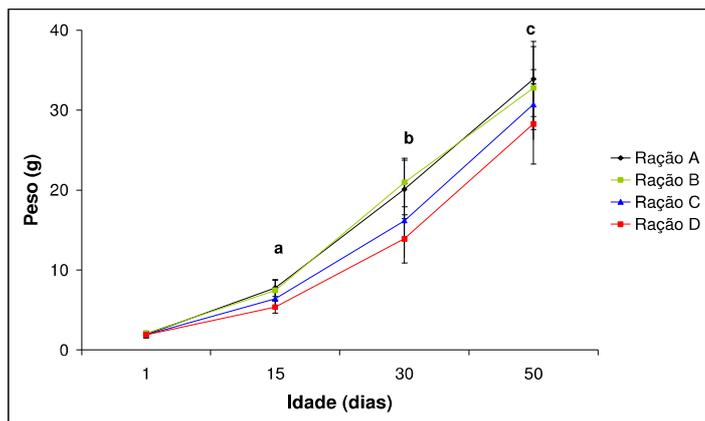


Figura 7: Desenvolvimento ponderal de camundongos **machos e fêmeas** da geração **F1** alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam desvio padrão da média. ^a O ganho em peso dos animais alimentados com ração D é estatisticamente menor em relação aos alimentados com as rações A e B ($p < 0,05$) e o ganho em peso dos camundongos alimentados com a ração A é significativamente maior que dos animais alimentados com a ração C através do método de comparações múltiplas de Dunn's. ^b O ganho em peso dos animais alimentados com as rações C e D é estatisticamente menor daqueles alimentados com A e B ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparações múltiplas de Dunn's. ^c O ganho em peso dos animais alimentados com a ração D é estatisticamente menor daquele dos animais alimentados com A e B ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey.

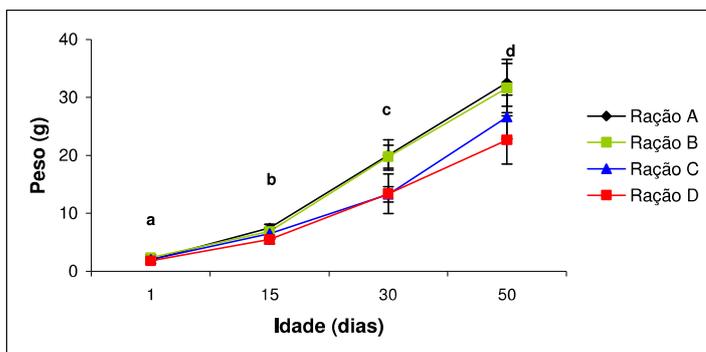


Figura 8: Desenvolvimento ponderal de camundongos **machos e fêmeas** da geração **F2** alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam desvio padrão da média. ^a O ganho em peso dos animais alimentados com ração B é significativamente maior do que os alimentados com A, C e D ($p < 0,05$) através do método de comparações múltiplas de Dunn's. ^b O ganho em peso dos animais alimentados com a ração D é estatisticamente menor do que aqueles alimentados com as rações A, B e C ($p < 0,05$), além disso, o ganho em peso dos animais alimentados com a ração A é estatisticamente maior do que aqueles alimentados com a ração C através do método de comparações múltiplas de Dunn's. ^c O ganho em peso dos animais alimentados com as rações C e D é significativamente menor daquele dos animais alimentados com A e B ($p < 0,05$) através do método de comparações múltiplas de Dunn's. ^d O ganho em peso dos animais alimentados com as rações A e B é significativamente maior daquele dos animais alimentados com C e D ($p < 0,05$) através do método de comparações múltiplas de Tukey, além disso, o ganho em peso dos animais alimentados com a ração C é significativamente maior daquele dos animais alimentados com a ração D ($p < 0,05$) através do método de comparações múltiplas de Tukey.

VI.4 – Avaliação do peso relativo do baço, fígado, rins, pulmão e coração de camundongos com 30 e 50 dias de idade alimentados com as diferentes rações comerciais.

Foram escolhidos aleatoriamente em cada grupo/marca de ração 4 camundongos machos e 4 fêmeas com 30 e 50 dias de idade. Os animais foram pesados, eutanasiados e utilizados para a análise de peso relativo à massa corpórea dos órgãos e análise parasitológica. Nas Figuras 9, 10, 11 e 12 estão registrados os pesos relativos dos órgãos dos camundongos machos e fêmeas com 30 e 50 dias de idade/ geração **F0**, respectivamente.

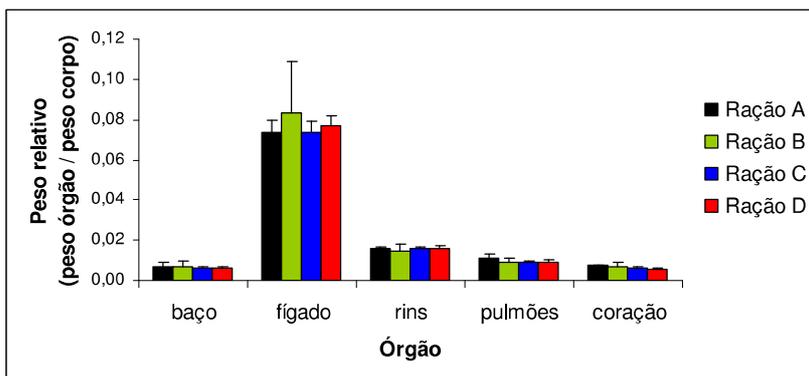


Figura 9: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos **machos com 30 dias de idade** pertencentes à **F0**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

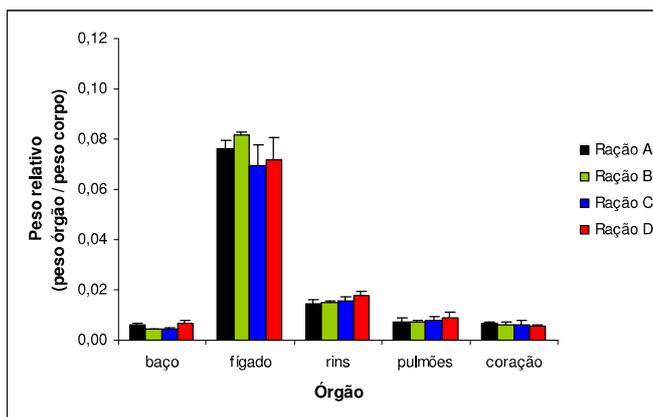


Figura 10: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos **machos** com **50 dias de idade** pertencentes à **F0**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

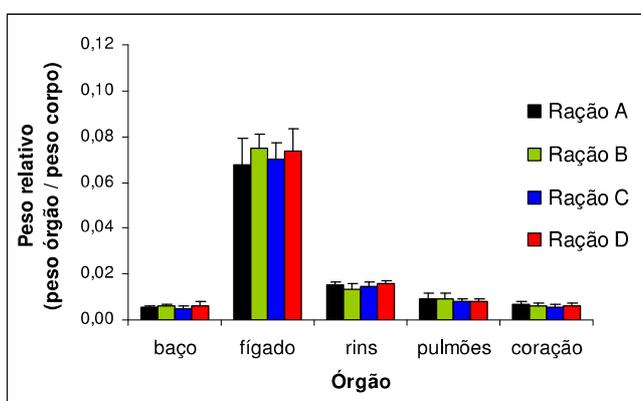


Figura 11: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos camundongos **fêmeas** com **30 dias de idade** pertencentes à **F0**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

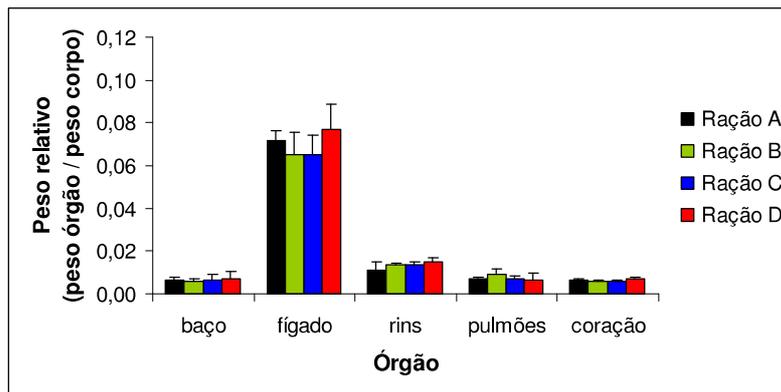


Figura 12: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos fêmeas com 50 dias de idade** pertencentes à **F0**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

Nas Figuras 13 e 14 estão registrados os pesos relativos dos órgãos dos camundongos fêmeas com 30 e 50 dias de idade respectivamente e pertencentes à **F1**. Nas figuras 15 e 16 estão registrados os pesos relativos dos órgãos de camundongos machos com 30 e 50 dias de idade, pertencentes à mesma geração.

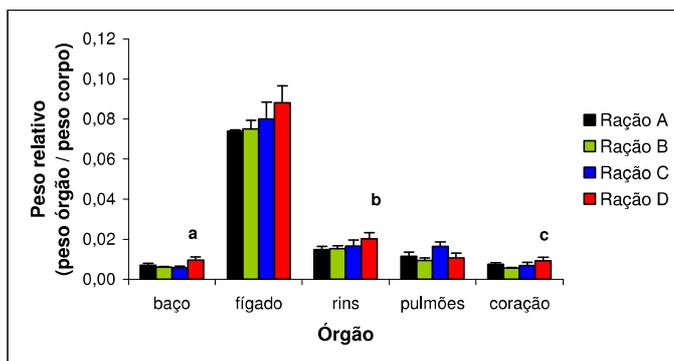


Figura 13: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos fêmeas com 30 dias de idade** pertencentes à **F1**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. ^a O peso do baço do grupo de animais alimentados com a ração D é significativamente maior do que os grupos alimentados com as rações A, B e C ($P < 0,05$). ^b O peso dos rins do grupo de animais alimentados com a ração D é significativamente maior do que os grupos alimentados com as rações A e B ($P < 0,05$). ^c O peso do coração do grupo de animais alimentados com a ração D é significativamente maior do que o grupo alimentado com a ração B ($P < 0,05$). Foi utilizado o Teste estatístico de Comparações Múltiplas de Tukey.

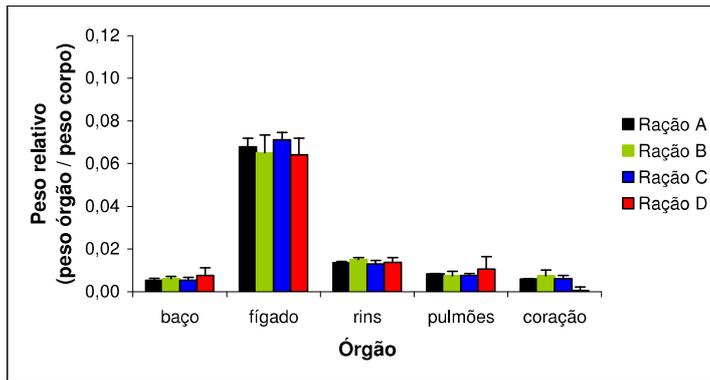


Figura 14: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos fêmeas com 50 dias de idade** pertencentes à **F1**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. Não houve diferença estatística significativa do peso dos órgãos entre os grupos ($P > 0,05$).

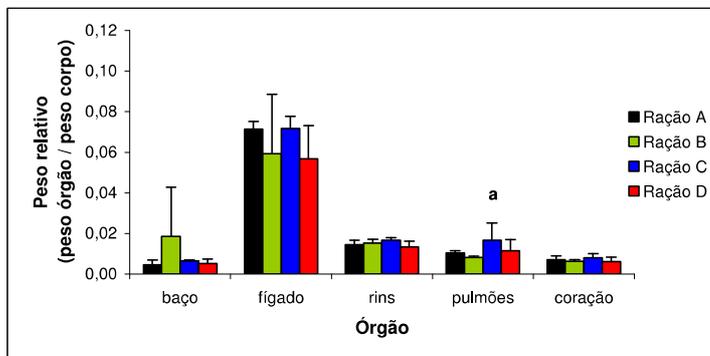


Figura 15: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos machos com 30 dias de idade** pertencentes à **F1**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. ^a O peso do pulmão do grupo de animais alimentados com a ração C é significativamente maior que dos alimentados com a ração B ($P < 0,05$) de acordo com o Teste de Comparações Múltiplas de Dunn's.

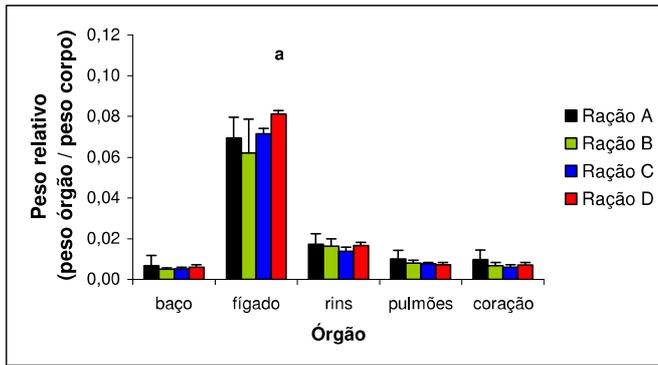


Figura 16: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos machos com 50 dias de idade** pertencentes à **F1**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. ^a O peso do fígado do grupo de animais alimentados com a ração D é significativamente maior que dos alimentados com a ração B ($P < 0,05$) de acordo com o Teste de Comparações Múltiplas de Dunn's.

Quanto à geração **F2**, nas Figuras 17 e 18 estão registrados os pesos relativos dos órgãos dos camundongos fêmeas com 30 e 50 dias de idade respectivamente. Nas figuras 19 e 20 estão registrados os pesos relativos dos órgãos de camundongos machos com 30 e 50 dias de idade, pertencentes à mesma geração.

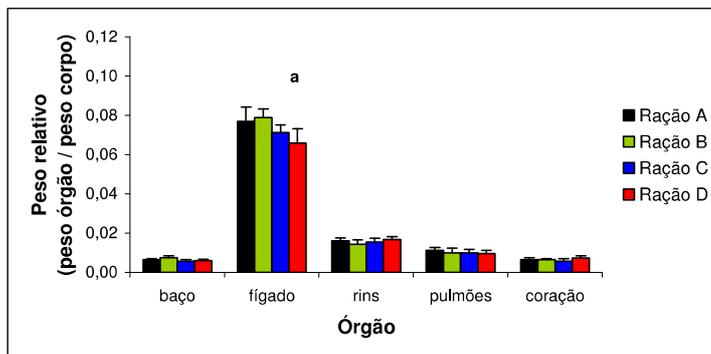


Figura 17: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos fêmeas com 30 dias de idade** pertencentes à **F2**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. ^a O peso do fígado do grupo de animais alimentados com a ração D é significativamente menor que dos alimentados com a ração B ($P < 0,05$) de acordo com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

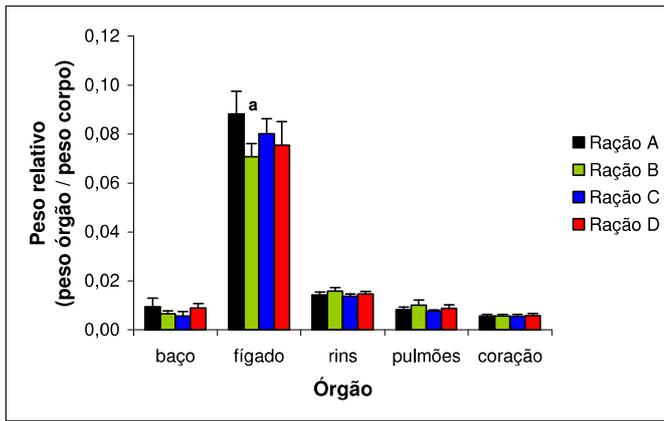


Figura 18: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos fêmeas com 50 dias de idade** pertencentes à **F2**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. ^a O peso do fígado do grupo de animais alimentados com a ração B é significativamente menor que dos alimentados com a ração A ($P < 0,05$) de acordo com o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

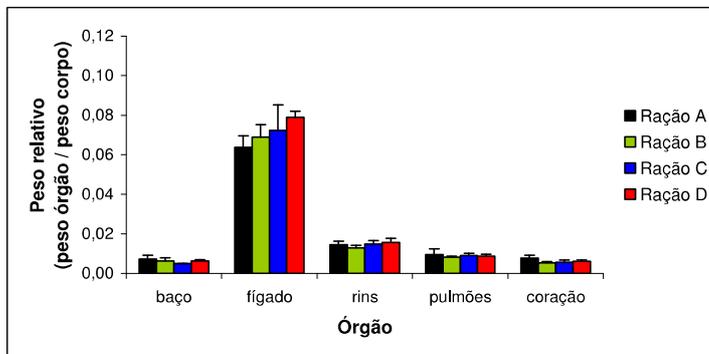


Figura 19: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos machos com 30 dias de idade** pertencentes à **F2**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

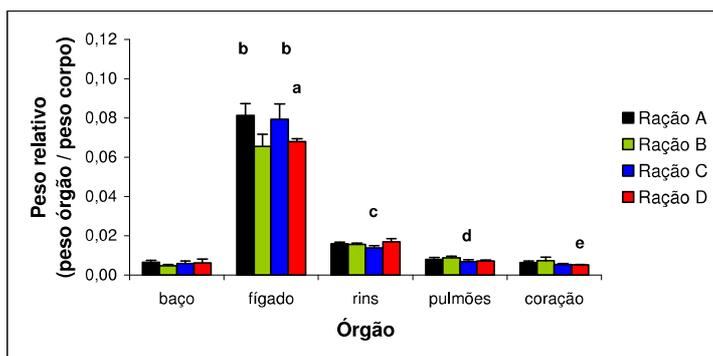


Figura 20: Peso relativo dos órgãos (médias \pm desvio padrão) dos **camundongos machos com 50 dias de idade** pertencentes à **F2**. As barras verticais representam o desvio padrão em relação à média. ^a O peso do fígado do grupo de animais alimentados com a ração D é significativamente menor que dos alimentados com a ração A ($P < 0,05$). ^b O peso do fígado dos animais alimentados com as rações A e C são significativamente maiores que dos alimentados com a ração B ($P < 0,05$). ^c O peso dos rins dos animais alimentados com a ração C é significativamente menor que dos alimentados com a ração D ($P < 0,05$). ^d O peso do pulmão dos animais alimentados com a ração C é significativamente menor que dos alimentados com a ração B ($P < 0,05$). O teste estatístico utilizado para a análise do peso do baço, fígado, rins e pulmão foi o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. ^e O peso do coração dos animais alimentados com a ração D é significativamente menor que dos alimentados com a ração B ($P < 0,05$) de acordo com o Teste de Comparações Múltiplas de Dunn's.

VI.5 - Ocorrência de endoparasitos em camundongos das gerações F0, F1 e F2, com 30 e 50 dias de idade, alimentados com diferentes rações comerciais.

Nas Tabelas 6 e 7 estão descritos os parasitos encontrados nos camundongos da **geração F0** com 30 e 50 dias de idade respectivamente.

Tabela 6 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F0 aos 30 dias de idade alimentados com diferentes rações

Animal	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo
1	Sobvelata	Smuris	Sobvelata	Smuris	-	Smuris T.muris	-	Smuris T.muris
2	Sobvelata	Smuris T.muris	Sobvelata	Smuris T.muris	-	Smuris T.muris	-	Smuris
3	Sobvelata	Smuris T.muris T.minuta	Sobvelata	Smuris	Sobvelata	-	Sobvelata	Smuris T.muris T.minuta
4	Sobvelata	Smuris T.muris T.minuta	-	T.muris T.minuta	Sobvelata	T.muris	-	Smuris T. minuta
5	-	-	Sobvelata	-	Sobvelata	T.muris	Sobvelata	-

Não houve diferença estatística significativa na proporção de camundongos aos 30 dias de idade infectados com helmintos e protozoários quando alimentados com as diferentes rações, de acordo com o Teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$).

Legenda: Helm = Helmintos
Sobvelata = *Syphacia obvelata*

Protozo = Protozoários
T.muris = *Tritrichomonas muris*
Smuris = *Spironucleus muris*
T. minuta = *Tritrichomonas minuta*

Tabela 7 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F0 com 50 dias de idade alimentados com diferentes rações

Animal	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo
1	-	-		S.muris T.muris	-	-	Sobvelata	T.muris
2	-	-	S.obvelata	T.muris	Sobvelata	-	Sobvelata	-
3	Sobvelata	-	-	T.muris T. minuta	Sobvelata	-	Sobvelata	-
4		S.muris T.muris T. minuta	-	T.muris	Sobvelata	S.muris T.muris	Sobvelata	T.muris T. minuta
5	Sobvelata	-	-	S.muris T.muris	Sobvelata	-	-	-

Não houve diferença estatística significativa na proporção de camundongos infectados com helmintos e protozoários quando alimentados com as diferentes rações, de acordo com o Teste Qui – Quadrado ($p > 0,05$).

Legenda: Helm = Helmintos
Sobvelata = *Syphacia obvelata*
Protozo = Protozoários
S.muris = *Spironucleus muris*
T.muris = *Tritrichomonas muris*
T. minuta = *Tritrichomonas minuta*

As Tabelas 8 e 9 referem-se à análise da ocorrência de endoparasitos nos animais pertencentes à F1 e alimentados com as diferentes rações aos 30 e 50 dias de idade respectivamente.

Tabela 8 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F1 com 30 dias de idade alimentados com diferentes rações

Animal	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	Helm.	Protozo *	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo **
1	-	Smuris T.muris	-	T.muris T.minuta	Sobvelata	Smuris	-	Smuris T.muris
2	-	T.muris	-	T.muris T.minuta	-	T.minuta Smuris	-	Smuris
3	Sobvelata	Smuris	-	T.muris T.minuta Smuris	-	T.minuta	-	T.minuta
4	Sobvelata	T.muris T.minuta	-	T.muris T.minuta Smuris	-	T.muris T.minuta Smuris	Sobvelata	T.muris T.minuta Smuris
5	-	T.muris	-	T.muris T.minuta Smuris	Sobvelata	Smuris	Sobvelata	Smuris

Não houve diferença estatística significativa na proporção de camundongos infectados com helmintos e protozoários quando alimentados e comparados entre as diferentes rações, de acordo com o Teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$). * A proporção de camundongos infectados com protozoários e alimentados com a ração A aos 30 dias, foi significativamente maior que com 50 dias de idade de acordo com o Teste Qui-Quadrado. ** 100% dos camundongos alimentados com as rações A, B, C e D mostraram-se infectados com protozoários, de acordo com o Teste Qui-Quadrado, apesar de não haver diferença significativamente estatística.

Legenda: Helm = Helmintos
Sobvelata = *Syphacia obvelata*

Protozo = Protozoários
Smuris = *Spironudeus muris* T.muris = *Tritrichomonas muris* T. minuta = *Tritrichomonas minuta*

Tabela 9 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F1 com 50 dias de idade alimentados com diferentes rações

Animal	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo**
1	Sobvelata	S.muris T.muris	-	-	-	T.minuta	Sobvelata	T.muris
2	Sobvelata	T.minuta S.muris	Sobvelata	T.muris	-	T.minuta S.muris	Sobvelata	T.muris T.minuta
3	Sobvelata	-	Sobvelata	-	Sobvelata	T.minuta	Sobvelata	T.muris T.minuta
4	-	-	-	T.muris T.minuta S.muris	-	S.muris	-	S.muris
5	Sobvelata	-	-	T.muris T.minuta	-	-	-	T.muris T.minuta S.muris

Não houve diferença estatística significativa na proporção de camundongos infectados com helmintos e protozoários quando alimentados e comparados entre as diferentes rações, de acordo com o Teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$). ** 100% dos camundongos alimentados com a ração D mostraram-se infectados com protozoários, de acordo com o Teste Qui-Quadrado, apesar de não haver diferença significativamente estatística.

Legenda: Helm = Helmintos
Sobvelata = *Syphacia obvelata*

Protozo = Protozoários
S.muris = *Spironucleus muri*
T.muris = *Tritrichomonas muris*
T. minuta = *Tritrichomonas minuta*

As Tabelas 10 e 11 correspondem respectivamente à análise da ocorrência de endoparasitos nos animais pertencentes à F2 e alimentados com as diferentes rações aos 30 e 50 dias de idade.

Tabela 10– Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F2 com 30 dias de idade alimentados com diferentes rações

Animal	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	Helm.	Protozo*	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo	Helm.	Protozo
1	-	Smuris	-	T.minuta	-	T.muris T.minuta	Sobvelata	T.muris T.minuta Smuris
2	Sobvelata	T.muris T.minuta Smuris	-	T.muris T.minuta Smuris	Sobvelata	T.minuta	Sobvelata	T.muris T.minuta Smuris
3	Sobvelata	T.minuta	Sobvelata	-	-	T.muris T.minuta	Sobvelata	T.muris T.minuta Smuris
4	-	Smuris T.muris	-	-	-	Smuris T.minuta	-	G. muris T.muris T.minuta Smuris
5	-	T.muris T.minuta	Sobvelata	Smuris T.minuta	Sobvelata	T.muris T.minuta Smuris	-	T.muris T.minuta Smuris

Não houve diferença estatística significativa na proporção de camundongos infectados aos 30 e 50 dias de idade com helmintos e protozoários quando alimentados e comparados entre as diferentes rações, de acordo com o Teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$). * A proporção de camundongos alimentados com a ração A infectados com protozoários é significativamente menor que com 50 dias de idade, de acordo com o teste Qui-Quadrado.

Legenda: Helm = Helmintos Protozo = Protozoários
Sobvelata = *Syphacia obvelata* G.muris = *Giardia muris* T.muris = *Tritrichomonas muris* T. minuta = *Tritrichomonas minuta*

Tabela 11 – Ocorrência de endoparasitos em camundongos da geração F2 com 50 dias de idade alimentados com diferentes rações

Animal	Ração A		Ração B		Ração C		Ração D	
	Helm.	Protozo**	Helm.	Protozo**	Helm.	Protozo**	Helm.	Protozo **
1	S.obvelata	T.muris	-	S.muris	-	T.minuta	-	T.muris T.minuta
2	S.obvelata	T.muris T.minuta S.muris	S.obvelata	T.minuta	-	T.muris T.minuta	S.obvelata	T.muris T.minuta
3	S.obvelata	S.muris	S.obvelata	S.muris	-	T.muris T.minuta	S.obvelata	T.muris T.minuta
4	S.obvelata	T.muris T.minuta	S.obvelata	T.muris T.minuta	S.obvelata	S.muris T.muris T.minuta	-	T.minuta
5	S.obvelata	T.muris T.minuta S.muris	-	T.muris T.minuta S.muris	S.obvelata	T.muris T.minuta	S.obvelata	S.muris T.minuta

Não houve diferença estatística significativa na proporção de camundongos infectados com helmintos e protozoários quando alimentados e comparados entre as diferentes rações: A, B, C e D, de acordo com o Teste Qui-Quadrado ($p > 0,05$). ** 100% dos camundongos mostraram-se infectados com protozoários, de acordo com o Teste Qui-Quadrado, apesar de não haver diferença significativamente estatística.

Legenda: Helm = Helmintos
S.muris = *Spironucleus muris*

Protozo = Protozoários
T.muris = *Tritrichomonas muris*

S.obvelata = *Syphacia obvelata*
T.minuta = *Tritrichomonas minuta*

VI.6 – Nível populacional de bactérias nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações

Após a contagem de colônias de bactérias em placas de Petri contendo agar McConkey (Difco, Spark, USA), meio seletivo diferencial para o isolamento de bacilos entéricos gram-negativos, foram isoladas 14 amostras de bactérias (diferentes morfotipos) nas fezes dos camundongos, referentes às 3 gerações de animais analisadas aos 30 e 50 dias de idade e alimentadas com as diferentes marcas de rações comerciais. Na contagem de colônias de bactérias em placas de Petri contendo agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco), meio de cultura enriquecido para o isolamento de lactobacilos, foram encontrados 11 isolados (diferentes morfotipos) referentes aos mesmos animais analisados.

Nas Figuras 21 e 22 está registrada a contagem bacteriana de Unidade Formadora de Colônia – UFC/g de fezes de camundongos pertencentes a F0 com 30 e 50 dias de idade, alimentados com diferentes marcas de rações comerciais. Aos 30 dias, os animais alimentados com a ração D, apresentaram um maior número de enterobactérias nas fezes ($p < 0,05$). Com 50 dias de idade esta diferença não foi observada. O número de lactobacilos foi o mesmo aos 30 e 50 dias.

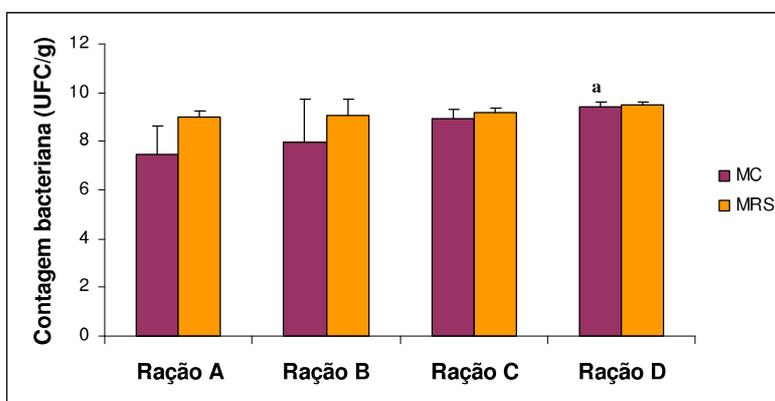


Figura 21: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F0 com 30 dias de idade. ^a resultado significativamente diferente ($p < 0,05$) segundo o método Student- Newman-Keuls, maior número de enterobactérias nas fezes dos animais alimentados com a ração D. MC = agar McConkey (Difco, Spark, USA); MRS = agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco); Valores expressos em Log_{10} .

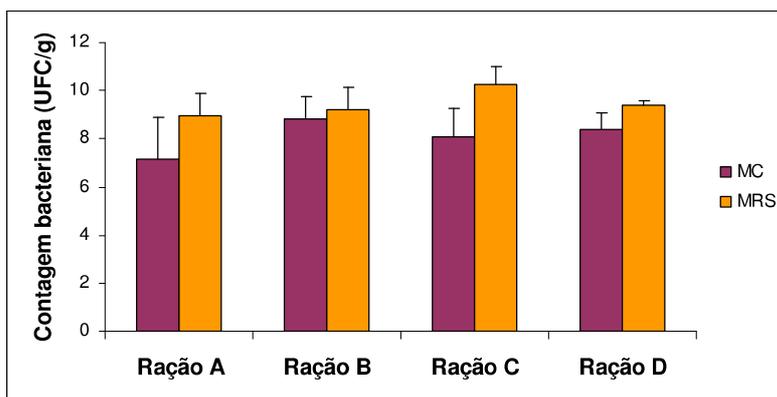


Figura 22: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a **F0** com **50 dias** de idade. Não houve diferença estatisticamente significativa nos números de enterobactérias e lactobacilos nas fezes dos animais alimentados com as diferentes rações. MC = agar McConkey (Difco, Spark, USA); MRS = agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco); Valores expressos em **Log₁₀**.

Nas Figuras 23 e 24 está registrada a contagem bacteriana de Unidade Formadora de Colônia – UFC/g de fezes de camundongos pertencentes a F1 com 30 e 50 dias de idade respectivamente, alimentados com diferentes marcas de rações comerciais.

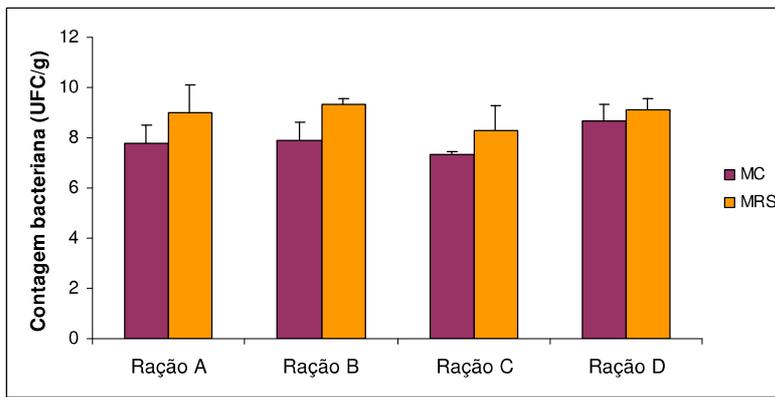


Figura 23: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a **F1** com **30 dias** de idade. Não houve diferença estatisticamente significativa nos números de enterobactérias e lactobacilos nas fezes dos animais alimentados com as diferentes rações. MC = agar McConkey (Difco, Spark, USA); MRS = agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco). Valores expressos em **Log₁₀**.

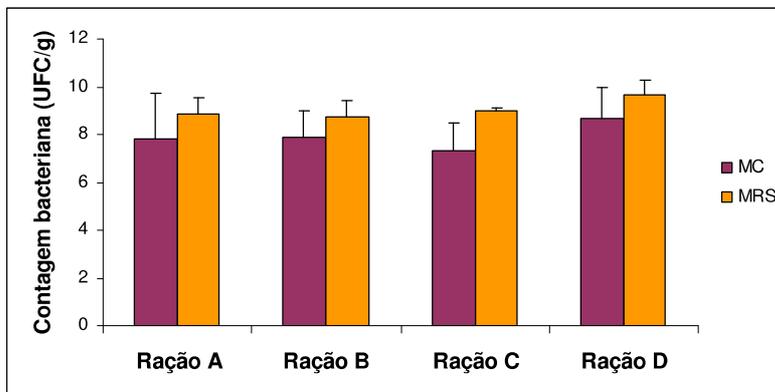


Figura 24: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a **F1** com **50 dias** de idade. Não houve diferença estatisticamente significativa nos números de enterobactérias e lactobacilos nas fezes dos animais alimentados com as diferentes rações. MC = agar McConkey (Difco, Spark, USA); MRS = agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco). Valores expressos em **Log₁₀**.

Nas Figuras 25 e 26 estão registradas as contagens bacterianas de Unidade Formadora de Colônia – UFC/g de fezes de camundongos pertencentes a F2 com 30 e 50 dias de idade respectivamente, alimentados com diferentes marcas de rações comerciais.

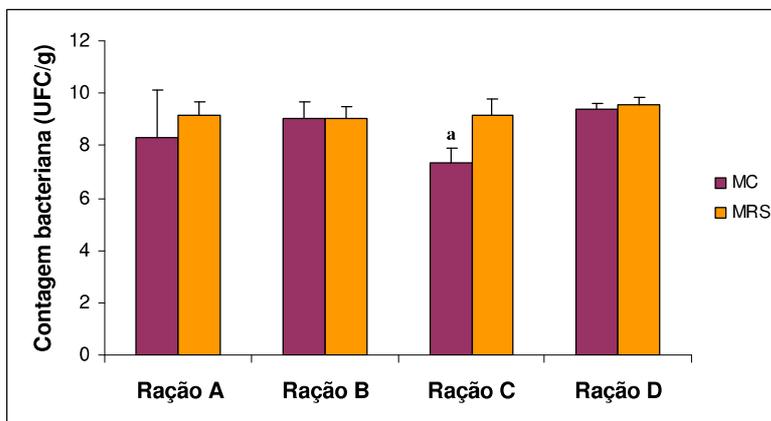


Figura 25: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a F2 com 30 dias de idade. ^a resultado significativamente diferente ($p < 0,05$) segundo o método Student- Newman-Keuls, menor número de enterobactérias nas fezes dos animais alimentados com a ração C. MC = agar McConkey (Difco, Spark, USA); MRS = agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco); Valores expressos em Log_{10}

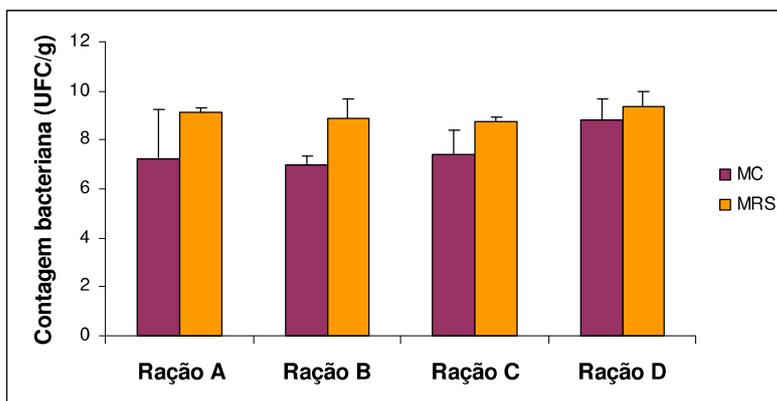


Figura 26: Contagem bacteriana (média \pm desvio padrão) de Unidade Formadora de colônia – UFC/g nas fezes de camundongos pertencentes a **F2** com **50 dias** de idade. Não houve diferença estatisticamente significativa nos números de enterobactérias e lactobacilos nas fezes dos animais alimentados com as diferentes rações. MC = agar McConkey (Difco, Spark, USA); MRS = agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco); Valores expressos em **Log₁₀**

Foi montada uma relação entre as contagens médias dos números de Unidade Formadora de Colônia dos meios MRS sobre o meio MC para todas as rações em cada geração e idade analisadas. A Tabela 12 refere-se aos resultados desta relação. O valor de MRS/MC deve ser sempre superior a 1.

Tabela 12 - Relação MRS / MC das Gerações F0, F1 e F2 com 30 e 50 dias

Rações	F0		F1		F2	
	30 dias	50 dias	30 dias	50 dias	30 dias	50 dias
A	1,21	1,25	1,15	1,14	1,11	1,26
B	1,14	1,04	1,18	1,10	1,00	1,27
C	1,02	1,27	1,13	1,23	1,25	1,18
D	1,01	1,12	1,05	1,11	1,02	1,06

Utilizando-se o teste estatístico de Wilcoxon, observou-se que a relação **MRS/MC** referente ao nível populacional de lactobacilos sobre enterobactérias não foi inferior a 1 para as rações, gerações e idades analisadas.

VI.7 – Identificação das enterobactérias isoladas nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações

Os 14 isolados do agar McConkey (Difco, Spark, USA) congelados a -20° C e correspondentes às amostras n°s 1, 2, 3, 14, 15, 25, 26, 27, 28, “a”, “b”, 29, 45 e 52 foram identificados com o auxílio do KIT API 20 E. A bactéria só é identificada quando utiliza acima de 80% dos substratos típicos para aquelas espécies. Utilizando-se o programa API LAB da bioMérieux foi possível a identificação das amostras n°s 2, 15, 25, 26, 27, 28, “b”, 29, 45 e 52. As demais amostras não foram possíveis de serem identificadas uma vez que a identificação das bactérias é somente confiável acima de 80% de acordo com o programa utilizado.

Leitura da porcentagem de isolados utilizando-se o software API LAB da bioMérieux:

As amostras 1, 3, 14 e “a” não foram identificadas. As amostras 2, 25, 26, 27, 28, “b”, 29, 45 e 52 foram identificadas como *Escherichia coli*. A amostra 15 foi identificada como *Pantoea spp.*

Na Figura 27 estão descritas as porcentagens dos isolados de enterobactérias por marca de ração nas fezes dos animais pertencentes às três gerações analisadas:

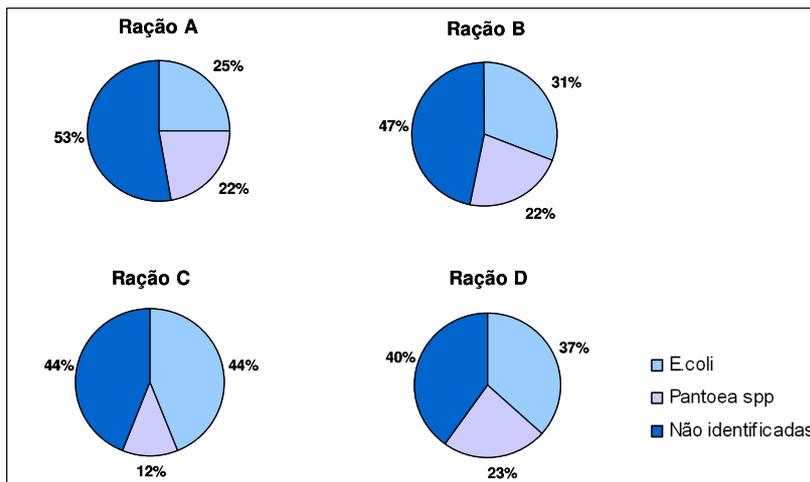


Figura 27: Porcentagens de Enterobactérias isoladas nas fezes de animais alimentados com as diferentes rações

VI.8 – Identificação dos lactobacilos isolados nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações comerciais

ARDRA

Foi realizada a amplificação por PCR do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA das bactérias e subsequente digestão por um painel de 12 enzimas de restrição (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII*, *AvrII*) adquiridas da Promega Corporation (Madison, WI, USA). Dos 11 isolados de bactérias, foram identificadas 4 espécies de lactobacilos: *Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* e *L. murinus*.

A figura 28 corresponde à amplificação por PCR do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV. Apenas as amostras que apresentaram 3 bandas nítidas foram digeridas (são características de lactobacilos a presença de 3 bandas).

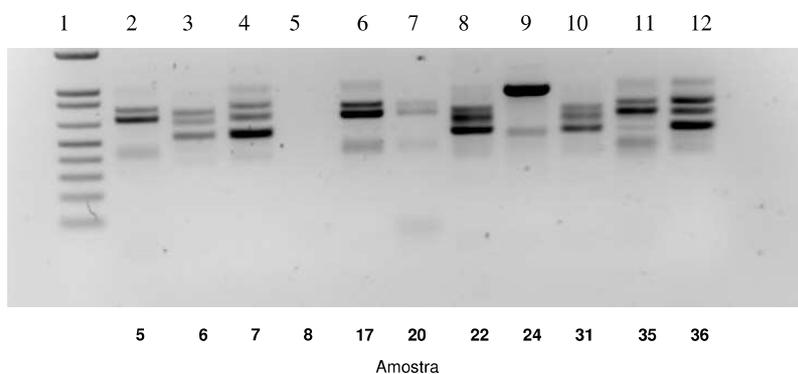


Figura 28: Gel de Agarose (1,4%) mostrando os produtos de amplificação pela PCR do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de amostras de *Lactobacillus*. Canaleta 1: Marcador molecular (1 KB Plus DNA Ladder). As canaletas 2 a 12 correspondem às 11 amostras dos *Lactobacillus*.

As figuras 29 á 31 representam a digestão do espaçador intergênico 16S – 23 S das espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* respectivamente.

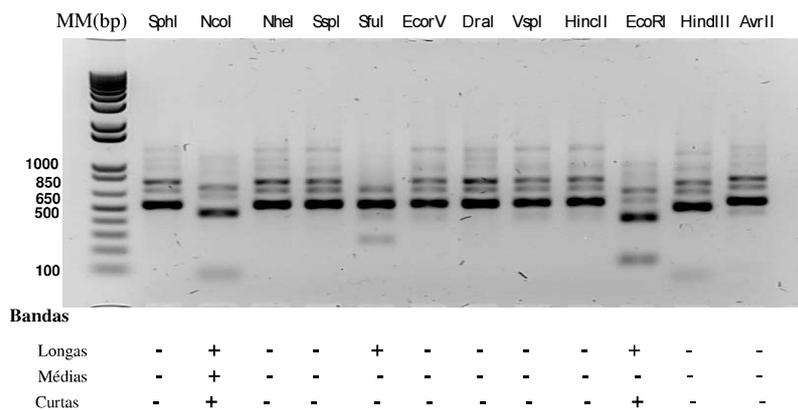


Figura 29: Gel de Agarose (1,4%) mostrando o produto da digestão do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de *Lactobacillus acidophilus* (amostra n°7, canaleta 4 Figura 28). A digestão foi realizada com 12 enzimas de restrição relacionadas acima de cada canaleta. Os sinais + e -, abaixo das canaletas significam clivagem ou não das regiões longas, médias ou curtas dos produtos do PCR, respectivamente. A primeira canaleta (MM) corresponde ao Marcador molecular (1 KB Plus DNA Ladder). Os valores do peso molecular estão mostrados a esquerda do gel.

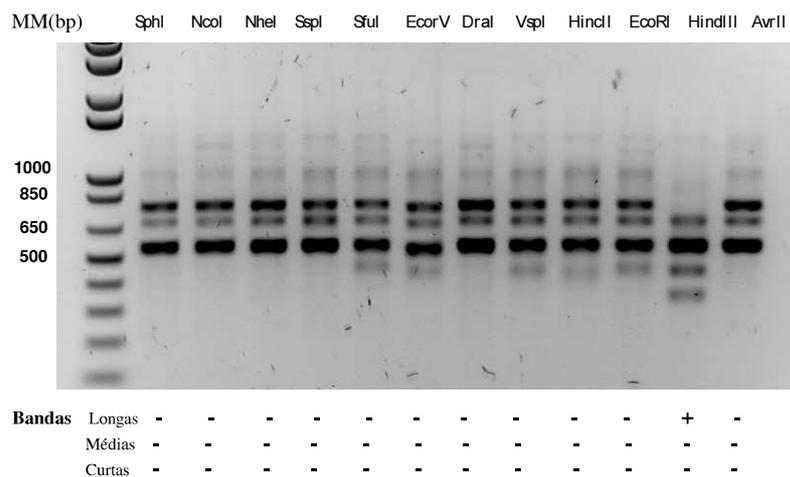


Figura 30: Gel de Agarose (1,4%) mostrando o produto da digestão do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de *Lactobacillus johnsonii* (amostra nº 22, canaleta 8, Figura 28). A digestão foi realizada com 12 enzimas de restrição relacionadas acima de cada canaleta. Sinais + e -, abaixo das canaletas significam clivagem ou não das regiões longas, médias ou curtas dos produtos do PCR, respectivamente. A primeira canaleta (MM) corresponde ao Marcador molecular (1 KB Plus DNA Ladder). Os valores do peso molecular estão mostrados a esquerda do gel.

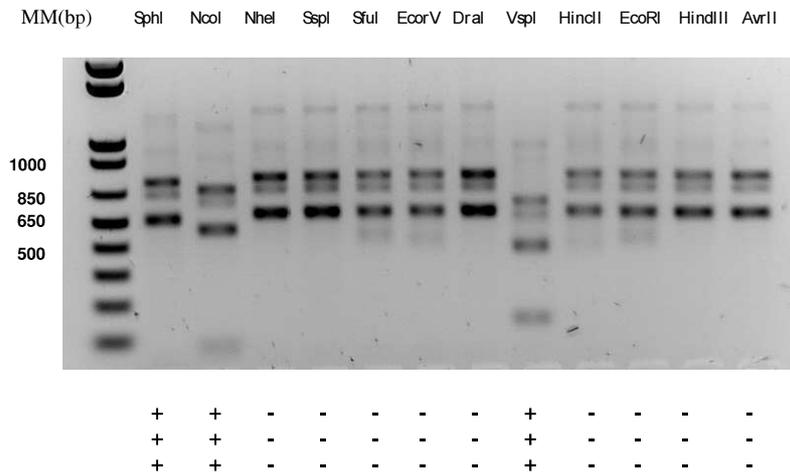


Figura 31: Gel de Agarose (1,4%) mostrando o produto da digestão do espaçador intergênico 16S – 23S do rDNA de *Lactobacillus reuteri* (amostras n^os 6, 24, 31, 35, 36, correspondentes às canaletas 3, 9, 10, 11 e 12 da Figura 28, respectivamente). A digestão foi realizada com 12 enzimas de restrição relacionadas acima de cada canaleta. Sinais + e -, abaixo das canaletas significam clivagem ou não das regiões longas, médias ou curtas dos produtos do PCR, respectivamente. A primeira canaleta (MM) corresponde ao Marcador molecular (1 KB Plus DNA Ladder). Os valores do peso molecular estão mostrados a esquerda do gel.

Seqüenciamento

Não foi possível a identificação das amostras 5, 8, 17, 20 por PCR ARDRA. Elas foram submetidas ao seqüenciamento da região 16S do rDNA. As seqüências foram alinhadas e comparadas com a seqüência depositada no GenBank resultando na identificação do *L. murinus* em todas as quatro amostras.

VII – DISCUSSÃO

VII. 1 - Composição nutricional das rações

De um modo geral, todas as rações analisadas nos quatro lotes apresentaram composição nutricional dentro dos valores descritos nos rótulos e abordando os valores recomendados pela American Institute of Nutrition (AIN 93G). A exceção foi o teor de carboidratos, que foi bem abaixo dos 64% recomendado em todas as marcas e lotes analisados e também o teor de fibra que apresentou-se acima do valor máximo descrito nos rótulos das embalagens. É importante observar que nenhuma das rações cita níveis de carboidratos nos rótulos. Sabe-se que a sua principal função na dieta dos animais é o fornecimento de energia. Apesar de que em todas as marcas de rações analisadas o teor de carboidrato estar bem abaixo do recomendado, isso parece não ter interferido no desenvolvimento dos animais. Para uma ração afetar o metabolismo do animal por falta de carboidrato, este deveria ter uma concentração próxima de zero. Em dietas cetogênicas ele é de 2%. Por isso, não acreditamos que a concentração de carboidrato das rações analisadas tenha influenciado o peso corporal dos animais.

Quando foi comparada a composição das rações autoclavadas com a descrição dos rótulos das embalagens e com o recomendado pelo AIN-93G observou-se que em relação às rações **A**, **B**, **C** e **D** os teores médios de umidade, cinzas, extrato etéreo, fibra e proteína nos 4 lotes analisados apresentaram-se dentro dos valores descritos (exceto fibra, em relação aos rótulos das embalagens).

Comparando-se o teor médio dos nutrientes dos 4 lotes das rações analisadas após a autoclavação, da mesma forma observamos que não houve, de um modo geral, diferença significativa no teor médio dos componentes. Houve uma exceção em relação ao teor de cinzas na ração **B** que foi significativamente menor que na ração **A**, mas mantendo-se dentro do valor mínimo recomendado pelo AIN-93G e não ultrapassando o valor máximo descrito nos rótulos das embalagens.

O aspecto que mais chama a atenção é que os teores de fibras das diversas amostras analisadas ultrapassaram os limites máximos da recomendação dos próprios fornecedores, que no geral são muito parecidas. Pode ocorrer uma mistura de componentes não purificados, como por exemplo, ao invés de ser acrescentada à dieta apenas o grão de milho, estariam sendo trituradas as espigas inteiras e misturadas à ração, com isso um aumento considerável no teor de fibras. De acordo com Neves (1996), a celulose, a hemi-celulose e a lignina são muito resistentes à degradação enzimática podendo ser parcialmente fermentadas por bactérias no cólon.

Quando comparamos o teor dos componentes das rações antes e após a autoclavação, observamos que o teor médio de fibra aumentou nas rações **B** e **C** após a autoclavação. Além disso, observou-se que o teor de Cinzas na ração **D**, antes da autoclavação é maior que após a autoclavação.

Os componentes que mais sofrem a ação de degradação durante o processo de autoclavação são as proteínas e vitaminas (Neves, 1996). Observamos que não houve diferença significativa em termos de quantidade de proteína entre as quatro rações. Como as proteínas e as vitaminas são componentes da ração que mais influenciam diretamente no desenvolvimento dos animais, possivelmente o que explicaria o menor desenvolvimento ponderal de alguns camundongos é a qualidade protéica da ração que lhes foi fornecida. Fizemos uma análise quantitativa, mas não qualitativa dos componentes nutricionais. Segundo Neves (1996), dependendo da espécie animal, as necessidades nutricionais irão variar quantitativa e qualitativamente.

Apesar de não ter sido dosado o teor de vitaminas nas rações, em todos os rótulos estava descrito o pré-mix vitamínico e este apresentou-se dentro dos valores recomendados para a dieta de roedores. É possível que o baixo ganho de peso dos animais observado especialmente no grupo **D** deve-se à deficiência ou ausência de alguma vitamina (hipovitaminoses ou avitaminoses). A vitamina D, por exemplo, é importante para a absorção de cálcio. Sua deficiência pode causar raquitismo em animais jovens. Os animais pertencentes ao grupo **D** mostraram-se raquíticos. A vitamina E tem uma grande importância na reprodução, proteção dos sistemas musculares e nervoso. A deficiência de vitamina E ocasiona distrofia muscular e lesões nervosas. Nós observamos que os animais pertencentes ao grupo **D** apresentaram, além do baixo ganho de peso, tremores, pelos arrepiados e falta de coordenação motora.

A desnaturação proteica nem sempre tem um efeito maléfico. Em alguns casos pode facilitar a digestão da proteína por enzimas quando a proteína está na sua estrutura primária. O perigo é uma autoclavação excessiva e neste caso se perder a estrutura primária da proteína. De um modo geral, nos lotes analisados observou-se que não houve perda de proteína durante a autoclavação. O que pode ter ocorrido foi uma modificação na sua forma e estrutura o que facilita a sua digestibilidade enzimática. A exceção foi para a ração **C** (2º lote) que apresentou uma redução no teor de proteína em cerca de 27% após a autoclavação (abaixo do descrito no rótulo da embalagem) e de 17% abaixo do valor recomendado pelo AIN93G. De acordo com Souza *et al.* (2001), a desnutrição protéica exerce influência na imunidade celular dos animais, no sistema

complemento e no processo de fagocitose, quando foram comparados camundongos **Swiss webster** nutridos com uma dieta controle (20% de proteína) com aqueles cuja dieta constituiu-se de 4% de proteína.

Observamos que o teor de umidade das rações analisadas nos 4 lotes mostrou-se dentro do limite máximo, descrito nos rótulos das embalagens e, do valor mínimo recomendado pelo AIN-93G. Esperávamos que o teor de umidade aumentasse provocando uma redução na concentração dos outros nutrientes.

Nas rações **A** e **C** está escrita nos rótulos das embalagens a presença de antioxidantes (100mg). Nos rótulos das outras rações não consta a presença de antioxidantes. A rancificação oxidativa ocorre em lipídios que contêm ácidos graxos insaturados e que podem sofrer oxidação, degradação e polimerização por mecanismos de radicais livres (Bobbio, 2001). A presença de antioxidantes nas rações **A** e **C** protegeria os lipídios da rancificação.

De um modo geral os animais alimentados com as rações **A** e **B** mostraram um melhor desenvolvimento em relação aos animais alimentados com as rações de outras marcas. A ração **C** ocupou uma posição intermediária e a ração **D** foi a que apresentou resultados menos satisfatórios.

VII.2 - Capacidade reprodutiva dos camundongos alimentados com as diferentes rações

Na geração F0 a proporção de fêmeas prenhas alimentadas com as rações **A** e **B** foi significativamente maior em relação às fêmeas alimentadas com a ração **D**. Não houve diferença significativa na proporção de fêmeas prenhas alimentadas com as diferentes rações na geração F1 e F2, mas observou-se uma tendência a um maior número de prenhez nas fêmeas alimentadas com a ração **A** e o contrário naquelas pertencentes ao grupo alimentado com a ração **D** nas referidas gerações.

O número de filhotes por fêmeas na geração F1 foi significativamente maior nas fêmeas alimentadas com as rações **A** e **B** do que nos animais alimentados com a ração **D**. Nas gerações F2 e F3 não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de filhotes por fêmeas, mas observou-se uma tendência a um maior número de filhotes por fêmeas quando alimentadas com as rações **A** e **B** em relação à **D**. Nas três gerações analisadas o número de filhotes natimortos entre os grupos alimentados com as diferentes rações foi zero (**B** e **C**) ou próximo de zero (**A** e **D**). Possivelmente o maior impacto no fator reprodutivo ter ocorrido de forma significativa na primeira geração (F0) deveu-se a uma mudança brusca na dieta dos animais, o que não é aconselhável em biotérios.

Sabe-se que as necessidades de proteína aumentam durante a fase de gestação, lactação e crescimento do animal (Neves, 1996). Podemos inferir que em função do menor número de fêmeas prenhas observadas no grupo de animais alimentados com a ração **D** na geração F0 e um menor número de filhotes por fêmeas desse mesmo grupo em relação aos animais alimentados com as rações **A** e **B**, podem estar relacionados à qualidade protéica, já que não houve uma diminuição do teor protéico após autoclavação das rações ou com uma deficiência vitamínica (que não foi dosada neste trabalho). A ração **C** ocupa uma posição intermediária entre as demais marcas de rações em termos de reprodutibilidade e prolificidade dos animais.

De acordo com Rutland *et al.* (2006), camundongos mães submetidas a uma dieta de má qualidade certamente não possibilitarão condições de aleitamento satisfatório dos filhotes. A subnutrição materna pode ter como consequência uma menor prole além de contribuir para doenças tardias ao longo da vida do animal. Outros estudos mostram a relação entre a deficiência de proteínas na dieta de fêmeas de camundongos prenhas e em sua prole (Millis & Offiah, 2006).

Em relação às vitaminas, a deficiência de vitamina A na dieta dos animais pode causar diminuição da lactação. É possível que o menor ganho de peso observado nos animais pertencentes ao grupo **D** possa estar relacionado à deficiência dessa vitamina.

Neste trabalho observamos que, de um modo geral, a ração **A** apresenta-se como a melhor em termos de reprodutibilidade e prolificidade. É importante que em biotérios de produção o índice de prolificidade dos animais seja alto e capaz de suprir a demanda de uso dos mesmos para os diversos ensaios experimentais.

VII.3 - Desenvolvimento ponderal dos camundongos das gerações F0, F1 e F2

De acordo com a literatura, o peso médio dos camundongos ao nascimento varia de 1g a 2g. Aos 21 dias de idade o peso varia de 10 a 12 g e ao atingirem a idade adulta os machos pesam cerca de 30 a 40 g e as fêmeas 30 a 35 g (Andrade *et al.*, 2002).

De um modo geral, os animais alimentados com a ração **A** apresentaram melhor resultado em termos de ganho em peso. Os animais alimentados com a ração **D** não apresentaram resultados satisfatórios.

Aos 15 dias de idade, já podemos avaliar em todas as gerações, que os animais alimentados com a ração **D** apresentaram menor ganho em peso em relação aos animais alimentados com as outras rações.

Aos 30 dias, os animais alimentados com as rações **C** e **D** apresentaram um menor ganho em peso em relação aos alimentados com as rações **A** e **B**, nas gerações F1 e F2.

Aos 50 dias observou-se nas gerações F1 e F2 que os camundongos apresentaram menor ganho em peso quando alimentados com a ração **D**.

Especialmente na geração F2, observou-se, ao nascimento, que os animais cujas mães foram alimentadas com a ração **B** apresentaram maior ganho em peso quando comparados com aqueles alimentados com as outras rações.

Baseando-se nos estudos feitos por Oliveira *et al.* (2003), onde se verificou que os animais desnutridos mostraram uma significativa diminuição no ganho de peso e na evolução ponderal durante o tratamento com uma dieta hipoprotéica e mesmo durante a recuperação nutricional, podemos inferir que houve uma deficiência, possivelmente qualitativa, em determinados componentes nutricionais da ração **D**, cujos animais apresentaram menor ganho de peso em relação aos animais alimentados com as rações

A, B e C. Esta deficiência se manifestou provavelmente no desenvolvimento dos animais desde o período de lactação dos mesmos até o desmame. Estudos em ratos recém-desmamados têm mostrado que a desnutrição protéica induz, em um primeiro momento, a diminuição no consumo de alimentos, seguindo-se de redução no ganho de peso e atraso na evolução ponderal. Outro fator que poderia estar relacionado com o menor ganho de peso dos animais, especialmente aqueles alimentados com a ração **D** é a deficiência de outros componentes que não foram dosados, como por exemplo, as vitaminas.

De acordo com Guzmán *et al.* (2004), analisando-se o ganho ponderal médio em *Rattus norvegicus* aos 28 dias de idade, observou-se que o peso dos animais alimentados com uma dieta controle apenas com suplementação alimentar, mas isenta de vitaminas e minerais foi significativamente inferior aos grupos de animais cuja dieta era constituída de suplementação alimentar, vitaminas e minerais.

Nas dietas de animais de laboratório a principal fonte de carboidratos é o amido dos cereais. A galactose é a mais importante fonte de energia para os animais lactentes, assim, observamos que aos 15 dias de idade (período final da lactação) os animais cujas mães foram alimentadas com a ração **D** apresentaram menor ganho de peso em relação aos animais dos demais grupos. Isto foi observado em todas as gerações analisadas. Sabe-se que o período entre a gestação e os cinco anos de idade é, do ponto de vista nutricional, segundo Lajolo & Tirapegui (1998), o mais vulnerável segmento do ciclo de vida do homem, daí a importância do estudo da desnutrição na fase de crescimento, utilizando-se os animais como modelos experimentais.

VII.4 – Avaliação do peso relativo de órgãos de camundongos com 30 e 50 dias de idade, alimentados com as diferentes rações.

Fazendo-se uma análise geral, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na relação peso órgão / peso corporal nos animais machos e fêmeas, aos 30 e 50 dias de idade das três gerações, alimentados com as diferentes rações.

Chamamos atenção para o peso relativo do baço, rins e coração das **fêmeas** da geração **F1**, com **30 dias** de idade, alimentadas com a ração **D**, cujos pesos foram estatisticamente maiores do que aqueles cujos animais foram alimentados com as outras rações. Em relação aos camundongos **machos** da geração **F1**, com **30 dias** de idade observamos que o peso relativo do pulmão dos animais alimentados com a ração **C** foi estatisticamente maior que dos alimentados com a ração **D**. Aos **50 dias** de idade, os animais pertencentes a esta geração e alimentados com a ração **D** apresentaram o peso do fígado estatisticamente maior que dos alimentados com a ração **B**. Provavelmente, de acordo com Rossi *et al.* (2004) existe uma relação entre o acúmulo de gordura no fígado de camundongos mais velhos e a lipidose hepática caracterizada por uma desordem metabólica que afeta estes animais. Isto pode ter ocorrido especificamente com este grupo de camundongos alimentados com a ração **D**. De acordo com Oliveira *et al.* (2003), modificações no crescimento orgânico, associadas com possíveis mudanças na estrutura celular durante a restrição protéica, por exemplo, podem ser as responsáveis pelo mau funcionamento de órgãos e sistemas e assim propiciar a instalação de certas fisiopatologias irreversíveis. Guzmán *et al.* (2004) verificou ao analisar o peso médio do fígado, baço e rins de ratos submetidos à diferentes dietas (dieta controle com suplementação alimentar sem acréscimo de vitaminas + minerais e uma dieta com acréscimo destes componentes), que o peso do baço, fígado e rins de animais alimentados com a primeira dieta foi significativamente inferior aos grupos de animais alimentados com a suplementação alimentar acrescentada de vitaminas + minerais. Possivelmente as rações **C** e **D** fornecidas aos animais apresentam alguma deficiência vitamínica-mineral. Infelizmente estes componentes não foram avaliados na análise composicional das rações.

VII.5 - Ocorrência de endoparasitos em camundongos alimentados com as diferentes rações.

Observamos que não houve diferença no parasitismo dos animais aos 30 e 50 dias de idade, nas três gerações, quando alimentados com as diferentes rações. Na geração **F0**, houve uma tendência à redução do parasitismo com a idade. Houve diferenças estatisticamente significativas em relação a ocorrência de protozoários nos animais alimentados com a ração **A** e pertencentes à **F1** que foi maior aos 30 dias. Observou-se também que na geração **F2** houve uma maior ocorrência de helmintos aos 50 dias.

Em nenhum dos grupos de animais aos 30 e 50 dias de idade nas três gerações analisadas houve infecção por *Himenolepis nana* ou *H. diminuta* que são parasitos Cestódeos. Uma das formas de infecção se dá pela ingestão da ração contaminada com o hospedeiro intermediário (inseto) contendo os ovos do helminto. Neste ciclo heteroxênico, pequenos coleópteros funcionam como hospedeiros intermediários. A transmissão habitual se dá pela ingestão de ovos e ocasionalmente à ingestão de insetos contaminados (Mazzucco, 2002 ; Andrade *et al.*, 2002).

Segundo Scott & Koski (2000), poucos estudos examinaram os efeitos da desnutrição na resposta imune do hospedeiro infectado pelo parasito, e muito menos consideraram os eventos que acontecem em nível intestinal onde a absorção de nutrientes acontece, os parasitos intestinais residem, e o tecido linfóide associado ao intestino representa um papel importante dirigindo ambas as respostas imunes, local e sistêmica.

A *Syphacia obvelata* é o mais comum dos helmintos presentes em animais de laboratório. Sua erradicação é muito difícil em tratando-se de biotérios convencionais, mesmo os controlados. O ovo da *S. obvelata* é muito leve e facilmente aerolizado, o ciclo biológico desse helminto nematódeo é direto.

VII.6 - Nível populacional de bactérias nas fezes dos camundongos alimentados com diferentes rações

Observamos que não houve diferença significativa em relação ao nível de enterobactérias nas fezes dos animais com 30 e 50 dias de idade alimentados com as diferentes rações nas gerações analisadas. Chamamos atenção para a geração **F0** onde

os animais com 30 dias de idade e alimentados com a ração **D** apresentaram um número de enterobactérias superior àqueles alimentados com as outras rações. Este é um fator negativo, uma vez que o nível de enterobactérias deve ser sempre inferior ao de lactobacilos na microbiota normal dos animais. Analisando-se a geração **F2**, observou-se que nas fezes dos animais com 30 dias de idade e alimentados com a ração **C** o nível populacional de enterobactérias foi menor do que o grupo de animais alimentados com as outras rações.

De acordo com Brandt *et al.* (2006) a maior parte da microbiota bacteriana intestinal é benéfica ao hospedeiro, exercendo funções digestiva, imunomoduladora e de inibição de patógenos. A microbiota normal esperada de lactobacilos deve ser maior (10 a 100x) do que a de enterobactérias. Em relação ao nível populacional de lactobacilos não houve diferença significativa nos animais com 30 e 50 dias de idade para todas as rações analisadas.

De um modo geral os resultados da relação lactobacilos / enterobactérias mostraram-se com um valor superior a 1 para todas as rações.

VIII - CONCLUSÕES

☐ De um modo geral, após a autoclavagem, as quatro rações analisadas permaneceram dentro dos valores recomendados pelo AIN-93G e os descritos nos rótulos das embalagens.

☐ Nas três gerações analisadas, os camundongos alimentados com a ração **A** apresentaram os maiores índices de reprodutibilidade e prolificidade seguidos pelos camundongos alimentados com as rações **B** e **C** com índices intermediários e a ração **D** com os menores índices. Observamos diferença estatisticamente significativa nos parâmetros reprodutibilidade e prolificidade, nas gerações F0 e F1 respectivamente.

☐ Os camundongos machos e fêmeas alimentados com a ração **A** apresentaram maiores ganhos em peso do que os alimentados com a ração **D** e semelhantes aos alimentados com as rações **B** e **C** nas três gerações analisadas.

☐ Em geral, os camundongos alimentados com as diferentes rações não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso relativo dos órgãos, ocorrência de helmintos e protozoários e composição da microbiota intestinal nas gerações e idades avaliadas.

☐ Tendo em vista a semelhança na composição das rações em termos quantitativos, justifica-se o ganho em peso diferenciado nos animais alimentados com as diferentes rações em função da qualidade dos nutrientes.

☐ De acordo com os resultados acima, recomendamos a utilização da ração **A** para a alimentação de camundongos de laboratório.

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Institute of Nutrition. Report of the AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION ad hoc committee o standards for nutritional studies. J. Nutr. 1977; 107: 1340-1348.
- American Institute of Nutrition. Purified diets for laboratory rodents: final report of the AMERICAN INSTITUTE of NUTRITION ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J. Nutr. 1993; 123(11):1939-51
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of the United States of America, Washington DC. Rev. Nutr. 1993; 90: 7915 - 7922.
- AOAC - Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist. William Horwitz (ED.), 13^oed. Washington, 1980.
- Andersen ML, D’Almeida V, KO GM, Kawakami R, Martins PJF. Princípios éticos e práticas do uso de animais de experimentação. São Paulo, 2004: 71-78.
- Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório – criação e experimentação. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ. 388p, 2002.
- Barbosa FHF, Bambirra FHS, Martins FS, Nicoli JR. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp. da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – avaliação “in vitro”, “ex vivo” e “in vivo” em camundongos gnotoxênicos. Rev. Biol. Ciênc. da Terra, 2006. v.6, número 1.
- Barry T, Collieran G, Glennon M., Dunican LK, Gannon F. The 16S / 23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubactéria. PCR methods Appl. 1991; 51-56..
- Bobbio PA, Boobio FO. Química do processamento de alimentos. 142p. : Editora Varela, 3^o ed, 2001; São Paulo.
- Brandt KG, Sampaio MMS, Miuki CI. Importância da microflora intestinal. Pediatría, São Paulo 2006; 28 (2): 117-127.
- Canadian Council On Animal Care (CCAC) – Guide to the care and use of experimental animals. Vol 2 – Ottawa, 1984.
- Cardoso CVP. Eutanásia. **Animais de laboratório – Criação e Experimentação**. 1^o ed. 2002; 275 – 279. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro..
- Carvalho RA, Carvalho SA, Mourão FRP, Brito MVH. Avaliação nutricional de ração comercial para camundongos (*Mus musculus*), Rev. para. med. 2003; 17 (2): 23 -28.
- Coates ME et al. Nutrients requirements of laboratory animals. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), 1984.
- Davis CP, Allister JS, Savage DC. Microbial colonization of the intestinal epithelium in sucking mice. Infect. Immun. 1973; 7: 666 – 672.

Faria HG, Stabile SR. Efeito de diferentes tempos de autoclavagem sobre a qualidade nutricional da ração utilizada para ratos (*Rattus norvegicus*) em crescimento. *Acta Scient.* 2001; 23: 645 – 648.

Ferreira CLLF. Grupo de bactérias lácticas- caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas, In: Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção. C.L.L.F. Ferreira (ed), 2003; Viçosa, MG, 7-33.

Garrity GM. Springer Science, 2005. New York, v.3.

Gilioli R, Andrade LAG, Passos LAC, Silva FA, Rodrigues DM, Guaraldo AMA. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.* 2000; 52: 33 - 37.

Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos.. 138f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

Gonçalves L, Pinto RM, Vicente JJ, Noronha D, Gomes DC. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice –II. Inbred strains an adaptation of the Anal Swab Technique. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1980 93 (1): 121-126.

Guide For The Care And Use Of Laboratory Animal, National Research Council, Washington, DC, 1996.

Guzmán-Silva MA., Wanderley AR, Macêdo VM, Boaventura GT. Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. *Rev. Nutr.* 2004; Vol.17 nº.1, Campinas, S.P.

Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. In: the Lactic Acid Bacteria. The genera of Lactic Acid Bacteria. B.J.B Wood & W.H. Holzapfe (ed), London, v.2, 19-51, 1995.

Holmes E, Nicholson J. Variation in gut microbiota strongly influences individual rodent phenotypes. *Toxicol. Sci.* 2005; 87 (1), 1-2.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of determinative bacteriology* 1994. 9.ed: Willians e Willkins, Baltimore, 787p.

Kabadjova P, Dousset X, Le Cam V, Prevost H. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 5358–5366.

Kandler O, Weiss N. Regular nonsporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1986. Sneath, P. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E., Holt, J. G. eds. Baltimore, 1208-1234.

- Katsumi M, Koji Y, Tomoharu I. Comparative Sequence Analyses of the Genes Coding 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-Related Taxa. *International Journal Of Systematic Bacteriology* 1997, p. 54-57.
- Lajolo FM., Tirapegui J. Proteínas e aminoácidos. In: Dutra de Oliveira JE, Marchini SJ. *Ciências Nutricionais* 1998. São Paulo: Sarvier; p.61-4.,
- Lemeshow S, Hosmer Jr DW, Klar J. Adequacy of sample size in health studies. *World Health Organization*. 1995.
- Lincoln M, Nogueira AM, Nicoli JR, Vieira L, Alvarez-Leite J. Influência da deficiência protéica, da idade e da microbiota em parâmetros histológicos, anatômicos em camundongos isentos de germes e convencionais. Faculdade de Medicina/ Curso de Pós-Graduação em Patologia/ Depto de Anatomopatologia Médica. 2000.
- Maret W, Sandstead HH. Possible roles of zinc nutriture in the fetal origins of disease. *Experimental Gerontology*, 2007.
- Marques MAP. Controle parasitológico. Animais de laboratório – Criação e experimentação. 1ª edição. p. 303 – 316., Ed. FIOCRUZ - Rio de Janeiro, 2002.
- Marques T, Alexandre SR. Controle parasitológico. Manual para técnicos em bioterismo, 2ª ed., Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – São Paulo, 1996.
- Matos AM. Pesquisa e caracterização de substância(s) antagonista(s) do tipo Bacteriocina produzida(s) por amostras de *Lactobacillus murinus*. Departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2007 (Dissertação de Mestrado).
- Mazzucco MA. Roteiro de aula teórica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. 2002
- Millis RM & Offiah GU. Dietary protein deficiency in pregnant mice offspring. *Life sciences* 80: 1184-1188, 2006.
- Moreira JLS, Mota RM, Horta MF, Teixeira SMR, Neumann E, Nicoli JR, Nunes AC. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol*. 2005; 5: 15-20.
- Mourão DM, Sales NS, Coelho SB, Pinheiro-Santana HM. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. *Rev. Nutr.* 2005; 18: 529-539.
- Nagura T, Hachimura S, Kaminogawa S, Aritsuka T, Itoh K. Characteristic intestinal microflora of Specific Pathogen Free mice bred in two different colonies and their influence on post natal murine immunocyte profiles. *Exp. Anim.* 2005; 54: 143 – 148.

- Nardi RMD, Santoro MM, Oliveira JS, Pimenta AMC, Ferraz VP, Benchetrit LC, Nicoli JR. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99:649 -656.
- National Research Council – Building a North American Feed Information system. Improving the application of nutritional science, 1995.
- National Research Council, edição em português. Manual Sobre Cuidados De Animais De Laboratório, COBEA 2003; Goiana – Goiás, 162p.
- Neves SP. **Nutrição** – Manual para técnicos em bioterismo, 2º edição. P.87 -107-COBEA, 1996.
- Nilsen f. Small subunit rDNA phylogeny of *Bacillidium* sp. (Microsporidia, Mrazekiidae) infecting oligochaets. *Parasitol.* 1999. 118, 553-558.
- Oliveira JC, Silva APS, Barbosa FB. Avaliação da evolução ponderal e homeostasia glicídica de ratos submetidos à desnutrição protéica lactacional. Universidade do Rio Grande do Norte. *Expressão*, Mossoró 2003; 34(1-2).
- Paço RS, Leme IL, Bottino JA, Ferreira AJP. Identification of *Lactobacillus* spp from broiler litter in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2003; 34: 236-237.
- Paim HS. **Nutrição** – Manual para técnicos em animais de laboratório. 73-79 , 1994.
- Perec-Matysiak A, Okulewicz A, Hildebrand J, Zalesny G. Helminth parasites of laboratory mice and rats. *Wiad Parazytol* 2006 ; 52 (2): 99 -102.
- Reeves PG, Nielsen FH. & Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123, 1939-1951.
- Reis MA, Velloso LA, Reyes FGR.; Metabolic changes of glucose in the magnesium deficiency. *Rev. Nutr* 2002. Vol.15 nº3, Sept. Campinas, S.P.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Distúrbios nutricionais. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Interamericana;. p.390, 1986.
- Robosky LC, Wells DF, Egnash LA, Manning ML, Reily MD and Robertson DG. Metabonomic identification of two distinct phenotypes in Sprague- Dawley (CrL: CD) rats. *Tox. Sci. Advance Access*. Junho 2005.
- Rossi CAR, Cunha SHM, Noro M, Cecim M. A clinical method of liver fat valuation. *Ver. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguaiana*, 2004; v.11, n.1, p 77-84.
- Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S, Leach L. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. *Placenta* 2007; 28: 734-742.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim M 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Santos HB, Madruga MS, Bion FM, Antunes LM, Mendes K, Ágüida R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais em dietas enriquecidas com multimisturas. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas* 2004; 24 (4): 613-618.
- Savage DC. Microbial ecology of gastrointestinal tract. *Ann Rev. Microbiol.* 1977, v.31, 943 -947.
- Scott ME, Koski KG. Zinc deficiency impairs immune responses against parasitic nematode infections at intestinal and systemic sites. *J. Nutr. (Suppl)* 2000.
- Selink B, Diker AI, Kuçukyıldız F. Helminths detected in some laboratory animals by fecal examinations. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2005; 29 (2): 123-125.
- Shah BG, Belonje B. & Nera EA. Reduction of nephrocalcinosis in female rats by additional magnesium and fluoride. *Nutr. Res.* 1980; 6: 559-570.
- Sharif J, Nakamura M, Ito T, Kimura Y, Nagamune T, Mitsuya K, Okamura K. Food restriction in pregnant mice can induce changes in histone modifications and suppress gene expression in fetus. *Nucleic Acids Symposium Series* 2007; No. 51: 125-126
- Smith AM. & Picciano MF. Relative bioavailability of seleno- compounds in the lactating rat. *J. Nutr.* 1987.117: 725-731.
- Souza IP, Kang HC, Nardinelli L, Borelli P. Desnutrição Protéica: Efeito sobre o espraçamento, Fagocitose e Atividade Fungicida de Macrófagos Peritoneais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.* 2001, v. 37, 2: 143-151.
- Stachan R, Kunsty R. Minimal Infectious Doses and Prepatent Periods in *Giardia muris*, *Spironucleus muris* and *Trichostrongylus muris*. *Zbl. Bakt. Hyg* 1983; A 256, 249-256.
- Tannock GW. Biotin-labeled plasmid DNA-probes for detection of epithelium associated strains of *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55: 461-464.
- Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Ng, J, Munro K, Alatosava T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 4264 – 4267.
- Tilsala-Timisjarvi A, Alatosava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Intern. J. Food. Microbiol.* 1997; 35: 49-56.

Van Zutphen LMF, Baumans V, Beynen AC, Principles of laboratory animal science. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results, revised edition, Elsevier, 1993.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel PJ, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, Maniloff J, and Woese CR. A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas: Basis for their classification. J. Bacteriol. 1989; 6455 – 6467.

Wenrick DH. Culture Experiments on Intestinal Flagellates. II. Additional Observations on Flagellates from Man, Rodents and Insect Larvae . J. Parasitol. 1947, Vol. 33, No. 1: 25-28.

Wostman BS, Guide for the care and use of laboratoty animals. 1975. Portuguese edition (1996).

Zhang J, Wang C, Terroni PL, Cagampang FRA, Hanson M, Byrne CD. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 288: R112 – R118.

Zimmerman and Wostmann. Vitamin Stability in Diets Sterilized for Germfree Animals. J. Nutr. 1963; Vol. 79 No. 3: 318-322.

ANEXO 1 - PARECER DO CEUA

**ANEXO 2 – Análise da composição nutricional do primeiro lote de rações
Fabricação: Novembro 2006**

Ração	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra (%)	Proteína bruta (%)	Carboidrato (%)
A - Rótulo	12	10	4,0	8,0	22	NF
	(máx)	(máx)	(mín)	(máx)	(mín)	
A - Autoclav.	8,18	13,49	13,48	8,79	20,36	35,70
A - Não autoclav.	8,64	8,74	12,13	9,07	24,19	37,23
B - Rótulo	13	10	4,0	10	23	NF
	(máx)	(máx)	(mín)	(máx)	(mín)	
B - Autoclav.	8,17	6,29	12,46	10,87	22,04	40,17
B - Não autoclav.	8,39	5,62	11,96	9,78	22,49	41,76
C - Rótulo	12,50	10	3,0	9,0	22	NF
	(máx)	(máx)	(mín)	(máx)	(mín)	
C - Autoclav.	8,97	7,86	13,77	13,51	22,92	32,97
C - Não autoclav.	8,99	7,60	14,05	8,93	27,83	32,60
D - Rótulo	12,50	10	4,0	8,0	22	NF
	(máx)	(máx)	(mín)	(máx)	(mín)	
D - Autoclav.	8,89	8,22	13,27	11,07	23,43	35,12
D - Não autoclav	8,75	8,48	12,64	13,71	23,43	33,99
Recomendação AIN-93G*	6,6	4,17	7,0	5,0	19,3	64
	(mín)	(mín)	(mín)	(mín)	(mín)	(mín)

*REEVES P.G., NIELSEN F.H. & FAHEY G.C., Jr. (1993)

NF = Não Fornecido

ANEXO 3 – Análise da composição nutricional do segundo lote de rações
Fabricação: Abril 2007

Ração	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra (%)	Proteína bruta (%)	Carboidrato (%)
A - Rótulo	12 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
A - Autoclav.	8,10	8,85	14,10	9,53	21,90	37,52
A - Não autoclav.	8,55	8,95	13,00	9,86	16,60	43,04
B - Rótulo	13 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	10 (máx)	23 (mín)	NF
B - Autoclav.	8,33	7,12	11,07	11,06	21,44	40,98
B - Não autoclav.	8,90	7,09	14,71	9,53	14,59	45,18
C - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	3,0 (mín)	9,0 (máx)	22 (mín)	NF
C - Autoclav.	7,75	8,20	13,58	11,83	16,02	42,62
C - Não autoclav.	8,37	8,63	13,90	9,37	21,95	37,38
D - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
D - Autoclav.	9,22	7,23	12,40	10,42	21,45	39,28
D- Não autoclav	8,75	7,28	16,80	9,75	21,14	36,28
Recomendação AIN-93G*	6,6 (mín)	4,17 (mín)	7,0 (mín)	5,0 (mín)	19,3 (mín)	64 (mín)

*REEVES P.G., NIELSEN F.H. & FAHEY G.C., Jr. (1993)

NF = Não Fornecido

**ANEXO 4 – Análise da composição nutricional do terceiro lote de rações
Fabricação: Julho 2007**

Ração	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra (%)	Proteína bruta (%)	Carboidrato (%)
A - Rótulo	12 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
A - Autoclav.	8,63	8,80	11,10	10,07	20,85	40,55
A - Não autoclav.	8,48	9,30	9,50	9,63	22,10	40,99
B - Rótulo	13 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	10 (máx)	23 (mín)	NF
B - Autoclav.	8,47	7,20	4,80	12,43	22,45	44,65
B - Não autoclav.	7,72	7,20	7,80	9,50	21,13	46,65
C - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	3,0 (mín)	9,0 (máx)	22 (mín)	NF
C - Autoclav.	7,06	8,70	7,50	11,07	21,75	43,92
C - Não autoclav.	8,64	8,80	6,70	10,41	22,90	42,55
D - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
D - Autoclav.	8,30	6,40	8,30	9,18	22,07	45,75
D- Não autoclav	7,26	6,80	5,70	10,35	21,90	47,99
Recomendação AIN-93G*	6,6 (mín)	4,17 (mín)	7,0 (mín)	5,0 (mín)	19,3 (mín)	64 (mín)

*REEVES P.G., NIELSEN F.H. & FAHEY G.C., Jr. (1993)

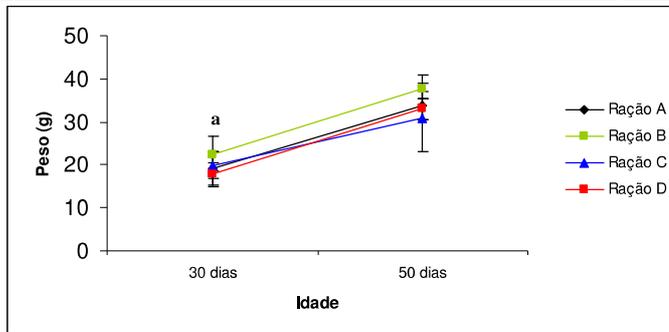
NF = Não Fornecido

ANEXO 5 – Análise da composição nutricional do quarto lote de rações
Fabricação: Setembro 2007

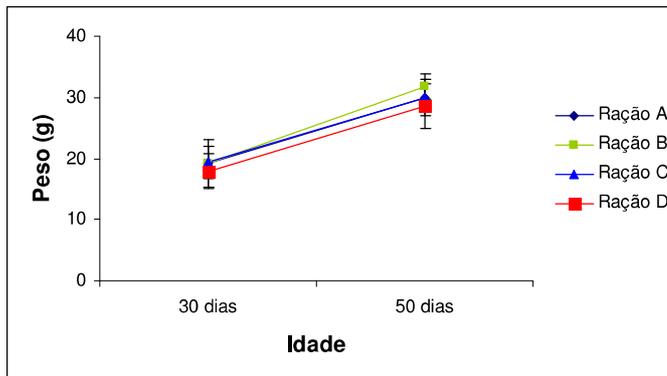
Ração	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra (%)	Proteína bruta (%)	Carboidrato (%)
A - Rótulo	12 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
A - Autoclav.	7,52	8,73	12,40	13,17	21,42	36,76
A - Não autoclav.	7,91	7,95	8,38	12,47	22,12	41,17
B - Rótulo	13 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	10 (máx)	23 (mín)	NF
B - Autoclav.	6,61	7,21	6,93	10,13	22,57	46,55
B - Não autoclav.	7,62	6,07	10,12	8,72	22,73	45,35
C - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	3,0 (mín)	9,0 (máx)	22 (mín)	NF
C - Autoclav.	7,45	9,02	9,37	12,50	23,73	37,93
C - Não autoclav.	7,80	8,70	8,25	9,20	24,37	41,68
D - Rótulo	12,50 (máx)	10 (máx)	4,0 (mín)	8,0 (máx)	22 (mín)	NF
D - Autoclav.	6,39	9,51	9,31	10,24	22,73	41,85
D - Não autoclav	7,72	9,75	7,90	11,15	22,47	41,01
Recomendação AIN-93G*	6,6 (mín)	4,17 (mín)	7,0 (mín)	5,0 (mín)	19,3 (mín)	64 (mín)

*REEVES P.G., NIELSEN F.H. & FAHEY G.C., Jr. (1993)

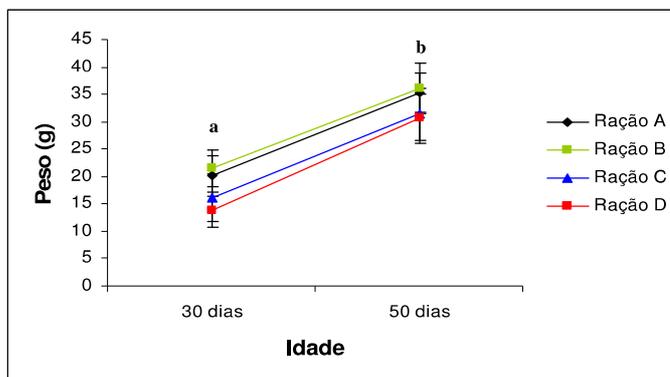
NF = Não Fornecido



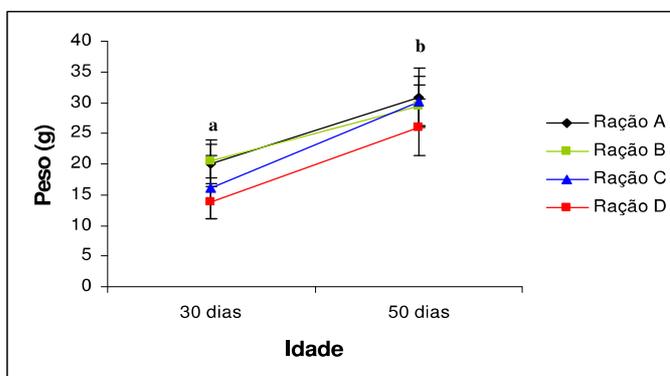
ANEXO 6: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos da geração F0 alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam o desvio padrão da média. ^a O peso dos animais alimentados com a ração B é estatisticamente maior do que daquele dos animais alimentados com a ração D ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey.



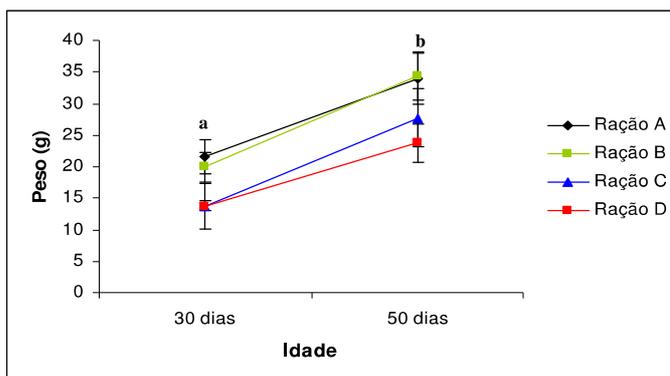
ANEXO 7: Desenvolvimento ponderal de camundongos fêmeas da geração F0 alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam o desvio padrão da média. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$).



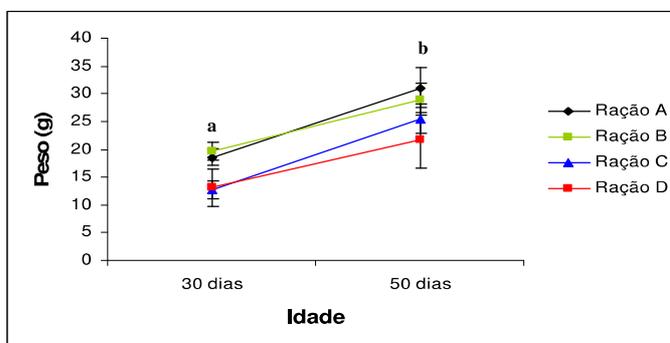
ANEXO 8: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos da geração F1 alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam o desvio padrão da média. ^a O peso dos animais alimentados com as rações D é estatisticamente menor do que os alimentados com as rações A e B ($p < 0,05$), além disso, o peso dos camundongos alimentados com a ração B é significativamente maior que dos alimentados com a ração C, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey. ^b O peso dos animais alimentados com a ração D é significativamente menor que dos alimentados com a ração B ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Tukey.



ANEXO 9: Desenvolvimento ponderal de camundongos fêmeas da geração F1 alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam o desvio padrão da média. ^a O peso dos animais alimentados com rações A e B é significativamente maior em relação ao peso dos animais alimentados com a ração D ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Dunn's. ^b O peso dos animais alimentados com a ração D é significativamente menor do que aqueles alimentados com a ração A ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Tukey.



ANEXO 10: Desenvolvimento ponderal de camundongos machos da geração F2 alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam desvio padrão da média. ^a O peso dos animais alimentados com as rações C e D são estatisticamente menores em relação aos alimentados com as rações A e B ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Dunn's. ^b O peso dos animais alimentados com as rações C e D são estatisticamente menores em relação a A e B ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey.



ANEXO 11: Desenvolvimento ponderal de camundongos fêmeas da geração F2 alimentados com diferentes rações comerciais. As barras verticais representam desvio padrão da média. ^a O peso dos animais alimentados com rações C e D são estatisticamente menores do que os alimentados A e B ($p < 0,05$) de acordo com o método de comparações múltiplas de Dunn's. ^b O peso dos animais alimentados com as rações A e B são estatisticamente maiores do que daqueles alimentados com a ração D ($p < 0,05$), além disso, o peso dos animais alimentados com a ração A é estatisticamente maior do que aqueles alimentados com a ração C, de acordo com o método de comparações múltiplas de Tukey.